

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



**SYNTÉZA A HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH
ANTITUBERKULOTIK NA BÁZI INHIBITORŮ InhA**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Antalová Simona

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa 20.5.2021

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela srdečne poďakovať svojmu školiteľovi doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za jeho neoceniteľnú pomoc, odborné rady, ochotu a trpezlivosť po celú dobu vypracovávania tejto diplomovej práce. Ďakujem takisto celému kolektívu Katedry organickej a bioorganickej chémie za ochotu a ústretový a priateľský prístup, ďalej RNDr. Jiřine Stolaříkovej za testovanie antibakteriálnych aktivít. Moja vďaka patrí takisto rodine a priateľovi za veľkú podporu poskytnutú behom riešenia tejto práce.

Práca bola podporená grantom Grantové agentúry ČR č. 20-19638Y (Design a studium nových antimikrobních látok účinných na rezistentní a biofilm-produkující gram-pozitivní bakterie).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Riešiteľ práce: Simona Antalová

Vedúci práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Syntéza a hodnocení potenciálních antituberkulotik na bázi inhibitorů InhA

Tuberkulóza je infekčné ochorenie patriace medzi prvých desať príčin smrti celosvetovo. Pôvodcom tohto ochorenia sú baktérie *Mycobacterium tuberculosis* komplexu. Antimikrobiálna terapia ochorenia je v súčasnosti komplikovaná rapídny nárastom kmeňov rezistentných ku štandardnej antituberkulotickej liečebnej schéme, čo je dôvodom rastúceho záujmu a významu v oblasti hľadania nových látok potenciálne účinných v terapii tohto ochorenia. Jedným z možných prístupov je systematická modifikácia štruktúr so známou antimykobakteriálnou aktivitou. Medzi takéto látky patrí triklosan, ktorý pôsobí ako nekompetitívny inhibítor enzýmu enoyl-acyl-carrier protein reductázy. (InhA), čo je proteín, ktorý sa účastní biosyntézy mykobakteriálnych mastných kyselín. Táto molekula nevyžaduje aktiváciu mykobakteriálnym enzýmom KatG, čím sa vyhýba najčastejšej forme rezistencie na izoniazid, ktorý taktiež pôsobí inhibíciou enzýmu InhA. Cieľom tejto práce bolo syntetizovať a vyhodnotiť nové potenciálne antituberkulotické látky odvodené od triklosanu.

V tejto práci sme syntetizovali a charakterizovali osem štruktúr odvodených od triklosanu, päť z nich vo forme esterov karboxylových kyselín a tri estery sulfónovej kyseliny. Väčšina zo syntetizovaných látok vykazovala porovnateľnú aktivitu s triklosanom voči kmeňu *Mycobacterium tuberculosis* (MIC po 14/21 dňoch inkubácie: 32/64 $\mu\text{mol/l}$, u triklosanu 32/32 $\mu\text{mol/l}$). Zo všetkých pripravených zlúčenín boli dosiahnuté najlepšie výsledky u všetkých kmeňov u (*E*)-5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-(4-methoxyfenyl)-4-oxobut-2-enoátu a 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-acetamidobenzoátu, pri ktorých sme pozorovali pomerne lepšiu aktivitu ako u izoniazidu proti oboj atypickým kmeňom. Vo všeobecnosti sa ukázali karboxyláty svojím účinkom výhodnejšie oproti sulfonátom, u ktorých je nepriaznivá prítomnosť aromatického jadra.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Simona Antalová

Supervisor: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Title of diploma thesis: Synthesis and evaluation of InhA inhibitors as potential antitubercular drugs

Tuberculosis is an infectious disease that belongs to one of the top 10 causes of death worldwide. The most common cause of the disease are *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Antimicrobial therapy of the disease is nowadays complicated by alarming increase of strains resistant to standardly used antitubercular treatment. This is the reason of growing interest and significance in research of new potential antitubercular agents. One of the possible approaches is systematic modification of compounds with a known antimycobacterial activity, one of such compounds being triclosan. This substance acts as an uncompetitive inhibitor of enoyl-acyl-carrier protein reductase (InhA), an enzyme participating in the mycobacterial fatty acid biosynthesis pathway. It does not require activation by the mycobacterial KatG enzyme, thereby avoiding the most frequent mechanism of resistance to the frontline drug isoniazid targeting InhA too. The aim of the study was to synthesise and evaluate new potential antitubercular drugs based on the structure of triclosan.

In this study we prepared eight compounds derived from triclosan, five of them were esters of carboxylic acids, three of sulfonic acids. Most of the derivatives showed a comparable activity to triclosan against *Mycobacterium tuberculosis* strain (MIC values after 14/21 days of incubation being of 32/64 $\mu\text{mol L}^{-1}$, for triclosan 32/32 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Derivatives with the best results among all tested strains were (*E*)-5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenyl 4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobut-2-enoate and 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenyl 4-acetamidobenzoate, with comparatively higher activities than isoniazid for atypical strains. In general, esters of carboxylic acids proved to be superior to sulfonates, where aromatic core showed to be disadvantageous.

Zoznam skratiek

| | |
|------------------------|---|
| BCG | vakcína <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> |
| CoA | koenzým A |
| COVID-19 | Coronavirus Disease 2019 (koronavirové ochorenie 2019) |
| DMAP | 4-(dimethylamino)pyridín |
| DMF | dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EDAC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid |
| ENR | enoyl-acyl carrier protein reduktáza |
| FAS | fatty acid synthase |
| HIV | human immunodeficiency virus (vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti) |
| HRCT | high resolution computed tomography (výpočtová tomografia s vysokým rozlíšením) |
| IC ₅₀ | koncentrácia vedúca k 50% poklesu aktivity voči kontrole |
| INF- γ | interferón gamma |
| INH | izoniazid |
| InhA | enoyl-acyl carrier protein reduktáza (mykobakteriálna) |
| IR | infračervený |
| KatG | kataláza/peroxidáza |
| MIC | minimálna inhibičná koncentrácia |
| MRSA | methicilín-rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Mtb</i> | <i>mycobacterium tuberculosis</i> |
| NAD ⁺ /NADH | nikotínamid adenín dinukleotid oxidovaná/redukovaná forma |
| NMR | nukleárna magnetická rezonancia |
| PABA | <i>para</i> -aminobenzoová kyselina |
| R _f | retenčný faktor |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| TCS | triklosan |
| TLC | tenkovrstvá chromatografia |
| WHO | Svetová zdravotnícka organizácia |

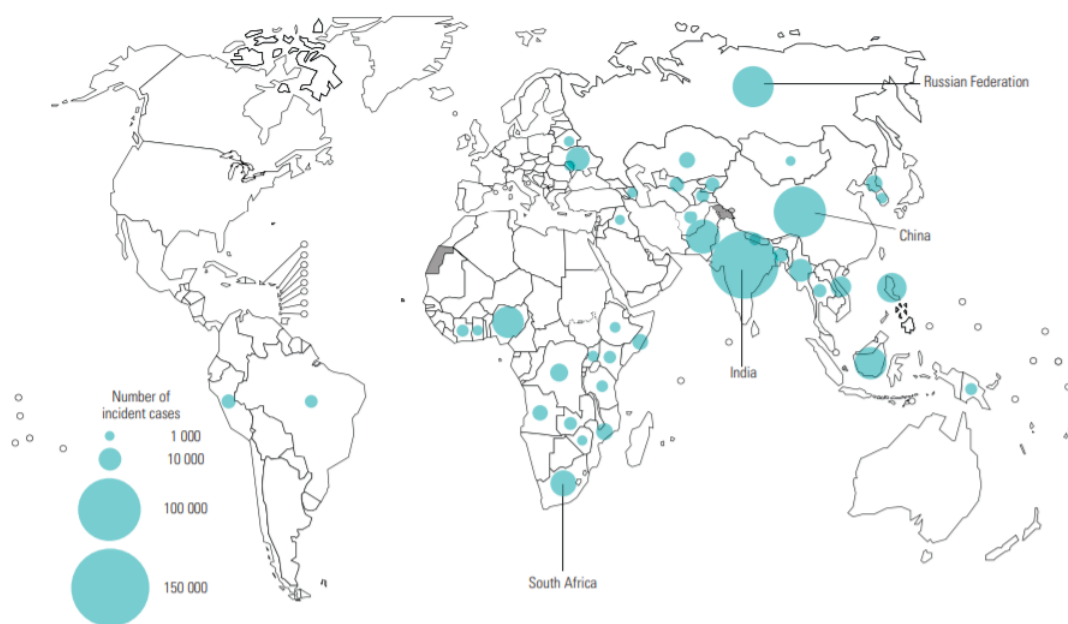
Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Teoretická časť | 9 |
| 2.1. Tuberkulóza | 9 |
| 2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 9 |
| 2.2.1. Mykolové kyseliny | 10 |
| 2.3. Patológia | 11 |
| 2.4. Klinický obraz..... | 12 |
| 2.5. Diagnostika | 12 |
| 2.6. Farmakoterapia | 14 |
| 2.6.1. Terapia všeobecne | 14 |
| 2.6.2. Rezistencia na antituberkulotiká..... | 16 |
| 2.6.3. Prevencia | 17 |
| 2.7. Antituberkulotiká prvej línie..... | 17 |
| 2.7.1. Isoniazid | 17 |
| 2.7.2. Rifampicín | 18 |
| 2.7.3. Ethambutol | 18 |
| 2.7.4. Pyrazínamid | 19 |
| 2.7.5. Streptomycín..... | 19 |
| 2.8. Nové potenciálne inhibítory enoyl-acyl carrier proteín reductázy (InhA) | 20 |
| 2.8.1. Triklosan..... | 21 |
| 2.8.2. Krátky prehľad významných antimykobakteriálných derivátov triklosanu ... | 23 |
| 3. Cieľ práce | 29 |
| 4. Metodická časť | 30 |
| 4.1. Použité chemikálie, prístroje a analytické metódy | 30 |
| 4.2. Príprava reaktantov | 32 |
| 4.2.1. <i>O,N</i> -acetylácia | 32 |
| 4.2.2. Chlorácia..... | 32 |
| 4.3. Postupy syntéz | 35 |
| 4.3.1. Postup prípravy karboxylových esterov – metóda č. 1..... | 35 |
| 4.3.2. Postup prípravy karboxylových esterov – metóda č. 2 (Steglichova esterifikácia)..... | 39 |
| 4.3.3. Postup prípravy esterov sulfónových kyselín..... | 42 |
| 5. Výsledky a diskusia..... | 46 |
| 5.1. Chémia | 46 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 5.2. Biologické hodnotenie | 48 |
| 6. Záver..... | 50 |
| 7. Zoznam obrázkov..... | 51 |
| 8. Zoznam tabuliek..... | 52 |
| 9. Bibliografia..... | 53 |

1. Úvod

Tuberkulóza je infekčné ochorenie, ktoré je jednou z vedúcich príčin úmrtí celosvetovo, a to i cez prítomnosť efektívnej terapie. Závažnosť tuberkulózy tkvie v jej chronicke, v zdĺhavej liečbe, v nedostatočnej prevencii v rozvojových krajinách a v rýchlym vývoji rezistentných kmeňov. Medzi oblasti najviac postihnuté týmto ochorením patria krajiny juhovýchodnej Ázie či južnej Afriky a západného Pacifiku a až 95 % prípadov celosvetovo pripadá na rozvojové krajiny týchto oblastí. Vyššiu náchylnosť k manifestnému priebehu majú pacienti s oslabenou imunitou, obzvlášť pacienti infikovaní HIV. Jedným z významných epidemiologických problémov, s ktorými sa v rámci tohto ochorenia stretávame, je rozvoj rezistencie na užívané antituberkulotiká, z toho je významný rozvoj multirezistentných kmeňov. Incidencia rezistentných prípadov má v súčasnosti rastúci charakter. Tento faktor je doplnený problematickým nachádzaním nových účinných látok ako dôsledok mikrobiologicko-patologických špecifik pôvodcu ochorenia – bakteriálneho komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. (1)



Obrázok 1: Odhadovaný počet výskytu multirezistentných prípadov tuberkulózy v krajinách, kde je tento výskyt nad 1000 prípadov za rok 2019 (1)

Pre udržanie klesajúcej tendencie počtu pacientov s tuberkulózou je, okrem iného, potreba stále hľadať a vyvíjať nové antimykobakteriálne liečivá, či už objavovaním nových štruktúr, modifikáciou už známych štruktúr, ale taktiež vývojom nových špecifických liekových foriem.

2. Teoretická časť

2.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekčné ochorenie spôsobené *Mycobacterium tuberculosis* komplexom, kam zaradujeme baktérie *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* a ďalšie. (2) Okrem toho, že všetky spôsobujú tuberkulózu, ich spája i extrémne podobný genóm a jednotliví zástupcovia sa v určitých medziach líšia svojou bunkovou štruktúrou, spôsobom prenosu či virulenciou. (2) (3) Patogény najčastejšie postihujú pľúca, môžu ale v zásade napadať ktorúkoľvek inú orgánovú sústavu, od gastrointestinálneho traktu až po centrálnu nervovú sústavu. Každoročne sa týmito baktériami nakazí asi 5-7 miliónov ľudí (7,1 mil. za rok 2019). Ochorenie patrí medzi prvých desať príčin smrti celosvetovo a je vedúcou príčinou smrti ako dôsledok nákazy infekčným agens. Oblasti s najčastejším výskytom tuberkulózy nachádzame predovšetkým na juhovýchode Ázie, ďalej na juhu Afriky či v západnom Pacifiku. Za rok 2020 sa predpokladá zníženie množstva detegovaných a liečených prípadov tuberkulózy a teda nárast úmrtí z tejto príčiny, a to v dôsledku COVID-19 pandémie a zvýšenej vyťaženia zdravotníckych zariadení a relokácie finančných zdrojov v prospech pandémie. (1)

2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Ide o najčastejšieho pôvodcu tuberkulózy z komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Baktéria bola prvý krát popísaná v roku 1882 Robertom Kochom. Zaradujeme ju medzi obligátne aeróbne acidorezistentné intracelulárne tyčky. Ako acidorezistenciu označujeme obťažnosť farbitelnosti baktérie organickými farbivami za laboratórnej teploty ako je fuchsín a následnú neschopnosť odfarbenia kyslým alkoholom. Baktéria sa síce stavbou svojej bunkovej steny radí medzi gram-pozitívne baktérie, avšak vyznačuje sa nízkou odozvou pri Gramovom farbení (označované aj ako „gram-neutral“ alebo „gram-ghost“ bunky (4)), čo je dané predovšetkým prítomnosťou lipidov vo vonkajšej vrstve bunkovej steny mykobaktérií, z toho farmaceuticky významných mykolových kyselín, ktoré významne znižujú permeabilitu bunkovej steny. (5)

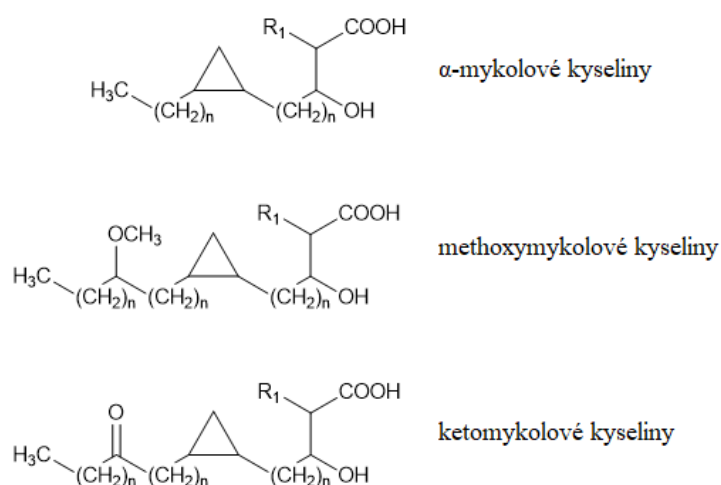
Farbiť je možno technikou podľa Ziehl-Neelsena, ide o klasickú techniku pre acidorezistentné tyčky a jednu z najpoužívanejších metód v diagnostike tuberkulózy. Princípom je farbenie karbofuchsínom pri zvýšenej teplote za vzniku komplexu s membránovými štruktúrami baktérie, farbivo je následne, na rozdiel od klasického Gramova farbenia, neodfarbitelné kyslým alkoholom. Na konci sa preparát kontrastne

dofarbuje metylenovou modrou či malachitovou zeleňou. Výsledkom je červené až ružové zafarbenie tyčiek na modrom, poprípade zelenom pozadí. (5) (6)

Charakteristickou vlastnosťou baktérie je takisto pomalý rast a neobvykle dlhá generačná doba – približne 20-30 hodín, čo komplikuje diagnostiku – kultivácia trvá spravidla i tri až šesť týždňov, za špecifických podmienok zrýchlenou kultiváciou možno dosiahnuť výsledky už behom desať až štrnásť dní. (7)

2.2.1. Mykolové kyseliny

Vyššie spomenuté mykolové kyseliny sú molekuly charakteristické pre *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Ide o mastné kyseliny s vysokým počtom uhlíkov v rozmedzí približne C₆₀₋₉₀ a tvoria dôležitú súčasť stavby bunkovej steny týchto baktérií. Základom štruktúry je výrazne hydrofóbny hlavný reťazec mastnej kyseliny s beta-hydroxyskupinou a s alfa-vedľajším alkylovým reťazcom o dĺžke približne C₂₂₋₂₄. Hlavnými typmi sú alfa-, methoxy- a keto-mykolové kyseliny (Obrázok 2) s najvyšším zastúpením alfa-mykolových kyselín (asi 70 %). Všetky typy obsahujú v hlavnom reťazci cyklopropánový kruh, ktorý vytvára *cis*- a *trans*-izomériu, v baktériách nachádzame oba tieto izoméry. Dôležitou funkciou mykolových kyselín je spolupodieľanie sa na tvorbe hrubej vonkajšej lipofilnej vrstvy bunkovej steny, vďaka čomu je bunka chránená pred pôsobením cudzích chemikálií, pred oxidačným stresom a pred imunitným systémom hostiteľa, v dôsledku čoho môžu baktérie nerušene žiť a replikovať sa vnútri makrofágov, zároveň predstavujú významnú bariéru pre pôsobenie bežných antibiotík, doplnujúcou funkciou je pôsobenie ako štruktúrny komponent. (8) (9) Zásah do syntézy mykolových kyselín je jeden z významných spôsobov mechanizmu účinku niektorých antituberkulotík.



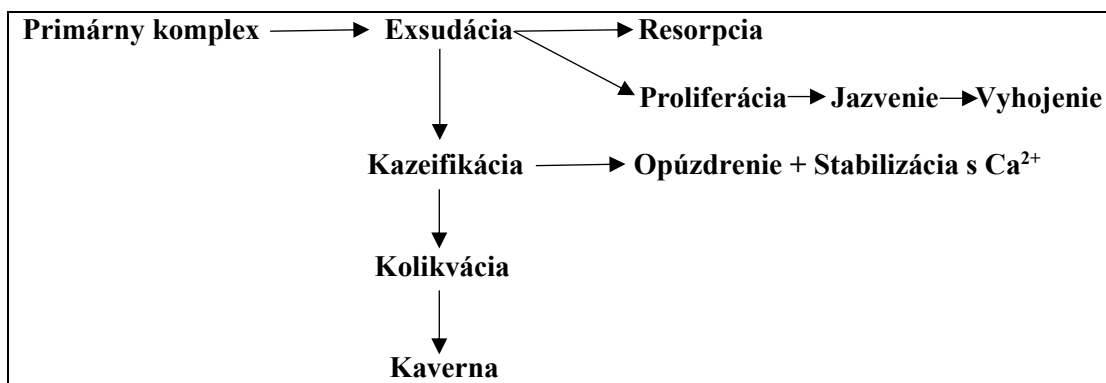
Obrázok 2: Všeobecné štruktúry základných mykolových kyselín

2.3. Patológia

Tuberkulóza je ochorenie vyvolávajúce špecifický (tj. s tvorbou granulómov) zápal v rozličných orgánových systémoch. Cesta prenosu je v 80% kvapôčková. Pôvodca tuberkulózy môže napádať v zásade akýkoľvek orgánový systém, avšak epidemiologicky najčastejšie je napadnutie pľúčne (v ČR prevažujúce) a gastrointestinálne, pokiaľ je napadnutá iná orgánová sústava, býva to infekcia v rámci postprimárnej tuberkulózy. (10)

Vo chvíli prvého prieniku mykobaktérie do organizmu je táto fagocytovaná makrofágmi, kde inhibuje ich funkcie, ktoré by inak viedli k deštrukcii baktérie, a množí sa tam. Vzniká tak lymfadenitída, ktorá v kombinácii s lymfangiitídou a ložiskom zápalu tvorí Ghonov komplex, čo vedie k rozvoju primárnej tuberkulózy. Následný postup ochorenia sa líši a vytvára sa buď latentná forma ochorenia, ktorá je buď asymptomatická (s pozitivitou tuberkulínového testu) alebo sa vyznačuje subfebriliami a nechutenstvom, menej často sa rozvíja forma manifestná, ktorá podlieha dynamickým premenám. (10) (11)

Na počiatku je reakcia nešpecifická, po prieniku do alveolov dochádza k tvorbe serofibrinózneho exsudátu, ktorý obsahuje makrofágy s mykobaktériom vnútri. Exsudát následne podlieha podľa stavu imunity niekoľkým mechanizmom (Obrázok 3). Pokiaľ nedôjde k resorpcii (čo je väčšina prípadov), vzniká špecifické granulačné tkanivo, ktoré sa môže rozpadat' (kolikvovat'), pokiaľ sa táto dutina vyprázdni, vzniká kaverna. (10) (11)



Obrázok 3: Vývoj tuberkulózného procesu

Pri vzniku kaverny sa rozlišujú jej dva typy podľa toho, či je alebo nie je infekčná – to závisí na tom, či je kaverna otvorená (komunikuje s dýchacími cestami) alebo uzatvorená (nekomunikuje s dýchacími cestami). Môže prejsť až do chronickej kaverny (vyhladený, guľovitý útvar tvorený špecifickým granulomatóznym tkanivom vo väzivovom obale, potenciálny zdroj postprimárnej tuberkulózy). (10) (11)

Po primárnej tuberkulóze, vo chvíli, keď je pod vplyvom imunokompromitovaného stavu pacienta (stres, vek, imunodeficitné stavy – najčastejšie HIV, ďalej podávanie imunosupresív vrátane biologík, rakovina, diabetes mellitus,...) mykobaktérium znova aktivované, vzniká postprimárna tuberkulóza. Ide o opakovaný stret, imunitný systém už teda je senzibilizovaný a imunitná reakcia prebieha ďaleko búrlivejšie, čo koreluje s možnými patologicko-anatomickými nálezmi. V rámci postprimárnej tuberkulózy bývajú častejšie napádané vzdialené orgány a infekcia sa môže šíriť hematogénne či lymfatogénne za vzniku izolovanej tuberkulózy alebo vážnejšej miliárnej diseminovanej formy. (10) (11)

2.4. Klinický obraz

Príznaky infekcie závisia na štádiu, v ktorom sa ochorenie práve nachádza. Primárna infekcia môže byť asymptomatická, poprípade sa u detí môže vyskytnúť zvýšená teplota či nechutenstvo, predovšetkým pokiaľ je imunitný systém oslabený. U postprimárnej infekcie je klinický obraz širší, od asymptomatického priebehu až po hemoptýzu. Charakteristické sú nešpecifické príznaky podobné chrípke: výrazná únava, nechutenstvo až chudnutie, slabosť, v neskorších štádiách sa rozvíja kašeľ, najprv suchý, následne produktívny, typickým príznakom konečných štádií je hemoptýza. (7) (12)

Ako latentnú formu tuberkulózy označujeme asymptomatické štádium medzi primárnou a postprimárnou infekciou, poprípade asymptomatický priebeh primárnej tuberkulózy. V tomto štádiu sa tuberkulóza neprejavuje klinicky, vyznačuje sa pozitívnym tuberkulínovým testom či INF- γ testom (viď kap. 2.5). Pacienti v latentnom štádiu nie sú infekční. V aktívnu (postprimárnu) tuberkulózu sa forma latentná rozvinie asi u 10 % nositeľov. (7) (12)

2.5. Diagnostika

Diagnostické vyšetrenie zahŕňa odobranie anamnézy a fyzikálne vyšetrenie, zobrazovacie metódy so zameraním na skiagrafické vyšetrenie a mikrobiologické a imunologické testy. Anamnestické a fyzikálne vyšetrenie vytvárajú iba podozrenie na infekciu, toto podozrenie podporujeme mikroskopickými a zobrazovacími metódami (v tomto štádiu zahajujeme i terapiu), definitívne diagnózu potvrdzujeme kultivačným a skiagrafickým vyšetrením. (7)

- Mikrobiologické a imunologické vyšetrenie
 - Mikroskopické vyšetrenie

Vyšetrované je opakovane spútum, cielenie tiež aspirát, ktorý sa získava výplachom bronchov, poprípade tekutina získaná bronchoalveolárnou lavážou. Ďalej možno vyšetrovať mozgomiešny mok alebo iné telesné tekutiny podľa príznakov. Využívané je farbenie podľa Ziehl-Neelsna, pričom prítomnosť acidorezistentných tyčiek možno preukázať už behom niekoľkých hodín. Pozitívny výsledok ale jednoznačne neznamená prítomnosť životaschopných tyčiek, metóda taktiež neumožňuje identifikovať kmeň mykobaktéria. Alternatívou je fluorescenčná mikroskopia, ktorá sa vyznačuje vyššou citlivosťou, ale i vyššou finančnou náročnosťou. (12) (13)
 - Kultivačné vyšetrenie

Považuje sa za zlatý štandard laboratórnej diagnostiky tuberkulózy, keďže umožňuje okrem identifikácie kmeňa i zistenie citlivosti k antituberkulotikám. Testovaný materiál je rovnaký ako pri mikroskopických vyšetreniach. Využíva sa viacero kultivačných médií (Šulova, Löwenstein-Jensen, Middlebrook), pričom pre dlhú generačnú dobu sú kolónie hodnotené postupne po 3, 6 a 9 týždňoch. V prípade pozitívneho nálezu sú vykonávané identifikačné testy a stanovuje sa citlivosť na antituberkulotiká. Ako pozitívny nález sa označuje prítomnosť aspoň 10^2 mykobaktérií na 1 ml vzorky. (7) (13)
 - IGRA metódy (Interferon Gama Release Assay)

Sleduje sa produkcia interferónu γ T-lymfocytmi z odobratej krvi pacienta po vystavení špecifickým antigénom, pričom produkciou INF- γ sa vyznačujú T-lymfocyty, ktoré prišli do kontaktu s *MTb* v tele pacienta. Najčastejšie užívaný je test QuantiFERON[®]-TB Gold, slúžiaci na detekciu latentnej formy tuberkulózy (avšak nerozlišuje medzi aktívnou a latentnou formou). (7)
 - Molekulárne-genetické techniky

Využíva sa metóda polymerázovej reťazovej reakcie – PCR. Ide o metódy rýchle, avšak nedostatočne štandardizované, naviac hrozí riziko kontaminácie a falošne pozitívneho výsledku. Metóda je ale vhodná pre rozlíšenie druhu mykobaktéria. (7)

- Skiagrafia

Skiagrafické vyšetrenie patrí medzi základné užívané metódy pri diagnostike tuberkulózy i cez svoju nízku špecifickosť, keďže u negatívneho výsledku možno vylúčiť pľúcnu tuberkulózu, naopak, pozitívny nález spolu s mikroskopickým nálezom výrazne zvyšujú podozrenie na prítomnosť ochorenia a sú dostačujúcim podnetom pre zahájenie terapie. Charakteristické sú nálezy v dorzálnom a apikálnom segmente horného laloku alebo v apikálnom segmente dolného laloku pľúc, pre upresnenie nálezu slúži HRCT hrudníka (high-resolution CT). (7)

- Tuberkulínový kožný test

Princípom je aplikácia tuberkulínu (očistený proteín mykobaktérií) do kože vpichnutím injekčnou ihlou. Tuberkulín u osôb, u ktorých už došlo k stretu imunitného systému s mykobaktériami, spôsobí reakciu senzibilizovaných T-lymfocytov a behom niekoľkých hodín po vpichu dochádza k alergickej reakcii oneskoreného typu. V prípade osôb, ktoré neprišli do stretu s mykobaktériami, nedochádza k žiadnej reakcii. Pozitívnu tuberkulínovou reakciou sa vyznačujú i osoby očkované BCG vakcínou. (12)

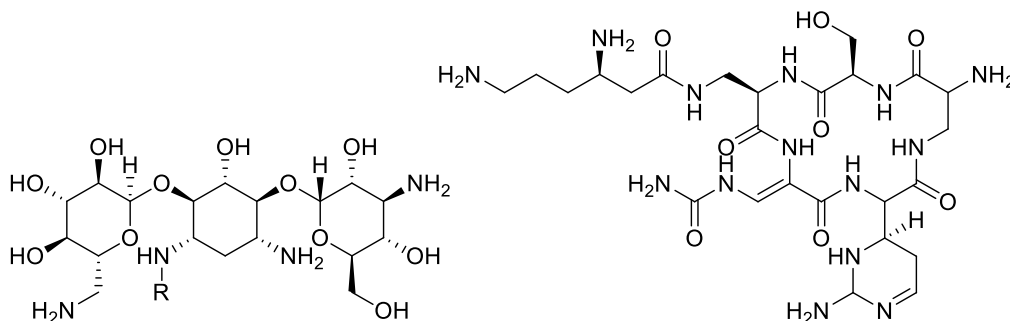
2.6. Farmakoterapia

2.6.1. Terapia všeobecne

Tuberkulóza je ochorenie dnes liečiteľné, avšak terapia je náročná a zdĺhavá. Klasická medikácia pozostáva zo štvorkombinácie liečiv isoniazid, rifampicín, pyrazinamid a ethambutol podávaných po dobu dvoch mesiacov (iniciačná fáza), to je nasledované štvormesačnou terapiou isoniazidom a rifampicínom (pokračovacia fáza), pričom terapia nad šesť mesiacov sa neodporúča z dôvodu nepreukázanej úspešnosti. Táto schéma je platná pre plne citlivé kmene, u rezistentných kmeňov sa kombinácie líšia podľa typu rezistencie, s využitím liečiv druhej línie. (1) WHO zaradzuje k liečivám prvej línie okrem štyroch vyššie vymenovaných i parenterálne podávaný streptomycín. (14)

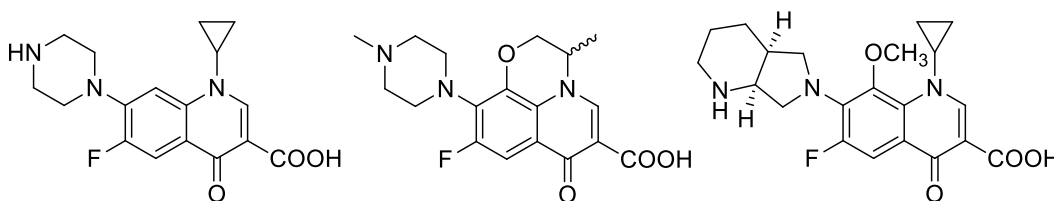
K antituberkulotikám druhej línie zaradzujeme: (14):

- Parenterálne aminoglykosidy a polypeptidy: kanamycín, amikacín, kapreomycín (Obrázok 4)



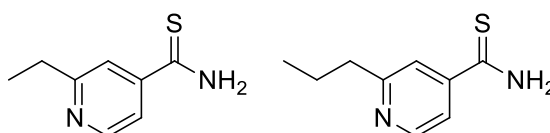
Obrázok 4: Vľavo: R = H... kanamycín A; R = (S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl... amikacín; Vpravo: kapreomycín

- Fluorochinolóny: ciprofloxacín, ofloxacín, levofloxacín (*S*-izomér ofloxacínu), moxifloxacín (Obrázok 5)



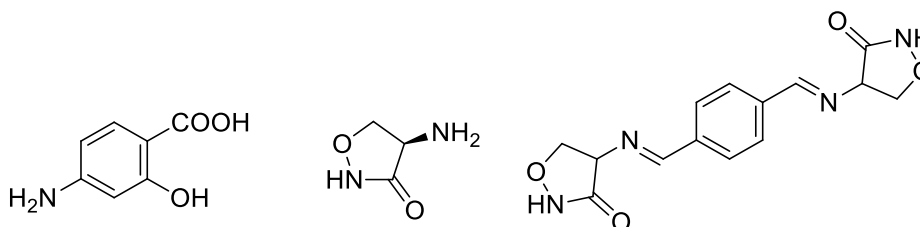
Obrázok 5: Zľava: ciprofloxacín, ofloxacín, moxifloxacín

- Thionamidy: ethionamid, prothionamid (Obrázok 6)



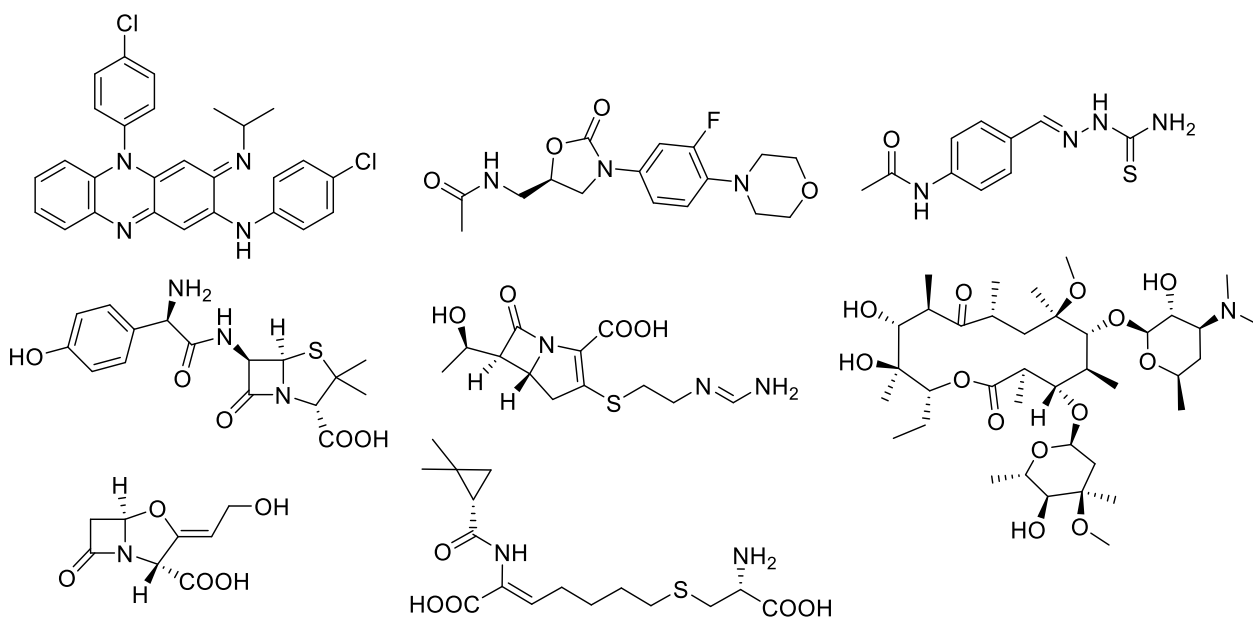
Obrázok 6: Zľava: ethionamid, prothionamid

- Iné: *para*-aminosalicylová kyselina, cykloserín, terizidon (Obrázok 7)



Obrázok 7: Zľava: *para*-aminosalicylová kyselina, cykloserin, terizidon

- Látky s nejasným účinkom na tuberkulózu: klofazimin, linezolid, amoxicilin/klavulanát, thioacetazon, imipenem/cilastatin, klaritromycín (Obrázok 8)



Obrázok 8: Zľava zhora: klofazimin, linezolid, thioacetazon, amoxicilin, imipenem, klaritromycin, klavulanová kyselina, cilastatin

2.6.2. Rezistencia na antituberkulotiká

Problémom dnešnej terapie je zvyšujúce sa množstvo rezistentných mutantných kmeňov *MTb* – podľa WHO až 50 % nových prípadov ročne, ktoré nereagujú na klasickú liečbu. Najčastejšou príčinou vzniku rezistencie je neadekvátna terapia tuberkulózy – nevhodný dávkovací režim, prerušovaná terapia, predčasne ukončená terapia a iné. (1)

Na základe počtu a typu liečiv, voči ktorým je baktéria rezistentná, rozlišuje WHO (1):

- Monorezistenciu: kmeň *MTb* je rezistentný iba na jedno liečivo zo skupiny antituberkulotík,
- Polyrezistenciu: kmeň *MTb* je odolný voči dvom a viac antituberkulotikám okrem izoniazidu a rifampicínu,
- Multirezistenciu: kmeň *MTb* vykazuje rezistenciu na rifampicín a zároveň izoniazid (a teda dve najúčinnšie dostupné antituberkulotiká),
- Extenzívnu multirezistenciu: nastáva vtedy, keď je kmeň rezistentný nie len na rifampicín a izoniazid, ale aj na akékoľvek fluorochinolonové antibiotikum a zároveň na aspoň jedno z troch parenterálnych antibiotík (kanamycin, amikacin, kapreomycin), výskyt tohto typu rezistencie zo všetkého počtu ochorení je asi 4-19 %.

2.6.3. Prevencia

Predpokladom pre účinnú prevenciu je zníženie progresie ochorenia u už infikovaných pacientov, kvalitnejšie diagnostické testy, efektívnejšia terapia pre infikovaných, skrining kontaktov a vysoko rizikových osôb a rozvoj vakcíny. (1) V súčasnosti máme k dispozícii dve špecifické možnosti prevencie ochorenia: preventívne podávanie antituberkulotík a podanie vakcíny:

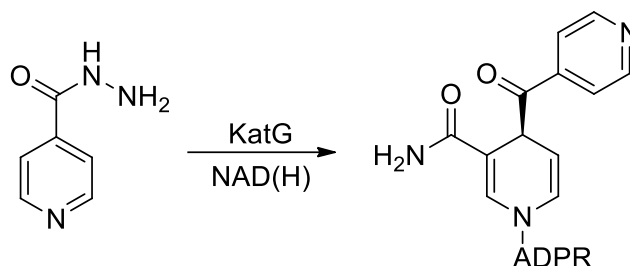
- Preventívne podávanie antituberkulotík: preventívna terapia je zahajovaná najčastejšie u pacientov infikovaných HIV a u osôb bývajúcich v jednej domácnosti s infikovanými, ale predovšetkým u pacientov s preukázanou latentnou formou tuberkulózy. Odporúčaným režimom je podávanie dvojkombinácie rifampicínu a izoniazidu po dobu troch mesiacov v týždenných intervaloch alebo dvojkombinácia rifapentinu a izoniazidu tri mesiace v denných intervaloch alebo rifampicín po dobu štyroch mesiacov s denným intervalom. (1) (15)
- Vakcína: jedinou schválenou vakcínou je Bacillus Calmette-Guérin vakcína (BCG vakcína) a je účinná iba v prevencii ťažkých foriem tuberkulózy u detí a mimoplúcnych foriem tuberkulózy. WHO odporúča jej podávanie v rizikových oblastiach všetkým novorodencom čo najskôr po narodení. Nie je k dispozícii žiadna schválená vakcína efektívna v prevencii pľúcnej tuberkulózy u dospelých. V Českej republike sa očkujú selektívne iba rizikovní novorodenci. (1) (12)

2.7. Antituberkulotiká prvej línie

2.7.1. Isoniazid

Isoniazid je liečivo užívané v terapii tuberkulózy už od počiatku 50. rokov a stále sa zaradzuje medzi najvýznamnejšie liečivá pri liečbe tuberkulózy. Štruktúrne ide o hydrazid kyseliny izonikotínovej. Liečivo svojim mechanizmom účinku spadá do skupiny inhibítorov enoyl-acyl carrier protein reduktázy (InhA), na bunku pôsobí baktericídne. Ide o proliečivo, aby mohlo účinkovať, musí byť po vstupe do bunky mykobaktéria aktivované katalázo-peroxidovým enzýmom (KatG). Vzniká tak jeho aktívna forma – izonikotínový acylový radikál, ktorý následne interaguje s NADH kofaktorom pripojeným v aktívnom mieste InhA, tvoriac kovalentnú väzbu (Obrázok 9). V dôsledku tejto interakcie dochádza k narušeniu funkcie proteínu InhA a zásahu do syntézy mastných kyselín, okrem iného aj mykolových kyselín. Mechanizmus vzniku rezistencie spočíva najmä v mutácii bakteriálnej KatG, čím nedochádza k aktivácii proliečiva v bunke baktérie. Pre túto relatívne častú mutáciu sú vo výskume látky, ktoré by pôsobili inhibične na InhA, ale nemuseli byť

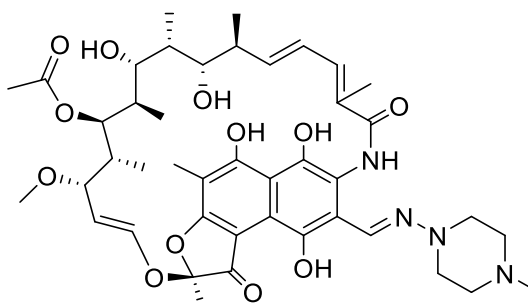
aktivované prostredníctvom KatG, kam patria jednak deriváty izoniazidu, ale i látky s úplne odlišnou štruktúrou. (16) (17)



Obrázok 9: Štruktúra izoniazidu a jeho premena na aktívnu formu pomocou KatG

2.7.2. Rifampicín

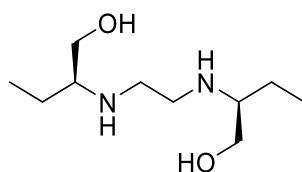
Rifampicín, štruktúrne lipofilný ansamycín (Obrázok 10), je jedno z ďalších významných antituberkulotík s bakteriostatickým až baktericídnym účinkom nie len na mykobaktériá tuberkulózy, ale i na atypické mykobaktériá a mykobaktériá lepry. Na trh bol uvedený v roku 1968, vďaka čomu sa významne skrátila dĺžka terapie tuberkulózy. (18) Liečivo sa s vysokou afinitou viaže na β -podjednotku DNA-dependentnej-RNA-polymerázy, čím inhibuje jej funkciu a dochádza tak k bráneniu rastu RNA reťazca. V prípade mutácie dochádza najčastejšie k zmene proteínovej štruktúry RNA-polymerázy. (16)



Obrázok 10: Štruktúra rifampicínu

2.7.3. Ethambutol

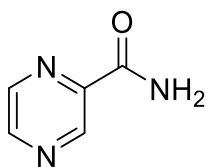
Liečivo ethambutol (Obrázok 11) svojim účinkom, rovnako ako izoniazid, zasahuje do syntézy bunkovej steny, avšak odlišným mechanizmom – inhibuje arabinozyl transferázu, enzým zahrnutý do syntézy arabinogalaktanu, ktorý je dôležitou súčasťou bunkovej steny. Rezistencia sa vyskytuje vo forme zmene štruktúry génu kódujúceho arabinozyl transferázu. (16)



Obrázok 11: Štruktúra ethambutolu

2.7.4. Pyrazínamid

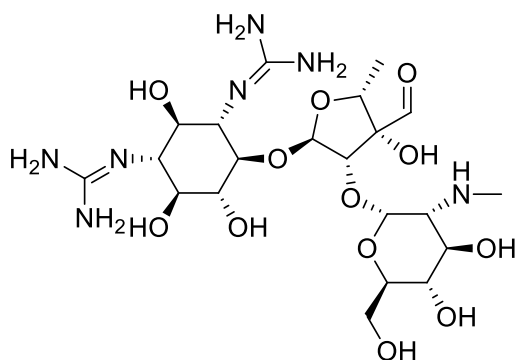
Ide o proliečivo (Obrázok 12), ktoré sa po prechode do mykobaktéria aktivuje pomocou enzýmu pyrazinamidáza/nikotinamidáza a transformuje na svoju aktívnu formu – kyselinu pyrazínovú. Mechanizmus účinku tejto látky nie je plne pochopený. Predpokladala sa acidifikácia vnútorného prostredia, narušenie funkcie membrán a inaktivácia mnohých intracelulárnych mechanizmov, zahŕňajúc inhibíciu funkcie enzýmového komplexu FAS. Takisto sa predpokladalo, že kyslé prostredie je nevyhnutné pre správnu funkciu liečiva, avšak začína sa už ukazovať, že táto hypotéza nemusí byť pravdivá. (19) Ďalej sa predpokladalo, že látka interferuje s metabolizmom acetyl-CoA, či zasahuje do *trans*-translácie, avšak pre obe hypotézy už existujú štúdie, ktoré ich vyvracajú. (20) (21) Napriek „záhade“ jeho mechanizmu účinku sa liek s úspechom používa už od 50. rokov 20. storočia. Naproti jeho mechanizmu účinku je princíp rezistencie známy – najčastejšie ide o mutáciu genetického kódu pre enzým pyrazinamidáza. (16)



Obrázok 12: Štruktúra pyrazínamidu

2.7.5. Streptomycín

Streptomycín je látkou objavenou už v roku 1943 (12) a je prvou používanou látkou proti tuberkulóze. Štruktúrne je zaradzovaná do skupiny aminoglykosidov (Obrázok 13). Funguje na princípe inhibície proteosyntézy väzbou na 30S podjednotku ribozómov mykobaktérií, čoho dôsledkom je narušenie procesu translácie s baktericídnym účinkom. WHO odporúča užívať streptomycín u mimoplúcnych tuberkulóz, a to predovšetkým u tuberkulózneho meningitídy, kde má streptomycín nahrádzať ethambutol v klasickej štvorkombinácii liečiv prvej línie. (14) (16)

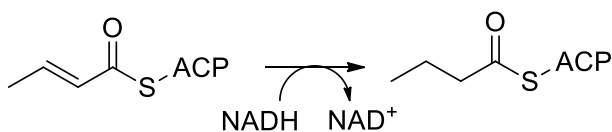


Obrázok 13: Štruktúra streptomycínu

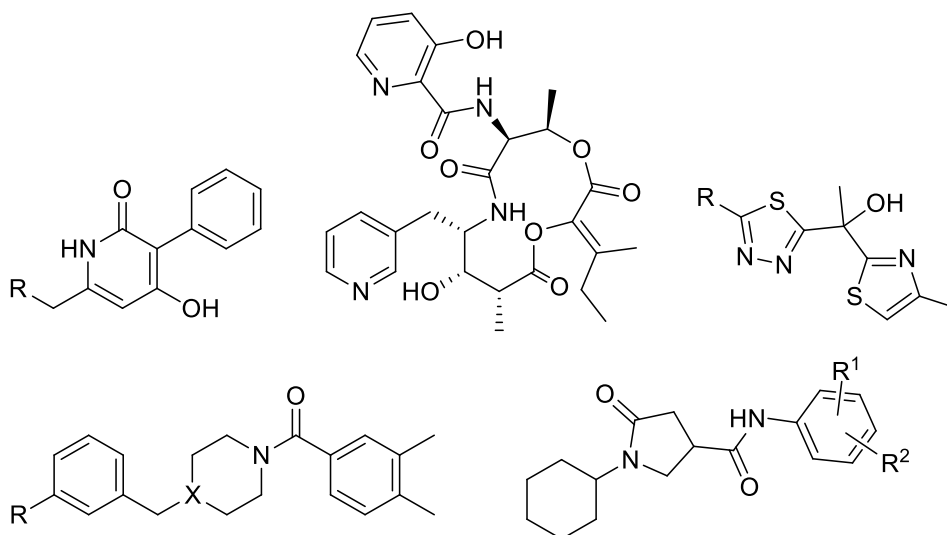
2.8. Nové potenciálne inhibítory enoyl-acyl carrier proteín reduktázy (InhA)

Enzým enoyl-acyl carrier protein reduktáza je súčasťou kľúčového procesu v bunke mykobaktérií – syntézy mastných kyselín z acetyl-CoA, z toho i významných mykolových kyselín. Celá syntéza je zabezpečená enzýmovým komplexom fatty acid synthase – FAS, pričom rozlišujeme jeho dve triedy: FAS I a FAS II. FAS I sa podieľa na iniciačných krokoch syntézy, ktorá je potom dokončená druhou triedou – FAS II. Táto trieda je charakteristická iba pre bakteriálne bunky, vďaka čomu sa enzýmy zahrnuté do tohoto systému stávajú potenciálnym cieľom pre antibiotiká. (8)

Enoyl-acyl carrier protein reduktáza (Obrázok 14) je práve jeden z enzýmov zahrnutých do triedy FAS II. Ide o proteín typický pre rod *Mycobacterium spp.* (u mykobaktérií označovaný ako InhA). Cielene ho inhibuje už vyššie spomenutý izoniazid, ktorý je aktivovaný pomocou KatG. Medzi ďalšie známe inhibítory enzýmu InhA patria deriváty 4-hydroxy-2-pyridonu, ďalej pyridomycín, 1,3,4-thiadiazoly, arylamidy, deriváty pyrrolidín-karboxamidu a taktiež triklosan (Obrázok 15). (22) (23)



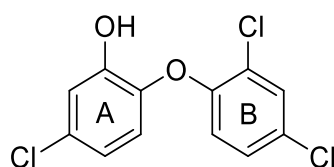
Obrázok 14: Schematické znázornenie reakcie katalyzovanej InhA



Obrázok 15: Zľava zhora: zákl. štr. der. 4-hydroxy-2-pyridonu, pyridomycín, zákl. štr. der. thiazolozolov, arylamidov (X = C, N), pyrrolidín-karboxamidov

2.8.1. Triklosan

Triklosan, štruktúrne 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol (Obrázok 16), je derivát diaryléteru, neionická lipofilná molekula s $\log P = 4,76$. Používa už od 60. rokov 20. storočia ako antibakteriálna prísada do produktov pre osobnú hygienu, ako sú dezinfekčné prípravky, mydlá, zubné pasty, deodoranty a pod. Nachádzame ho tam v 0,1-0,3% koncentráciách. Využíva sa pre svoju relatívne širokú antimikrobiálnu aktivitu, cieľiac primárne na narušenie vnútorného prostredia baktérií zásahom do syntézy RNA a iných makromolekúl, s účinkom prevažne na gram-pozitívne baktérie, ako je MRSA, zistený bol efekt i na gram-negatívnu tyčku *Escherichia coli*. (24) (25)



Obrázok 16: Štruktúra triklosanu

2.8.1.1. Toxicita triklosanu a rozvoj rezistencie

TCS je látka, ktorá bola predovšetkým koncom minulého storočia extenzívne užívaná. Pre jej lipofilný charakter ale začali vznikáť obavy o ľudské zdravie a o kumuláciu tejto látky v životnom prostredí. Bola zistená absorpcia TCS cez kožu a orálnu mukózu a jeho prítomnosť v ľudskej krvi, moči, amniotickej tekutine a v materskom mlieku. V dôsledku používania TCS v prípravkoch osobnej hygieny boli stopy tejto látky a obzvlášť jeho metabolických produktov detegované v životnom prostredí. (26)

V rámci systémovej expozície triklosanu existuje podozrenie na to, že TCS pôsobí ako endokrinný disruptor, predovšetkým s účinkami na reprodukčný systém. Niekoľko štúdií poukazuje na estrogénny a mierny antiandrogénny účinok triklosanu u vodných druhov a u cicavcov. I keď už existujú dáta o negatívnom účinku TCS na ľudský reprodukčný systém, množstvo informácií a ich kvalita nie je dostačujúca pre vyvodenie jednoznačného záveru a je potrebný ďalší výskum, ktorý by potvrdil alebo vyvrátil túto hypotézu. (27)

Bezpečnosť triklosanu sa prehodnocuje i z hľadiska jeho hepatotoxicity. Existuje podozrenie, že TCS narúša metabolizmus hepatálnych buniek a vedie k tvorbe kyslíkových radikálov a oxidačného stresu závislého na dávke TCS. Poškodenie hepatocytov môže byť vyššie v prípade súčasného podania inhibítorov glukuronyltransferázy alebo sulfotransferázy alebo zníženej aktivity určitých izoforiem cytochrómu P450, ktoré sa zúčastňujú metabolizácie TCS (CYP1A2, 2B6, 2C19 a ďalšie). Narušená funkcia hepatocytov a ich metabolických procesov teda môže smerovať ku kumulácii TCS a jeho zvýšenému toxickému účinku na pečňové bunky. (28) (29)

Jednou z potenciálnych nevýhod širokého užívania TCS a iných antimikrobiálnych látok je rozvoj bakteriálnej rezistencie. Mechanizmus rozvoja rezistencie voči triklosanu poznáme vďaka *in vitro* štúdiám. Ide najmä o štrukturálne zmeny cieľových proteínov ako následok mutácie príslušných génov, ďalej štrukturálne zmeny bukovej steny či rozvoj efluxných mechanizmov, ktoré vypudzujú triklosan von z buniek baktérií. (30)

Berúc to úvahy jednak faktor rozvoja rezistencie, ale i potenciálne zdravotné riziko a biokumuláciu, sa postupne znižuje užívanie TCS a vytvárajú sa reštrikcie na úrovni regulačných autorít v možnostiach jeho použitia v biocídnych prípravkoch pre osobnú hygienu. (26) Európska komisia zakázala triklosan pre toto použitie v Európskej únii v roku 2017. (31)

Napriek týmto relatívne negatívnym vyhlídkam pre triklosan je nutné podotknúť, že väčšina poznatkov o jeho nepriaznivých vlastnostiach pochádza z *in vitro* štúdií a štúdie *in vivo* na cicavcoch zatiaľ neponúkli výsledky dostačujúce pre vyvodenie jednotného záveru. Preto ako potenciálne antibiotikum nemožno triklosan úplne zavrhnúť, naopak, obmedzenie jeho používania môže znížiť mieru vzrastu rezistencie voči nemu, čo je v dnešnej dobe, kde je problém s rastom kmeňov baktérií odolných voči bežne používaným antibiotikám, pozitívnou skutočnosťou.

2.8.1.2. Mechanizmus účinku

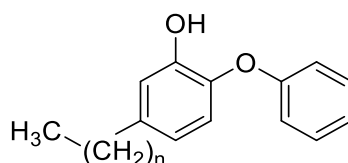
U TCS je preukázaný inhibičný účinok na enoyl-acyl carrier protein reductázu (ENR) u viacerých mikroorganizmov, príkladom sú *Escherichia coli*, *Plasmodium falciparum*, *Pseudomonas aeruginosa* a taktiež *Mycobacterium smegmatis*. (25) Vzhľadom k štruktúrnej podobnosti tohto enzýmu u *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* sa predpokladala účinnosť TCS i na *MTb*. Táto hypotéza už bola preukázaná, ukazujúc, že TCS sa viaže na NAD⁺ komplex, ktorý je súčasťou cieľného enzýmu – ENR, u *MTb* označovaného ako InhA, čím ho nekompetetívne inhibuje. Oproti izoniazidu má tú výhodu, že nejde o proliečivo, ale priamo účinnú látku, ktorá nevyžaduje aktiváciu v bunke pomocou enzýmu KatG. (32)

Vzhľadom k tejto vlastnosti existuje veľký potenciál v možných derivátoch triklosanu s vyšším prienikom do buniek mikroorganizmov a s vyšším antimikróbny účinkom, pričom už máme k dispozícii efektívne deriváty tejto molekuly, v ktorých vždy ostáva zachovaná kostra 2-(fenoxy)fenolu. Odstránenie hydroxylovej skupiny sa ukazuje ako nevýhodné, pravdepodobne ide o dôležitý komponent v rámci interakcie s enzýmom InhA a dopĺňujúcou výhodou je zachovanie určitej hydrofilie tejto pomerne lipofilnej látky. (25)

2.8.2. Krátky prehľad významných antimykobakteriálnych derivátov triklosanu

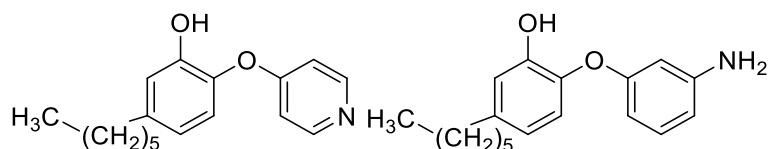
2.8.2.1. Des-chlor-triklosanové deriváty

Výskum analógov TCS priniesol viacero skupín derivátov; prvou sú des-chlor-triklosanové deriváty, kde sú odstránené atómy chlóru a do polohy *meta* na kruhu A (poloha č. 5) sa pridávajú substituenty rôzneho, objemnejšieho charakteru. Takto boli pripravené látky účinnejšie ako TCS, významným príkladom sú deriváty, kde bol v polohe *meta* nahradený chlór hexylom a oktylom (Obrázok 17). Vyznačovali sa vyššou afinitu a schopnosťou inhibície InhA oproti TCS, takisto sa preukázal *in vitro* a *in vivo* inhibičný potenciál na rast mykobaktérií i v prípade intracelulárneho pôsobenia v makrofágoch. Obe molekuly boli účinné i v inhibícii rastu izoniazid-rezistentných kmeňov *MTb*. Experimentálne zistenou nevýhodou bola veľmi nízka biologická dostupnosť, pravdepodobne zapríčinená relatívne nízkou rozpustnosťou oboch molekúl vo vodnom prostredí. (33)



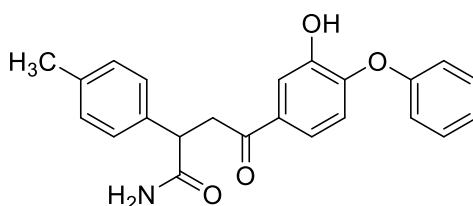
Obrázok 17: n = 5... 2-fenoxy-5-hexylfenol; n = 7... 2-fenoxy-5-oktylfenol

S cieľom vytvoriť rozpustnejšie deriváty boli pripravované štruktúry so zameneným B kruhom za aromatické dusíkaté heterocykly so zachovaným alkylovým reťazcom v polohe 5 kruhu A. Takto boli pripravené dva účinné deriváty (Obrázok 18) s docielením mierne zvýšenej hydrofilie, avšak na úkor účinnosti, ktorá bola mierne znížená oproti obom molekulám vyššie. (34)



Obrázok 18: 5-hexyl-2-(pyridin-4-yloxy)fenol (vľavo); 2-(3-aminofenoxy)-5-hexylfenol (vpravo)

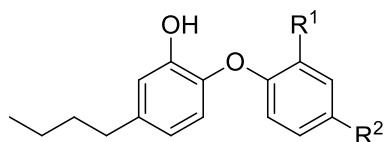
Ďalšiu potenciálnu molekulu v terapii tuberkulózy predstavuje štruktúra na obrázku 19 s rozvinutým substituentom v polohe *meta* A kruhu triklosanu, karboxamidový derivát. Zistila sa u neho minimálna inhibičná koncentrácia porovnateľná s TCS s výhodou vyššej hydrofilie. U tejto štruktúry boli vykonané aj *in vitro* testy, ktoré naznačujú, že látka nevykazuje cytotoxické účinky. (35)



Obrázok 19: 4-(4-fenoxy-3-hydroxyfenyl)-4-oxo-2-(p-tolyl)butánamid

2.8.2.2. Chlor-triklosanové deriváty

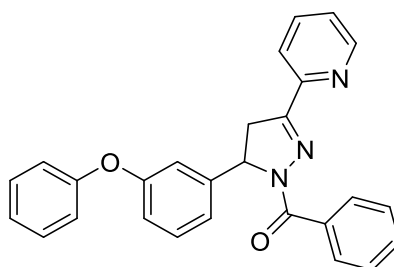
I keď boli objavené nechlorované deriváty, ktoré vykazujú vyššiu účinnosť oproti TCS, zistila sa ešte lepšia IC_{50} voči InhA v prípade ich chlorovaných analógov: konkrétne bol porovnaný derivát s butylom v polohe 5 kruhu A (Obrázok 20) – v prípade derivátu bez chlóru bola nameraná hodnota $IC_{50} = 80$ nmol/l, jeho chlorovaný analóg disponoval hodnotou $IC_{50} = 55$ nmol/l. Pravdepodobne teda atómy chlóru na B kruhu hrajú dôležitú úlohu pri interakcii TCS s cieľovým enzýmom. Menej výhodná je substitúcia rozvetvenými alkylmi, nevhodné sú zvyšky aromatických heterocyklov a fenyl, i keď pridaním uhlíkového mostíku medzi kruh A a fenyl (C_1-C_3), sa zlepšila IC_{50} voči InhA v porovnaní s TCS, pričom ostala zachovaná aj účinnosť u izoniazid-rezistentných kmeňov. (36)



Obrázok 20: $R^{1,2}=H/Cl$

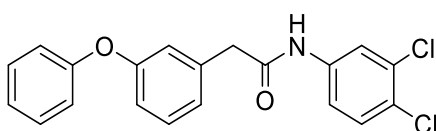
2.8.2.3. Triklosanové deriváty bez hydroxylovej skupiny

V tejto kapitole je vhodné zmieniť derivát, kde okrem hydroxylovej skupiny boli odstránené i atómy chlóru, ostal teda iba základný difenyléterový skelet, kde v polohe 3 kruhu A boli naviazané rôzne päťčlenné heterocykly. Látka s najvyššou mierou účinnosti a s nižšou MIC oproti TCS (2,4 $\mu\text{mol/l}$ vs. 17,4 $\mu\text{mol/l}$) je uvedená na obrázku 21. (37)



Obrázok 21: [5-(3-fenoxyfenyl)-3-(pyridín-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl](fényl)metanon

Významným objavom sú deriváty *N*-aryl/alkyl-2-(3-fenoxyfenyl)acetamidu, s najúčinnjšou syntetizovanou štruktúrou prezentovanou na obrázku 22, nameraná hodnota MIC je rovná 4 $\mu\text{g/ml}$. U tejto látky boli realizované i *in vivo* testy na myšiach infikovaných baktériou *Mycobacterium bovis* – výsledky po 6 týždňoch boli porovnateľné s výsledkami testov myši liečených izoniazidom. (38)



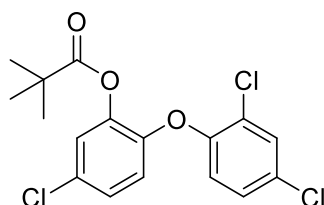
Obrázok 22: *N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-(3-fenoxyfenyl)acetamid

2.8.2.4. Esterové deriváty triklosanu

V dostupnej literatúre môžeme nájsť i prípady syntéz esterov s hydroxylovou skupinou TRC. Väčšina štúdií sa nezaobrá priamo mykobaktériami, ale inými mikroorganizmami, ktoré sú takisto charakteristické prítomnosťou FAS II enzýmového komplexu a enzýmu enoyl-acyl carrier protein reduktázy a existujú u nich dôkazy účinnosti triklosanu na inhibíciu rastu týchto mikroorganizmov.

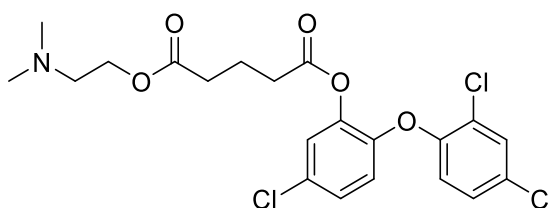
Prvou látkou je ester triklosanu s kyselinou pivalovou (Obrázok 23), ktorého účinnosť bola testovaná u parazita *Toxoplasma gondii*. Po porovnaní IC_{50} toxoplazmovej ENR s MIC

voči tomuto parazitovi sa odhaduje, že daný ester vďaka zvýšenej lipofilii preniká do vnútra bunky vo vyššej miere ako triklosan, v bunke je ďalej hydrolyzovaná esterová väzba a samotný cieľový enzým je inhibovaný triklosanom. Vďaka určitej podobnosti parazitárnej a bakteriálnej ENR môžeme očakávať podobný efekt i u *MTb*, čomu nasvedčuje i fakt, že aj samotný triklosan je efektívny v inhibícii rastu toxoplazmy. (39)



Obrázok 23: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl pivalát

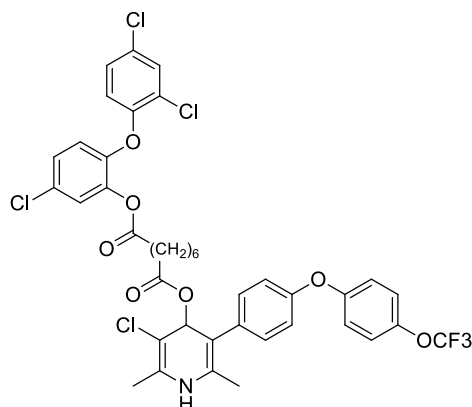
V štúdií *Mishra et al., 2008* (40) môžeme nájsť syntézu ôsmich esterov triklosanu s cieľom vytvoriť proliečiva TCS, cieľiac na parazita *Plasmodium falciparum* a baktériu *Escherichia coli*. Najvýznamnejším získaným proliečivom bol ester *O*-(dimethylaminoethyl)glutárovej kyseliny (Obrázok 24), ktorá inhibovala oba mikroorganizmy v koncentráciách nižších ako východiskový TCS. Zlepšenú aktivitu vykázali i ďalšie štruktúry, ako je ester amidu jantárovej kyseliny, hemiester glutárovej kyseliny a kvartérna amóniová soľ triklosanu príslušná štruktúre na obrázku 24. Po testovaní koncentrácií liečiv vnútri mikroorganizmu a ich aktivity bolo vyhodnotené, že esterifikácia hydroxylovej skupiny TCS zvyšuje prienik proliečiva do vnútra bunky, samotný enzým je potom inhibovaný triklosanom, ktorý vzniká vnútri bunky po hydrolýze esterovej väzby. (40)



Obrázok 24: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl [2-(dimethylamino)ethyl]glutarát

Študované boli i ďalšie deriváty TCS v rámci inhibície rastu *Plasmodium falciparum*. Relatívne zlepšená účinnosť bola pozorovaná u štruktúry konjugovaného triklosanu s látkou označovanou GW844520 (3-chlor-2,6-dimethyl-5-{4-[4-(trifluormethoxy)fenoxy]fenyl}-1,4-dihydropyridín-4-ol) prostredníctvom oktándiovej kyseliny (Obrázok 25), neporovnateľne lepšie vyšiel konjugát triklosanu s atovachonom prostredníctvom

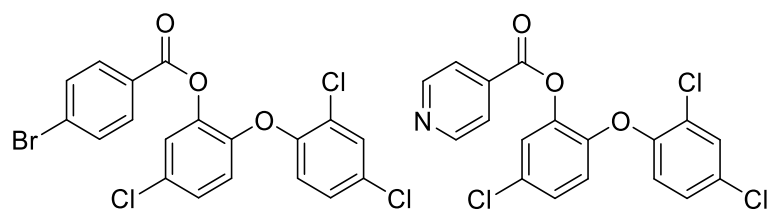
oktándiovej kyseliny, čo ale bolo pripísané predovšetkým dobrej účinnosti atovachonu, ktorý sa užíva v terapii malárie. (41)



Obrázok 25: (3-chloro-2,6-dimethyl-5-{4-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]fenyl}-1,4-dihydropyridín-4-ol)

Dôležitým objavom bola syntéza nanoantibiotík založených na štruktúre triklosanu konjugovaného s molekulami peptidov, ktoré dali vzniku supramolekulárnym hydrogélom. Za spojovací mostík medzi TCS a peptidom bol zvolený monoamid glutárovej kyseliny pripojený k triklosanu esterovo, čo zabezpečilo uvoľnenie účinnej látky v mierne kyslom prostredí. Vďaka takto modifikovanej štruktúre triklosanu sa jednak viac ako 800-násobne zvýšila jeho rozpustnosť vo fyziologickom prostredí, a jednak sa významne zosilnil účinok týchto novo syntetizovaných látok v cieľových baktériách v porovnaní s východiskovým triklosanom, a to jak v gram-pozitívnych, tak v gram-negatívnych baktériách. Samotný efekt triklosanu bol podporený narušením celistvosti bakteriálnej membrány účinkom hydrogélových nanovláken. Extrapoláciou dát z *in vivo* štúdií bola preukázaná adekvátne biokompatibilita hydrogélom s minimálnou toxicitou na zdravé tkanivá. (42)

Esterom triklosanu sa venovali i odborníci z Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. V dizertačnej práci Mgr. Rudolfa Vosátky, Ph.D., (43) môžeme nájsť syntézu 24 esterov triklosanu. *In vitro* výsledky väčšiny syntetizovaných esterov poukázali na aktivitu porovnateľnú s aktivitou TCS. Sledovanie MIC hodnôt bolo zamerané na kmene *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii*. Za zmienku stojí štruktúra 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-brombenzoát (Obrázok 26) s MIC = 16 $\mu\text{mol/l}$ u kmeňa *MTb*, v účinku na izoniazid-rezistentné netuberkulózne kmene (*M. avium*, *M. kansasii*) vynikol ester isonikotínovej kyseliny (Obrázok 26) s MIC = 8 $\mu\text{mol/l}$. (43) (44)



Obrázok 26: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-brombenzoát (vľavo); 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl isonikotinoát (vpravo)

3. Cieľ práce

Cieľom tejto práce bola syntéza látok odvodných od štruktúry triklosanu modifikáciou jeho hydroxylovej skupiny a hodnotenie ich biologickej aktivity u tuberkulózných a atypických mykobakteriálnych kmeňov. Časť práce nadväzuje na predchádzajúcu dizertačnú prácu Mgr. Rudolfa Vosátky, Ph.D., v ktorej bol priestor venovaný syntéze a hodnoteniu antimykobakteriálnej aktivity esterov triklosanu s karboxylovými kyselinami. V našej práci sme sa venovali syntéze esterov podľa vyššie zmienenej práce pre jej doplnenie. (43) Druhá časť práce bola venovaná derivátom sulfonylovým, o ktorých syntéze a antibakteriálnej aktivite ešte nenachádzame žiadnu zmienku v dostupnej literatúre.

Medzi syntetizovanými esterami môžeme nájsť vyššie zmienený ester pivalovej kyseliny, ktorého účinnosť už bola skúmaná u prvoka *Toxoplasma gondii*. (39) V tomto prípade bola snaha o stabilizáciu hydrolyticky pomerne labilnej esterovej väzby objemnými substituentmi na alfa uhlíku. S rovnakým zámerom bolo cieľom pripraviť i ester triklosanu s 2,4,6-trimethylbenzoovou kyselinou. Okrem ochrany pred hydrolyzou sme predpokladali vďaka zvýšenej lipofilie vyšší prienik týchto esterov cez mykobakteriálnu bunkovú stenu a cytoplazmatickú membránu do vnútra bunky.

Pre prípravu esterov sme ďalej vychádzali z kyselín s už známym antimykobakteriálnym účinkom: *para*-aminosalicylová kyselina, *para*-aminobenzoová kyselina (PABA) a (*E*)-4-(4-methoxyfenyl)-4-oxobut-2-enová kyselina Prvá zmienená kyselina patrí do skupiny druhej línie používaných látok na tuberkulózu. (14) U PABA je badaný mierny účinok na atypické mykobakteriálne kmene, konkrétne ide o kmeň *Mycobacterium kansasii*. (25) U tejto látky je ale potreba brať v úvahu i štúdie poukazujúce na jeho možný opačný efekt, a síce znižovanie aktivity niektorých antituberkulotík. (45) Posledná kyselina je takisto predmetom skúmania v rámci jej antimykobakteriálneho účinku, rovnako tak aj jej deriváty. (46) (47)

U sulfonylových esterov sme zvolili pre pilotný screening chloridy troch najčastejšie používaných sulfónových kyselín v organickej syntéze (methansulfonylchlorid, benzénsulfonylchlorid, *p*-toluensulfonylchlorid), Štruktúry odvodené od benzénsulfónovej kyseliny sa už osvedčili pri príprave esterov salicylanilidov. (48)

4. Metodická časť

4.1. Použité chemikálie, prístroje a analytické metódy

Pri syntézach boli použité komerčne dostupné chemikálie a rozpúšťadlá od firiem Merck/Sigma-Aldrich (Darmstadt, Nemecko), VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), ktoré boli ďalej použité bez ďalšieho čistenia, iba *n*-hexán bol purifikovaný destiláciou.

Priebeh všetkých reakcií bol pravidelne monitorovaný pomocou tenkovrstvej chromatografie (TLC). Ako stacionárna fáza boli použité doštičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Ako mobilná fáza bola používaná sústava toluén/ethylacetát v pomere 4:1 (v/v), detekcia bola vykonávaná UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Nemecko) pri vlnových dĺžkach 254 a 366 nm.

Teploty topenia boli stanovené v otvorenej kapiláre v prístroji Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švajčiarsko) a nie sú korigované.

Infračervené spektrá boli zmerané technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge kryštál) spektrofotometrom Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmedzí 650-4000 cm^{-1} . Meranie prebehlo na Katedre organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (pani Iva Vencovská).

NMR spektrá boli zmerané na Katedre organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Merania prebiehali pri laboratórnej teplote na prístrojoch Varian VNMR S500 (500 MHz pre ^1H a 126 MHz pre ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pre ^1H a 151 MHz pre ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Ako rozpúšťadlo boli použité deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6), methanol- d_4 (CD_3OD) a chloroform (CDCl_3). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protónových spektrách sú vzťahnuté k tetramethylsilanu ako vnútornému štandardu, uhlíkové posuny boli stanovené podľa centrálnej línie signálu rozpúšťadla (DMSO- d_6 pri $\delta = 39,5$ ppm, CDCl_3 77,0 ppm, CD_3OD 49,3 ppm) Interakčná konštanta (J) je uvedená v Hz. NMR spektrá boli vyhodnotené pomocou programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španielsko).

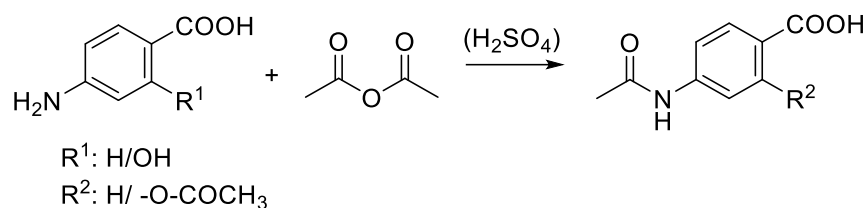
Elementárna analýza (C, H, N) bola vykonaná na prístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Nemecko) na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy Farmaceutickej fakulty University Karlovy. Vypočítané i zmerané hodnoty sú udané v percentách.

Chemické vzorce a reakčné schémy boli vytvorené a chemické názvy boli skontrolované pomocou programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Čistota pripravených zlúčenín bola overená pomocou TLC, NMR spektroskopie, teploty topenia a elementárnej analýzy.

4.2. Príprava reaktantov

4.2.1. *O,N*-acetylácia

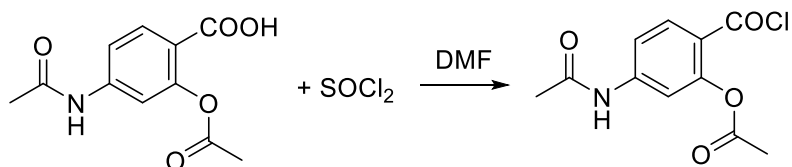


Reakčná schéma 1

5 mmol kyseliny bolo rozpustenej v 25 ml acetanhydridu a následne bolo zahrievané 3 hod pod spätným chladičom k varu, potom bola reakčná zmes miešaná ešte 24 hodín pri izbovej teplote. Vzniknuté kryštály boli odfiltrované, dôkladne premyté vodou, vysušené a charakterizované pomocou teploty topenia, retenčného faktoru a NMR spektier, filtrát bol potom prihustený k ďalšej kryštalizácii na rotačnej vákuovej odparke s následným rovnakým spracovaním a charakterizovaním kryštálov.

Pripravené zlúčeniny: 4-acetamidobenzoová kyselina, 4-acetamido-2-acetoxybenzoová kyselina

4.2.2. Chlorácia

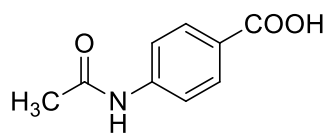


Reakčná schéma 2

1,3 mmol kyseliny (308,4 mg) bolo rozpustenej v 15 ml chloridu thionylu s použitím *N,N*-dimethylformamidu ako katalyzátora a zmes bola ponechaná miešať 2 h pri teplote 70 °C. Následne bol nezreagovaný chlorid thionylu odparený a surový chlorid bol bez ďalšieho čistenia použitý do ďalšej reakcie.

Pripravené zlúčeniny: 4-acetamido-2-acetoxybenzoyl chlorid (Ac-PAS-Cl)

4-Acetamidobenzoová kyselina (Ac-PABA) (49)



Sumárny vzorec: $C_9H_9NO_3$

Molárna hmotnosť: 179,18

Vzhľad: biela kryštalická látka

R_f: 0,64 (ethylacetát:*n*-hexán 4:1)

Teplota topenia: 260-261 °C (lit. 259-260 °C (49))

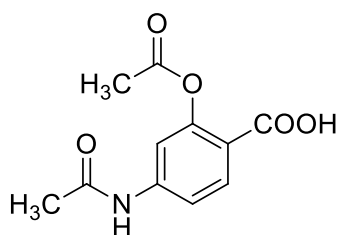
Výtťažok: 54 %

1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.69 (1H, s, COOH), 10.24 (1H, s, NH), 7.89-7.86 (2H, m, H2, H6), 7.70-7.67 (2H, m, H3, H5), 2.07 (3H, s, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 169.37, 167.42, 143.74, 130.80, 125.30, 118.66, 24.51.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 60.33; H, 5.06; N, 7.82, nájdené: C, 60.35; H, 5.01; N, 7.87.

4-Acetamido-2-acetoxybenzoová kyselina (Ac-PAS)



Sumárny vzorec: $C_{11}H_{11}NO_5$

Molárna hmotnosť: 237,21

Vzhľad: biela kryštalická látka

R_f: 0,78 (ethylacetát:*n*-hexán 4:1)

Teplota topenia: 191-192 °C (lit. 193-194 °C (50))

Výtťažok: 30 %

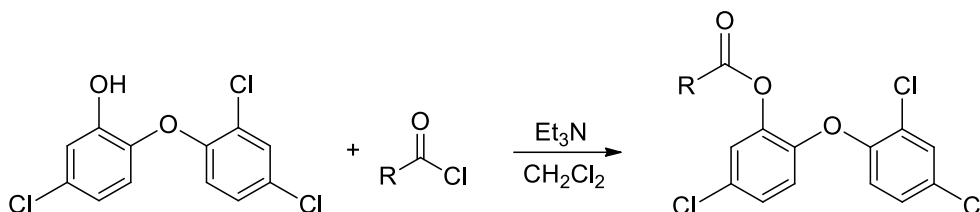
1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.38 (1H, s, COOH), 10.54 (1H, s, NH), 8.00 (1H, d, J = 8.7 Hz, H6), 7.66 (1H, d, J = 2.1 Hz, H3), 7.48 (1H, dd, J = 8.7, 2.1 Hz, H5), 2.30 (3H, s, OCO-CH₃), 2.10 (3H, s, NHCO-CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 169.68, 167.07, 159.38, 152.53, 146.20, 133.59, 116.05, 114.97, 113.60, 24.45, 20.90.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 55.70; H, 4.67; N, 5.90, nájdené: C, 55.72; H, 4.69; N, 5.94.

4.3. Postupy syntéz

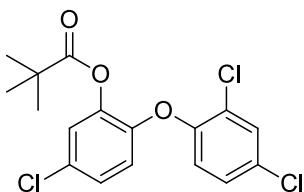
4.3.1. Postup prípravy karboxylových esterov – metóda č. 1



Reakčná schéma 3

1 mmol triklosanu (289,5 mg) a 1,5 ekvivalentu triethylamínu (Et₃N, 209 μ l) boli rozpustené v 5 ml dichlórmetáne. Reakčná zmes sa miešala 5 min za laboratórnej teploty a potom bolo pridané postupne 1,3 ekvivalentu chloridu kyseliny. Reakcia sa ponechala miešať 2 hod (v prípade potreby viac) do kompletnej konverzie na produkt (monitorované pomocou TLC; sústava *n*-hexán/ethylacetát 4:1, v/v). Následne bola reakčná zmes odparená do sucha, pridaný ethylacetát, nerozpustný podiel (Et₃NH⁺Cl⁻) bol odfiltrovaný. Filtrát bol následne vytrepaný s 10% roztokom Na₂CO₃, 0,1M HCl, 5% roztokom NaCl a vysušený státím nad bezvodným Na₂SO₄. Následne bolo sušidlo odfiltrované a filtrát bol privedený ku kryštalizácii, buď prídavkom hexánu alebo odparením časti rozpúšťadla na rotačnej vákuovej odparke, u olejovitých produktov bolo odparené rozpúšťadlo.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl pivalát (tBu-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{17}H_{15}Cl_3O_3$

Molárna hmotnosť: 373,66

Vzhľad: biela kryštalická látka

R_f: 0,86 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: 64-65 °C

Výtťažok: 74 %

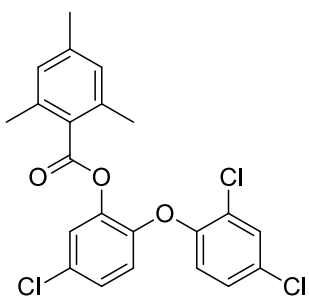
IR: 3100, 2978, 2963, 1752 (C=O), 1489, 1475, 1285, 1266, 1256, 1141, 1116, 1103, 1092, 1077, 1059, 1027, 866, 818, 811 cm^{-1} .

1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.74 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H2), 7.53 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H3'), 7.40 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, H4), 7.36 (1H, dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, H5'), 7.21 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H6'), 6.83 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H5), 1.13 (9H, s, CH₃).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 175.33, 151.30, 145.46, 142.55, 130.14, 129.12, 128.77, 127.88, 127.56, 124.84, 123.78, 122.41, 118.89, 38.71, 26.61.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 54.65; H, 4.05, nájdené: C, 54.62; H, 4.09.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 2,4,6-trimethylbenzoát (triMe-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{22}H_{17}Cl_3O_3$

Molárna hmotnosť: 435,73

Vzhľad: bezfarebná olejovitá kvapalina

R_f : 0,87 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: -

Výtťažok: 69 %

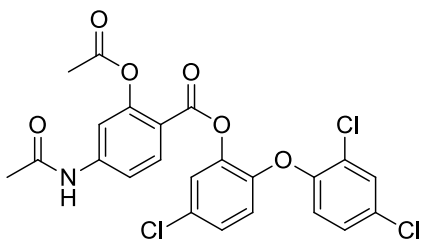
IR: 2924 (CH_3), 1750 ($C=O$), 1488, 1472, 1381 (CH_3), 1266, 1239, 1160, 1026, 851, 808 cm^{-1} .

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.76 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H2), 7.66 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H3'), 7.43-7.49 (2H, m, H4, H5'), 7.08-7.05 (2H, m, H5, H6'), 6.95 (2H, s, H3'', H5''), 2.31 (6H, s, CH_3), 2.25 (3H, s, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.77, 150.57, 146.79, 141.37, 140.28, 135.73, 130.36, 129.11, 129.00, 128.93, 128.73, 128.48, 127.93, 125.13, 124.59, 121.08, 120.68, 20.89, 19.64.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 60.64; H, 3.93, nájdené: C, 60.70; H, 3.95.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-acetamido-2-acetoxybenzoát (PAS-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{23}H_{16}Cl_3NO_6$

Molárna hmotnosť: 508,74

Vzhľad: bezfarebná olejovitá tekutina

R_f: 0,58 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: -

Výtťažok: 29 %

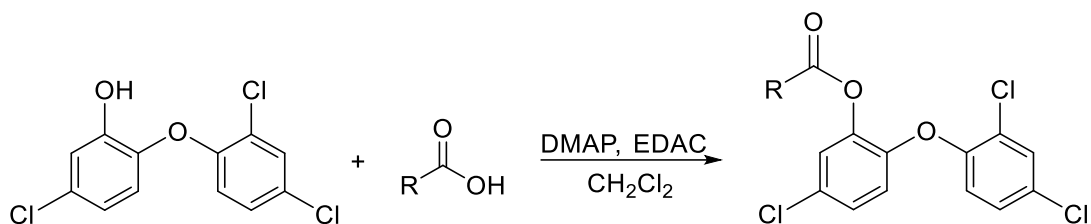
IR: 1698 (C=O), 1605, 1490, 1473, 1417, 1373, 1267, 1255, 1239, 1216, 1181, 1099, 1056, 913, 863, 792 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, methanol- d_4): δ 7.93 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H6''), 7.51 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H2), 7.47 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H3'), 7.45 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H3'), 7.39 (1H, dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, H4), 7.28 (1H, dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, H5'), 6.80-6.78 (2H, m, H5', H6'), 6.74 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H5), 2.25 (3H, s, OCO-CH₃), 2.12 (3H, s, NHCO-CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, methanol): δ 170.66, 170.12, 165.88, 152.29, 151.79, 149.61, 143.92, 142.09, 132.35, 129.98, 129.78, 127.81, 127.75, 124.55, 121.18, 119.58, 118.58, 118.20, 117.02, 115.92, 113.80, 22.71, 19.72.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 54.30; H, 3.17; N, 2.75, nájdené: C, 54.32; H, 3.19; N, 2.77.

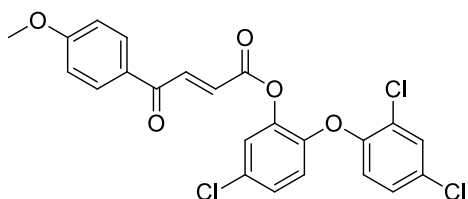
4.4.2. Postup prípravy karboxylových esterov – metóda č. 2 (Steglichova esterifikácia)



Reakčná schéma 4

1 mmol kyseliny, 1 mmol triklosanu (289,5 mg) a 0,1 mmol 4-(dimethylamino)pyridínu (DMAP, 12,2 mg) boli rozpustené v 5 ml suchého CH₂Cl₂, zmes bola chladená ľadom na 0 °C, následne bol naraz pridaný 1,5 ekvivalentu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu hydrochloridu (EDAC, 288 mg). Po 1 hodine bolo chladenie prerušené a zmes bola ponechaná reagovať ďalších 24 hodín za laboratórnej teploty. Monitorovanie reakcie prebiehalo pomocou TLC, sústava *n*-hexán/ethylacetát 4:1 (v/v). Reakčná zmes bola odparená do sucha, bol pridaný ethylacetát a zmes bola vytrepaná 10% roztokom Na₂CO₃, 0,1M HCl a s 5% roztokom NaCl a vysušená bezvodným Na₂SO₄. Následne bolo sušidlo odfiltrované a filtrát bol privedený ku kryštalizácii, buď prídavkom hexánu alebo odparením časti rozpúšťadla na rotačnej vákuovej odparke, u olejovitých produktov bolo odparené rozpúšťadlo.

(E)-5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-(4-methoxyfenyl)-4-oxobut-2-enoát (But-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{23}H_{15}Cl_3O_5$

Molárna hmotnosť: 477,72

Vzhľad: tmavočervená olejovitá kvapalina

R_f: 0,53 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: -

Výtťažok: 51 %

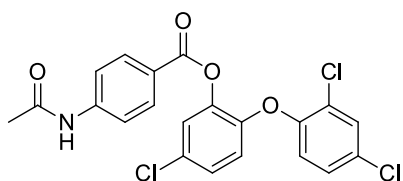
IR: 3071, 2936, 2856, 1750 (C=O), 1702 (C=O), 1698, 1680, 1595, 1488, 1473, 1261, 1233, 1217, 1170, 1132, 1101, 867, 832, 800, 793 cm^{-1} .

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.35 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H2'', H6''), 8.05 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, Ph-CO-CH=), 7.64 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H2), 7.45 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H3'), 7.25 (1H, dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, H5'), 7.06-6.93 (5H, m, H4, H5, H3'', H5'', =CH-COO), 6.68 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H6'), 3.85 (3H, s, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 188.90, 163.82, 161.05, 150.61, 148.55, 145.78, 142.11, 131.71, 130.92, 129.73, 128.80, 128.54, 127.27, 126.88, 123.32, 122.45, 121.72, 114.65, 55.61.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 57.83; H, 3.17, nájdené: C, 57.82; H, 3.13.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-acetamidobenzoát (PABA-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{21}H_{14}Cl_3NO_4$

Molárna hmotnosť: 450,70

Vzhľad: svetložltá kryštalická látka

R_f: 0,07 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: 135-136 °C

Výtťažok: 56 %

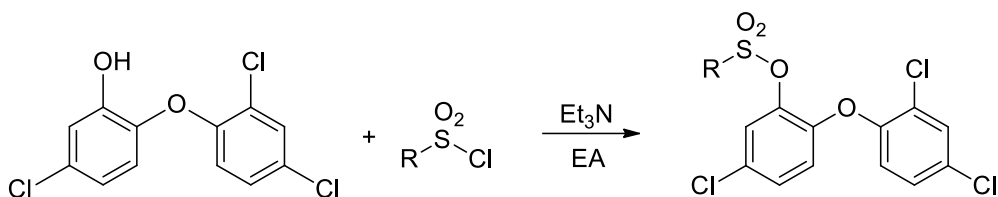
IR: 3325 (N-H), 1738 (C=O), 1597, 1531, 1488, 1473, 1408, 1321, 1258, 1218, 1171, 1120, 1100, 1080, 1058, 1014, 857, 808, 795, 761, 692 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.32 (1H, s, NH), 7.82-7.79 (2H, m, H2'', H6''), 7.70-7.67 (2H, m, H3'', H5''), 7.62 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H2), 7.59 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H3'), 7.38 (1H, dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, H4), 7.35 (1H, dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, H5'), 7.16 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H6'), 6.97 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H5), 2.06 (3H, s, CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 169.65, 163.51, 151.40, 146.82, 145.18, 142.31, 131.57, 130.50, 129.27, 129.01, 128.85, 127.93, 125.45, 125.00, 122.14, 122.05, 120.80, 118.81, 24.75.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 55.96; H, 3.13; N, 3.11, nájdené: C, 55.93; H, 3.16; N, 3.07.

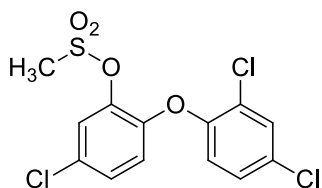
4.4.3. Postup prípravy esterov sulfónových kyselín



Reakčná schéma 5

1,1 mmol chloridu bol rozpustený vo varnej banke v 5 ml ethylacetáte (EA). Následne bol pridaný 1 mmol triklosanu (289,5 mg) a 1,5 mmol Et₃N (209 μl). Reakcia sa ponechala miešať 2 hod do kompletnej konverzie na produkt (monitorovanie pomocou TLC; sústava *n*-hexán/ethylacetát 4:1, v/v) Následne bola reakčná zmes odparená do sucha, pridaný ethylacetát, nerozpustný podiel (Et₃NH⁺Cl⁻) bol odfiltrovaný, filtrát vytrepaný s 10% roztokom Na₂CO₃, 0,1M HCl, 5% roztokom NaCl a vysušený státím nad bezvodným Na₂SO₄. Následne bolo sušidlo odfiltrované a filtrát bol privedený ku kryštalizácii, buď prídavkom hexánu alebo odparením časti rozpúšťadla na rotačnej vákuovej odparke, u olejovitých produktov bolo odparené rozpúšťadlo, produkt konzistencie „semisolid“ bol ponechaný stuhnúť pri -20 °C.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl methansulfonát (Mesyl-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{13}H_9Cl_3O_4S$

Molárna hmotnosť: 367,63

Vzhľad: priehľadná olejovitá kvapalina

R_f: 0,55 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: -

Výt'azok: 60 %

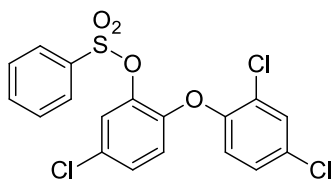
IR: 1486, 1473, 1372, 1266, 1191, 1167, 1121, 1100, 920, 869, 806, 787, 736 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.77 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H2), 7.63 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H3'), 7.41 (1H, dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, H4), 7.38 (1H, dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, H5'), 7.09 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H6'), 6.99 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H5), 3.44 (3H, s, CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 150.49, 147.71, 139.98, 130.80, 129.77, 129.56, 129.13, 128.49, 125.89, 125.36, 122.19, 120.87, 39.10.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 42.47; H, 2.47, nájdené: C, 42.50; H, 2.43.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl benzénsulfonát (Besyl-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{18}H_{11}Cl_3O_4S$

Molárna hmotnosť: 429,70

Vzhľad: bezfarebná „semisolid“ zlúčenina

R_f: 0,58 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: -

Výt'azok: 72 %

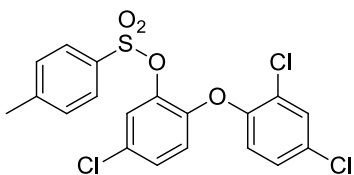
IR: 1474, 1450, 1373, 1269 1186, 1175, 1080, 918, 778, 718, 681 cm^{-1} .

1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.86-7.83 (2H, m, H2'', H6''), 7.76 (1H, ddt, $J = 8.7, 7.2, 1.2$ Hz, H4''), 7.69 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H3'), 7.62-7.59 (2H, m, H3'', H5''), 7.36-7.31 (3H, m, H2, H4, H5'), 6.89 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H6'), 6.71 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H5).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 150.21, 147.37, 139.60, 135.82, 134.88, 130.74, 130.39, 129.60, 129.38, 128.74, 128.31, 128.15, 126.02, 124.97, 121.63, 120.94.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 50.31; H, 2.58, nájdené: C, 51.33; H, 2.61.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-methylbenzénsulfonát (Tosyl-TCS)



Sumárny vzorec: $C_{19}H_{13}Cl_3O_4S$

Molárna hmotnosť: 443,73

Vzhľad: biela kryštalická látka

R_f: 0,60 (*n*-hexán:ethylacetát 4:1)

Teplota topenia: 91-92 °C

Výtťažok: 95 %

IR: 1492, 1473, 1371, 1269, 1260, 1192, 1173, 1122, 1100, 916, 872, 819, 748, 691 cm^{-1} .

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.79-7.75 (2H, m, H2'', H6''), 7.42-7.40 (2H, m, H2, H3'), 7.30-7.27 (2H, m, H3'', H5''), 7.18 (1H, dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, H4), 7.12 (1H, dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, H5'), 6.70 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H6'), 6.59 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H5), 2.44 (3H, s, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 150.34, 146.97, 145.65, 139.96, 132.43, 130.42, 129.74, 129.66, 129.05, 128.49, 128.01, 127.98, 126.05, 125.07, 120.21, 119.81, 21.69.

Elementárna analýza: vypočítané: C, 51.43; H, 2.95, nájdené: C, 51.40; H, 2.99.

5. Výsledky a diskusia

V tejto práci sme syntetizovali osem derivátov triklosanu s modifikovanou hydroxylovou skupinou, päť na báze esterov karboxylových kyselín a tri estery so sulfónovými kyselinami. Bola určená minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) všetkých látok u kmeňov *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii*, s porovnaním ich aktivity s východzím triklosanom a s izoniazidom.

5.1. Chémia

V prípade dvoch reaktantov pre reakciu s triklosanom bola potrebná ich úprava na vhodné deriváty, a to kvôli ochrane pred priebehom nežiadúcich reakcií a zároveň pre zvýšenie lipofilie molekúl a podpory prestupu cez biologické membrány a bunkovú stenu mykobaktérií. Konkrétne išlo o prípravu chloridu *O,N*-diacetylovanej *para*-aminosalicylovej kyseliny a prípravu *N*-acetylovanej *para*-aminobenzoovej kyseliny.

Syntéza Ac-PAS-Cl bola dvojkroková – najprv bola potrebná acetylácia hydroxylovej a amínovej funkčnej skupiny pre ochranu pred vznikom nežiadúcich vedľajších produktov, čo bolo dosiahnuté reakciou s acetanhydridom pri zvýšenej teplote. Pre prvotnú nízku výťažnosť reakcie sme zvolili postup s pridaním katalytického množstva H_2SO_4 , i napriek tomu sme získali výťažnosť 30 % (357,4 mg), čo však bolo postačujúce pre ďalší postup. Dominantný vznik 4-acetamido-2-hydroxybenzoovej kyseliny bol primárnou príčinou vzniku nízkeho množstva cieľeného produktu. Izolovaná diacetylovaná kyselina bola charakterizovaná pomocou retenčného faktora, teploty topenia a NMR spektier, s porovnaním s údajmi v literatúre. Ďalším krokom bola reakcia kyseliny s nadbytkom chloridu thionylu pri 70 °C za použitia *N,N*-dimethylformamidu ako katalyzátora. Produkt reakcie nebol čistený, pretože bezprostredne po prebehnutí reakcie a po odparení chloridu thionylu a ďalších prchavých zložiek reakčnej zmesi sme ponechali vzniknutý chlorid kyseliny reagovať s triklosanom podľa Reakčná schéma 3, a to z toho dôvodu, aby sme zamedzili vzniku rozkladných produktov behom purifikácie chloridu.

Pre prípravu acetyl-PABA sme znova ponechali východiskovú kyselinu reagovať s acetanhydridom za zvýšenej teploty, produkt s 54% výťažkom (488,8 mg) sme charakterizovali pomocou R_f , teploty topenia a NMR spektier, opäť s porovnaním s údajmi v literatúre.

Syntéza prvých dvoch látok (tBu-TCS, triMe-TCS) prebehla z príslušného chloridu behom dvoch hodín pri laboratórnej teplote v dichlorometháne s výťažkami 74 a 69 %

(295,1 mg, 301 mg), pričom po prebehnutí reakcie a po izolácii látok podľa postupu uvedeného v príslušnej kapitole výsledky TLC nepoukazovali na prítomnosť žiadnych nečistôt.

Látku PAS-TRC sme sa najprv pokúšali syntetizovať metódou č. 2 – Steglichovou esterifikáciou, u tej bol ale problém veľmi nízkej konverzie na výsledný ester, čo sme vyhodnotili orientačne pomocou TLC. Z tohto dôvodu sme následne zvolili prvú metódu – reakciu chloridu s triklosanom, pričom na základe monitorovania priebehu reakcie pomocou TLC sme zmes ponechali reagovať až 24 hodín. Týmto postupom sme získali výťažok čistej látky 29 % (149,2 mg), problém predstavovala izolácia čistého produktu: po vytrepaní a vysušení bola zmes odparená, vzniknuté kryštály obsahovali nečistoty, preto sme zmes rozpustili v ethylacetáte a sfiltrovali. Kryštály zachytené na filtri obsahovali čistý ester, jeho prítomnosť bola zistená i vo filtráte. Ten sme odparili dosucha a kryštály charakterizovali pomocou NMR spektra. Bola zistená malá prítomnosť nezreagovaného Et_3N , resp. jeho hydrochloridu, preto sme zmes rozpustenú v ethylacetáte znova vytrepali s 5% roztokom NaCl. Po tomto kroku sme po vysušení a odparení ethylacetátu získali ďalší podiel výsledného esteru.

Pri príprave But-TCS sme použili dvojnásobné množstvo oproti tomu uvedenému v kapitole 4.4.2., pretože pri prvom priebehu reakcie sme podľa tenkovrstvej chromatografie nedosahovali uspokojivú konverziu východiskových látok na produkt. Výsledná pomerne lipofilná látka bola obtiažná na izoláciu, proces izolácie zahŕňal okrem trepania a zahustenia na odparke taktiež opakovanú kryštalizáciu zo zmesi ethylacetát/hexán a z acetonitrilu. Od nezreagovaného triklosanu bola zmes oddelená pomocou hexánu, v ktorom sa triklosan rozpúšťa. Behom trepania sa takisto oddelila tmavočervená fáza nerozpustná jak vo vodnej, tak v ethylacetátovej vrstve: táto sa rozpustila v tetrahydrofuráne a podľa výsledkov TLC obsahovala zanedbateľné množstvo produktu, preto bola odstránená. Celkový výťažok predstavoval 51 % (487,2 mg). Rovnakou reakciou pripravená zlúčenina PABA-TCS bola po zreagovaní, vytrepaní a odparení izolovaná pomocou kryštalizácie zo zmesi ethylacetát/hexán s výsledným podielom 56 % (259,0 mg) z teoretického výťažku.

Príprava sulfonylových esterov sa ukázala ako najmenej problémová. Konverzia bola podľa TLC uspokojivá a po vytrepaní podľa uvedeného všeobecného postupu sa podarilo získať čisté produkty s výťažkami v rozmedzí 60-95 %.

5.2. Biologické hodnotenie

U všetkých pripravených zlúčenín bola vyhodnocovaná *in vitro* antimykobakteriálna aktivita, a to voči kmeňom *M. tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/80 a *M. kansasii* 138/18, kde v prípade *M. tuberculosis* My 331/88 ide o kmeň H₃₇Rv citlivý na všetky antituberkulotiká a kmeň *M. avium* My 330/80 je polyrezistentný. Testovanie bolo vykonané na Oddelení bakteriológie a mykológie Zdravotného ústavu so sídlom v Ostrave. Ako rozpúšťadlo pre testované látky bol zvolený DMSO, v prípade izoniazidu ako štandardu bola zvolená sterilná destilovaná voda. Pre sledovanie minimálnych inhibičných koncentrácií boli použité koncentrácie hodnotených látok v rozmedzí 1-1000 µmol/l, u izoniazidu 0,5-250 µmol/l a vzorky boli kultivované pri teplote 37 °C. Rast kolónií bol sledovaný po 14 a 21 dňoch, v prípade kmeňa *M. kansasii* po 7, 14 a 21 dňoch. Ako štandard pre hodnotenie *in vitro* antimykobakteriálnej aktivity boli zvolené triklosan a izoniazid (INH). Biologické hodnotenie prebehlo podľa predchádzajúcej práce kolektívu Katedry organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. (51) Získané výsledky sú uvedené v Tabuľka 1.

| | MIC [µmol/l] | | | | | | |
|-----------|---|-------|--------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|-------|
| | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> My 331/88 | | <i>Mycobacterium avium</i> My 330/80 | | <i>Mycobacterium kansasii</i> 138/18 | | |
| | 14 d | 21 d | 14 d | 21 d | 7 d | 14 d | 21 d |
| tBu-TCS | 32 | 64 | 500 | 1000 | 64 | 64 | 125 |
| triMe-TCS | 32 | 64 | 250 | 250 | 32 | 64 | 125 |
| PAS-TCS | 32 | 64 | >1000 | >1000 | 250 | 500 | 1000 |
| But-TCS | 32 | 64 | 125 | 125 | 16 | 32 | 64 |
| PABA-TCS | 32 | 64 | 125 | 125 | 16 | 32 | 64 |
| Mesyl-TCS | 32 | 64 | 1000 | >1000 | 16 | 32 | 64 |
| Besyl-TCS | 1000 | >1000 | >1000 | >1000 | 1000 | >1000 | >1000 |
| Tosyl-TCS | 1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| TCS | 32 | 32 | 32 | 32 | 16 | 32 | 32 |
| INH | 0,5 | 0,5 | 250 | >250 | 2 | 4 | 8 |

Tabuľka 1: Výsledky mikrobiologického testovania

Z tabuľky 1 vyplýva, že aktivita novo syntetizovaných látok je s TRC v zásade porovnateľná u kmeňov *M. tuberculosis* a *M. kansasii*. V rámci *MTb* až šesť štruktúr (všetky karboxylové estery a Mesyl-TCS) má účinok obdobný s TRC s jednotnými hodnotami MIC = 32/64 µmol/l (14/21 dní). U atypického kmeňa *M. kansasii* badáme u troch štruktúr (But-TCS, PABA-TCS, Mesyl-TCS) veľmi dobrý účinok s hodnotami MIC 16/32/64 µmol/l (7/14/21 dní), s efektom až baktericídny, baktericídnu tendenciu sledujeme aj u látky tBu-TCS. U molekuly triMe-TCS je účinok bakteriostatický a stále obdobný s TCS. Deriváty But-TCS a PABA-TCS vynikli aj u izoniazid-rezistentného kmeňa *M. avium*. Aktivita všetkých látok je síce nižšia oproti TCS, avšak práve tieto dve látky preukázali výsledky

pomerne výhodnejšie oproti izoniazidu – štvornásobné navýšenie MIC oproti hodnotám u *Mtb* (125/125 $\mu\text{mol/l}$ po 14/21 dňoch), oproti 500-násobnému zvýšeniu izoniazidu.

Voči obom netuberkulóznym kmeňom sú zo všetkých látok najvýhodnejšie štruktúry s označením But-TCS a PABA-TCS s aktivitami relatívne vyššími oproti izoniazidu. Očakávaná vyššia účinnosť voči mykobaktériám u esteru TCS s diacetylovanou *para*-aminosalicylovou kyselinou nebola potvrdená.

Najhoršie proti všetkým trom kmeňom dopadli posledné dve látky – estery so sulfónovými kyselinami, Besyl-TCS a Tosyl-TCS. Hodnoty MIC týchto dvoch zlúčenín boli buď rovné alebo presahovali hodnotu 1000 $\mu\text{mol/l}$. Zaujímavé je porovnanie týchto látok s Mesyl-TCS, z čoho môžeme predpokladať, že malý alkyl molekuly Mesyl-TCS je pre aktivitu výhodný, naopak, aromatické zvyšky u sulfonylových derivátov Besyl-TCS a Tosyl-TCS aktivitu znižujú.

6. Záver

V tejto práci sme syntetizovali osem derivátov triklosanu, pričom piatimi esterami triklosanu karboxylových kyselín sme doplnili predchádzajúce práce, ktorým sa venovalo na Katedre organickej a bioorganickej chémie na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové.

Syntéza všetkých ôsmych zamýšľaných štruktúr prebehla úspešne, s výťažkami v rozmedzí 29-95 %. V troch prípadoch sme pripravili duálne zlúčeniny spájajúce dve látky s antimykobakteriálnym účinkom (PAS-TCS, PABA-TCS, But-TCS). Každá cieľová molekula bola následne testovaná pre svoju potenciálnu antimykobakteriálnu aktivitu. Z *in vitro* testov na troch mykobakteriálnych kmeňoch sme u väčšiny látok badali obdobné účinky s triklosanom u kmeňa *MTb* na základe porovnania ich minimálnych inhibičných koncentrácií, pričom dve z nich, estery But-TCS a PABA-TCS, sa vyznačovali prijateľnými aktivitami naprieč všetkými tromi testovanými kmeňmi, ktoré zahŕňali tuberkulóznym kmeň *M. tuberculosis*, a dve atypické, izoniazid-rezistentné kmene *M. avium* a *M. kansasii*.

7. Zoznam obrázkov

| | |
|---|----|
| Obrázok 1: Odhadovaný počet výskytu multirezistentných prípadov tuberkulózy v krajinách, kde je tento výskyt nad 1000 prípadov za rok 2019 (1) | 8 |
| Obrázok 2: Všeobecné štruktúry základných mykologických kyselín | 10 |
| Obrázok 3: Vývoj tuberkulózného procesu..... | 11 |
| Obrázok 4: Vľavo: R = H... kanamycín A; R = (S)-4-amino-2-hydroxybutanoyl... amikacín; Vpravo: kapreomycín | 15 |
| Obrázok 5: Zľava: ciprofloxacín, ofloxacín, moxifloxacín..... | 15 |
| Obrázok 6: Zľava: ethionamid, prothionamid | 15 |
| Obrázok 7: Zľava: <i>para</i> -aminosalicylová kyselina, cykloserin, terizidon | 15 |
| Obrázok 8: Zľava zhora: klofazimin, linezolid, thioacetazon, amoxicilin, imipenem, klaritromycin, klavulanová kyselina, cilastatin | 16 |
| Obrázok 9: Štruktúra izoniazidu a jeho premena na aktívnu formu pomocou KatG | 18 |
| Obrázok 10: Štruktúra rifampicínu..... | 18 |
| Obrázok 11: Štruktúra ethambutolu | 19 |
| Obrázok 12: Štruktúra pyrazinamidu | 19 |
| Obrázok 13: Štruktúra streptomycínu..... | 20 |
| Obrázok 14: Schematické znázornenie reakcie katalyzovanej InhA..... | 20 |
| Obrázok 15: Zľava zhora: zákl. štr. der. 4-hydroxy-2-pyridonu, pyridomycín, zákl. štr. der. thiazolidinonov, arylamidov (X = C, N), pyrrolidín-karboxamidov | 21 |
| Obrázok 16: Štruktúra triklosanu | 21 |
| Obrázok 17: n = 5... 2-fenoxy-5-hexylfenol; n = 7... 2-fenoxy-5-oktylfenol..... | 23 |
| Obrázok 18: 5-hexyl-2-(pyridin-4-yloxy)fenol (vľavo); 2-(3-aminofenoxy)-5-hexylfenol (vpravo) | 24 |
| Obrázok 19: 4-(4-fenoxy-3-hydroxyfenyl)-4-oxo-2-(p-tolyl)butánamid | 24 |
| Obrázok 20: R ^{1,2} =H/Cl | 25 |
| Obrázok 21: [5-(3-fenoxyfenyl)-3-(pyridín-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl](fenyl)metanon | 25 |
| Obrázok 22: N-(3,4-dichlorfenyl)-2-(3-fenoxyfenyl)acetamid | 25 |
| Obrázok 23: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl pivalát..... | 26 |
| Obrázok 24: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl [2-(dimethylamino)ethyl]glutarát | 26 |
| Obrázok 25: (3-chlor-2,6-dimethyl-5-{4-[4-(trifluormethoxy)fenoxy]fenyl}-1,4-dihydropyridín-4-ol) | 27 |
| Obrázok 26: 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl 4-brombenzoát (vľavo); 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl isonikotinoát (vpravo)..... | 28 |

8. Zoznam tabuliek

| | |
|--|----|
| Tabuľka 1: Výsledky mikrobiologického testovania | 48 |
|--|----|

9. Bibliografia

1. WHO. Global Tuberculosis Report. [Online]. 2020. [cit. 13.5.2021]. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>.
2. YANTI, B.; MULYADI, M.; AMIN, M.; HARAPAN, H.; MERTANIASIH, N. M.; SOETHIPTO, S. The role of *Mycobacterium tuberculosis* complex species on apoptosis and necroptosis state of macrophages derived from active pulmonary tuberculosis patients. *BMC Research Notes*, 2020, 13(1), 415. doi: 10.1186/s13104-020-05256-2.
3. SUHAIL, A. Pathogenesis, immunology and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 2011, 1-17. doi: 2011:814943. 10.1155/2011/814943 2011.
4. TRIFIRO, S.; BOURGAULT, A. M.; LEBEL, F.; RENÉ, P. Ghost mycobacteria on Gram Stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(1), 146-147. doi: 10.1128/JCM.28.1.146-146.1190.
5. VOTAVA, M. a kol. Mikrobiologie lékařská speciální. Brno: Neptun, 2006. ISBN: 978-80-902896-6-5.
6. BEDNÁŘ, M. a kol. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996. ISBN: 80-238-0297-6.
7. ČEŠKA, R. a kol. Interna. Praha: TRITON, 2015. ISBN: 978-80-7387-885-6.
8. TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18(1), 81-101. doi: 10.1128/CMR.18.1.81-101.2005.
9. BARRY, C.; LEE, R. E.; MDLULI, K.; SAMPSON, A. E.; SCHROEDER, B. G.; SLAYDEN, R. A.; YUAN, Y. Mycolic acids: structure, biosynthesis and pathophysiological functions. *Progress in Lipid Research*, 1998, 37(2-3), 143-179. doi: 10.1016/s0163-7827(98)00008-3.
10. POVÝŠIL, C.; ŠTEINER, I. a kol. Obecná patologie. Praha: Galén, 2011. ISBN: 978-80-7262-773-8.
11. POVÝŠIL, C.; ŠTEINER, I. et al. Speciální patologie. Praha: Galén, 2007. ISBN: 978-80-246-1442-7.
12. HOMOLKA, J. Tuberkulóza. Praha: Karolinum, 2016. ISBN: 978-80-246-3521-7.
13. MACHADO, D.; COUTO, I.; VIVEIROS, M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 72, 93-112. doi: 10.1016/j.meegid.2018.11.021.
14. WHO. Guidelines for treatment of tuberculosis, fourth edition. [Online]. 2010. [cit. 13.5.2021] Dostupné z: <https://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/>.
15. WHO. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 1: Prevention - Tuberculosis preventive treatment, [Online]. 2020. [cit. 13.5.2021] Dostupné z:

<https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment>.

16. LOHRASBI, V.; TALEBI, M.; BIALVAEI, A. Z.; FATTORINI, L.; DRANCOURT, M. et al. Trends in the discovery of new drugs for *Mycobacterium tuberculosis* therapy with a glance at resistance. *Tuberculosis*, 2018, 109, 17-27. doi: 10.1016/j.tube.2017.12.002.

17. HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.; ZIMČÍK, P. Farmaceutická chemie IV. Praha: Karolinum, 2019. ISBN: 978-80-246-4264-2.

18. ECAMPBELL, E. A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; NAIR, S.; GOLDFARB, A.; DARST, S. A. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*, 2001, 104(6), 901-912. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00286-0.

19. PETERSON, N. D.; ROSEN, B. C.; DILLON, N. A.; BAUGHN, A. D. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 59(12), 7320-7326. doi: 10.1128/AAC.00967-15.

20. DILLON, N. A.; PETERSON, N. D.; FEAGA, H. A.; KEILER, K. C.; BAUGHN, A. D. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of *trans*-Translation and RpsA. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 6315. doi: 10.1038/s41598-017-06415-5.

21. DILLON, N. A.; PETERSON, N. D.; ROSEN, B. C.; BAUGHN, A. D. Panthotenate and pantheine antagonize the antitubercular activity of pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(12), 7258-7263. doi: 10.1128/AAC.04028-14.

22. ROŽMAN, K.; SOSIČ, I.; FERNANDEZ, R.; YOUNG, R. J.; MENDOZA, A.; GOBEC S.; ENCINAS, L. A. new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(3), 492-502. doi: 10.1016/j.druids.2016.09.009.

23. INTURI, B.; PUJAR, G. V.; PUROHIT, M. N. Recent Advances and Structural Features of Enoyl-ACP Reductase Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archiv der Pharmazie*, 2016, 349(11), 817-826. doi: 10.1002/ardp.201600186.

24. WHO. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care (Advanced Draft). [Online] 2006. [cit. 13.5.2021]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241597906>.

25. VOSÁTKA, R.; KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 114, 318-331. doi:10.1016/j.ejps.2017.12.013.

26. WEATHERLY, L. M.; GOSSE, J. A. Triclosan Exposure, Transformation and Human Health Effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B*, 2017, 20(8), 447-469. doi: 10.1080/10937404.2017.1399306.

27. WANG, C.-F.; TIAN, Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 2015, 206, 195-201. doi: 10.1016/j.envpol.2015.07.001.

28. ZHANG, H.; SHAO, X.; ZHAO, H.; LI, X.; WEI, J.; YANG, C.; CAI, Z. Integration of Metabolomics and Lipidomics Reveals Metabolic Mechanisms of Triclosan-Induced

Toxicity in Human Hepatocytes. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53, 5406-5415. doi: 10.1021/acs.est.8b07281.

29. WU, Y.; CHITRANSHI, P.; LOUKOTOVÁ, L.; GAMBOA DA COSTA, G.; BELAND, F. A.; ZHANG, J.; FANG, J.-L. Cytochrome P450-mediated metabolism of triclosan attenuates its cytotoxicity in hepatic cells. *Archives of Toxicology*, 2017, 91, 2405-2423. doi: 10.1007/s00204-016-1893-6.

30. CAREY, D. E.; McNAMARA, P. J. The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5, 780. doi: 10.3389/fmicb.2014.00780.

31. HALDEN, R. U. et al. The Florence Statement on Triclosan and Triclocarban. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(6), 064501. doi: 10.1289/EHP1788.

32. PARIKH, S. L.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry*, 2000, 39(26), 7645-7650. doi: 10.1021/bi0008940.

33. SULLIVAN, T. J.; TRUGLIO, J. J.; BOYNE, M. E.; NOVICHENOK, P.; ZHANG, X.; STRATTON, C. F.; LI, H.-J.; KAUR, T.; AMIN, A.; JOHNSON, F.; SLAYDEN, R. A.; KISKER C.; TONGE, P. J. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chemical Biology*, 2006, 1, 43-53. doi: 10.1021/cb0500042.

34. ENDE, C. W.; KNUDSON, S. E.; LIU, N.; CHILDS, J.; SULLIVAN, T. J.; BOYNE, M.; XU, H.; GEGINA, Y.; KNUDSON, D. L.; JOHNSON, F.; PELOQUIN, C. A.; SLAYDEN, R. A.; TONGE, P. J. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether InhA inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(10), 3029-3033. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.04.038.

35. KAR, S. S.; BHAT G, V.; RAO, P. P.; SHENOY, V. P.; BAIRY, I.; SHENOY, G. G. Rational design and synthesis of novel diphenyl ether derivatives as antitubercular agents. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016, 10, 2299-2310. doi: 10.2147/DDDT.S104037.

36. FREUNDLICH, J. S.; WANG, F.; VILCHÉZE, C.; GULTEN., G.; LANGLEY, R.; SCHIESHER, R.; JACOBUS, D. P.; JACOBS, W. R.; SACCHETTINI, J. C.; Towards Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*, 2009, 4(2), 241-248. doi: 10.1002/cmcd.200800261.

37. KINI, S. G.; BHAT, A. R.; BRYANT, B.; WILLIAMSON, J. S.; DAYAN, F. E. Synthesis, antitubercular activity and docking study of novel cyclic azole substituted diphenyl ether derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44(2), 492-500. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.04.013.

38. YANG, Y.; WANG, Z.; YANG, J.; YANG, T.; PI, W.; ANG, W.; LIN, Y.; LIU, Y.; LI, Z.; LUO, Z.; WEI, Y. Design, synthesis and evaluation of novel molecules with a diphenyl ether nucleus as potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(2), 954-957. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.12.022.

39. TIPPARAJU, S. K.; MUENCH, S. P.; MUI, E. J.; RUZHEINIKOV, S. N.; LU, J. Z.; HUTSON, S. L.; KIRISITS, M. J.; PRIGGE, S. T.; ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L.; KOZIKOWSKI, A. P.; RICE, D. W.; McLEOD, R. L. Identification and Development of Novel Inhibitors of *Toxoplasma gondii* Enoyl Reductase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 6287-6300. doi: 10.1021/jm9017724.
40. MISHRA, S.; KARMODIYA, K.; PARASURAMAN, P.; SUROLIA A.; SUROLIA, N. Design, synthesis, and application of novel triclosan prodrugs as potential antimalarial and antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16, 5536-5546. doi: 10.1016/j.bmc.2008.04.006.
41. OUJI, M.; NGUYEN, M.; MUSTIÈRE, R.; JIMENEZ, T.; AUGEREAU, J.-M.; BENOIT-VICAL, F.; DERAËVE, C. Novel molecule combinations and corresponding hybrids targeting artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* parasites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021, 39, 127884. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127884.
42. YANG, L.; ZHANG, C.; HUANG, F.; LIU, J.; ZHANG, Y.; YANG, C.; REN, C.; CHU, L.; LIU, B.; LIU, J. Triclosan-based supramolecular hydrogels as nanoantibiotics for enhanced antibacterial activity. *Journal of Controlled Release*, 2020, 324, 354-365. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.05.034.
43. VOSÁTKA, R. Design a syntéza nových potenciálně antibakteriálně účinných sloučenin. 2018, 138 s. Dizertačná práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova. Vedúci práce Jarmila VINŠOVÁ.
44. VOSÁTKA, R.; KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J. Synthesis of triclosan derivatives and their antimycobacterial effect. *Česká a slovenská farmacie*, 2015, 64, 269-304.
45. THIEDE, J. M.; KORDUS, S. L.; TURMAN, B. J.; BOUNOMO, J. A.; ALDRICH, C. C.; MINATO, Y.; BAUGHN, A. D. Targeting intracellular *p*-aminobenzoic acid production potentiates the anti-tubercular action of antifolates. *Scientific Reports*, 2016, 6(1), 38083. doi: 10.1038/serp38083.
46. REN, J.; XU, J.; ZHANG, G.; XU, C.; ZHAO, L.; YOU, X.; WANG, Y.; LU, Y.; YU, L.; WANH, J. Design, synthesis, and bioevaluation of a novel class of (*E*)-4-oxocrotonamide derivatives as potent antituberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 29, 539-543. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.01.001.
47. XU, C.; BAI, X.; XU, J.; REN, J.; XING, Y.; LI, Y.; WANG, J.; SHI, J.; YU, L.; WANG, Y. Substituted 4-oxo-crotonic acid derivatives as a new class of protein kinase B (PknB) inhibitors: synthesis and SAR study. *RSC Advances*, 2017, 8, 4763-4775. doi: 10.1039/C6RA24953A.
48. KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; RODRIGUEZ, N. G.; STOLAŘÍKOVÁ, J. Antimycobacterial activity of salicylanilide benzenesulfonates. *Molecules*, 2012, 17(1), s. 492-503. doi: 10.3390/molecules17010492.
49. NIE, Q.; YI, F.; CAI, M. Efficient Heterogeneous Gold(I)-Catalyzed Direct C(*sp*²)-C(*sp*) Bond Functionalization of Arylalkynes through a Nitrogenation Process to Amides. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2017, 359(22), 3968-3976. doi: 10.1002/adsc.201700783.

50. BENEDIKT, K.; EIBL, H. Über einige Derivate der *p*-Aminosalicyläure und ihre tuberkulostatische Wirksamkeit. *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 1950, 81, 419-423. doi: 10.1007/BF00903044.

51. KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; NOVOTNÁ, E.; MANDÍKOVÁ, J.; TREJTNAR, F.; STOLAŘÍKOVÁ, J. Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)benzoates. *Molecules*, 2013, 18(4), 3674-3688. doi: 10.3390/molecules18043674.