

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**Syntéza a hodnocení inhibitorů vybraných enzymů jako
potenciálních léčiv**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Bc. Quynh Anh Vu

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 6. 5. 2021

Poděkování

Tímto bych chtěla srdečně poděkovat všem lidem, díky kterým mohla tato diplomová práce vzniknout, a to především mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za důkladné a trpělivé vedení práce a cenné rady, dále odbornému „supervizorovi“ Mgr. Václavu Pflégrovi za jeho důležité praktické rady, ochotu a vstřícnost, dále paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., a paní Mgr. Kataríně Svrčkové, Ph.D., z Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za možnost si změřit biologické aktivity. Děkuji také Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za poskytnutí pracovního zázemí a technické vybavení a Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za změření antimikrobní aktivity. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala během celého studia.

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

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Řešitel práce: Bc. Quynh Anh Vu

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

Název diplomové práce: Syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů vybraných enzymů jako potenciálních léčiv

Tématem diplomové práce je syntéza nových inhibitorů mykobakteriálního enzymu InhA a inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy a jejich potenciální inhibiční efekt vůči vyjmenovaným třem enzymům. Všechny připravené sloučeniny jsou analoga odvozená od triklosanu, která by mohla být vhodnými kandidáty jakožto potenciální léčiva použitelná k léčbě tuberkulózy a neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy choroby.

Teoretická část se zabývá problematikou tuberkulózy včetně rezistence mykobakterií na antituberkulotika a výzkumu nových léčiv proti tuberkulóze. Dále je stručně popsána cholinergní hypotéza a studium nových potenciálních inhibitorů cholinesteráz. V experimentální části jsou popisovány reakční postupy vedoucí k přípravě plánovaných sloučenin a v kapitole Výsledky a diskuze jsou rozebrány korelace mezi naměřenými hodnotami z biologického testování a strukturou jednotlivých sloučenin. V této kapitole je dále diskutována syntéza sloučenin a její komplikace.

Bylo připraveno celkem osm sloučenin (dva prekurzory pro další syntézy a modifikace, dva finální amidy, dvě močoviny a dva karbamáty) v dostatečném výtěžku. Všechny sloučeniny byly testovány na antimikrobní aktivitu a inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám. Sloučenina *N*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid vykazovala vůči všem třem vybraným mykobakteriím ze všech námi připravených sloučenin nejlepší antimikrobní účinek. Konkrétně vůči *M. smegmatis* měla hodnotu minimální inhibiční koncentrace 31,25 mg/l, vůči *M. aurum* 15,625 mg/l a vůči *M. tuberculosis* H₃₇Ra 7,81 mg/l. Tato sloučenina vykazovala také ze všech připravených sloučenin nejnižší hodnotu IC₅₀ vůči acetylcholinesteráze (48,85 μM) a má lepší inhibiční účinek vůči acetylcholinesteráze než klinicky aplikované karbamátové léčivo rivastigmin (56,10 μM). Prekurzor 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilin („amino-triklosan“) nejlépe inhiboval butyrylcholinesterázu (IC₅₀ = 11,93 μM), což je opět v porovnání

s rivastigminem lepší inhibiční aktivita. Triklosan vykazoval srovnatelnou inhibiční aktivitu ($11,81 \pm 0,04 \mu\text{M}$) vůči BuChE jako jeho isoster „amino-triklosan“. Také bylo zjištěno, že triklosan je sám o sobě smíšeným inhibitorem.

Ze stanovení vztahu mezi biologickou aktivitou a molekulovou strukturou vyplývá, že analoga na bázi „amino-triklosanu“ jsou perspektivní k dalším studiím jakožto potenciální inhibitory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy a experimentálnímu stanovení mechanismu účinku vůči mykobakteriím.

Klíčová slova

Acetylcholinesteráza; antituberkulotika; butyrylcholinesteráza; diarylethery; enzymová inhibice; InhA; *in vitro* aktivita; mykobakterie; rezistence; triklosan; tuberkulóza

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Bc. Quynh Anh Vu

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

Title of diploma thesis: Synthesis and evaluation of selected enzyme inhibitors as potential drugs

This diploma thesis deals with the synthesis of new inhibitors of the mycobacterial enzyme InhA and inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential inhibitory effect against these three enzymes. All of the prepared compounds are analogues derived from triclosan, which could be convenient candidates as potential drugs for the treatment of tuberculosis and neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease.

The theoretical part summarizes facts about tuberculosis including the resistance of mycobacteria to antituberculosis drugs and research of new drugs against tuberculosis. Also, the cholinergic hypothesis and the investigation of new potential inhibitors of cholinesterases are described briefly. The experimental part reports the reactions leading to the preparation of designed compounds. The chapter Results and discussion summarizes structure-activity relationships. It also discusses the synthesis and its complications.

Eight compounds (two precursors for further syntheses and modifications, two final amides, two ureas and two carbamates) were prepared in satisfactory yields. All of them were tested for their antimicrobial activity and cholinesterase inhibitory activity. The compound *N*-[5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenyl]acetamide showed the best antimicrobial activity against all three selected mycobacteria at all. It had minimum inhibitory concentration of 31.25 mg/L against *M. smegmatis*, 15.625 mg/L against *M. aurum* and 7.81 mg/L against *M. tuberculosis* H₃₇Ra, respectively. This compound even showed the lowest IC₅₀ value for acetylcholinesterase (48.85 μM) of all the prepared compounds and has a better inhibitory effect against acetylcholinesterase than the clinically used carbamate drug rivastigmine (56.10 μM). The precursor 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)aniline ("amino-triclosan") showed the best inhibition of butyrylcholinesterase (IC₅₀ of 11.93 μM), which is a better inhibitory activity compared to rivastigmine again. Triclosan showed comparable inhibitory activity (11,81±0,04 μM) against BuChE to its isoster "amino-triclosan". It was found that triclosan is

a mixed inhibitor.

The determination of structure-activity relationships suggests that "amino-triclosan" analogues are perspective for further studies and investigation of triclosan analogues as potential inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and for experimental determination of mechanism of action against mycobacteria.

Keywords

Acetylcholinesterase; antituberculotics; butyrylcholinesterase; diaryl ethers; enzyme inhibition; InhA; *in vitro* activity; mycobacteria; resistance; triclosan; tuberculosis

1 OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Abstrakt..... | 4 |
| Klíčová slova..... | 5 |
| Abstract..... | 6 |
| Keywords | 7 |
| 1 Obsah..... | 8 |
| 2 Seznam symbolů a zkratek..... | 11 |
| 3 Úvod..... | 13 |
| 4 Cíl práce | 15 |
| 5 Teoretická část..... | 16 |
| 5.1 Tuberkulóza | 16 |
| 5.1.1 Základní charakteristika | 16 |
| 5.1.2 Původce | 16 |
| 5.1.3 Epidemiologická situace | 17 |
| 5.1.3.1 Svět..... | 17 |
| 5.1.3.2 Česká republika | 18 |
| 5.1.4 Zdroj nákazy..... | 18 |
| 5.1.5 Přenos infekce | 19 |
| 5.1.6 Inkubační doba | 19 |
| 5.1.7 Vnímavost k infekci | 19 |
| 5.1.8 Patogeneze a klinické příznaky | 19 |
| 5.1.8.1 Jedinec nebyl infikován..... | 20 |
| 5.1.8.2 Asymptomatická infekce..... | 20 |
| 5.1.8.3 Manifestní TBC..... | 20 |
| 5.1.8.3.1 Primární TBC..... | 20 |
| 5.1.8.3.2 Postprimární TBC | 20 |
| 5.1.9 Základní vyšetřovací diagnostika TBC..... | 21 |
| 5.1.10 Laboratorní a bakteriologický průkaz TBC | 22 |
| 5.1.10.1 Odběr materiálu a transport vzorku do laboratoře | 22 |
| 5.1.10.2 Přímý mikroskopický průkaz | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.1.10.3 | Kultivační průkaz | 24 |
| 5.1.10.4 | Biologický průkaz pokusem na zvířeti..... | 26 |
| 5.1.10.5 | Průkaz pomocí molekulárně genetických metod | 26 |
| 5.1.10.6 | Průkaz na základě humorální a buněčné imunitní odpovědi organismu..... | 27 |
| 5.1.10.7 | Dodatkově pomocné vyšetřovací metody | 28 |
| 5.1.10.8 | Typizace jednotlivých druhů..... | 28 |
| 5.1.10.9 | Vyšetření citlivosti na antituberkulotika | 29 |
| 5.1.11 | Terapie TBC..... | 31 |
| 5.1.12 | Základní řada používaných antituberkulotik..... | 32 |
| 5.1.12.1 | Isoniazid (INH) | 32 |
| 5.1.12.2 | Rifampicin (RPM)..... | 33 |
| 5.1.12.3 | Pyrazinamid (PZA) | 34 |
| 5.1.12.4 | Streptomycin (STM) | 34 |
| 5.1.12.5 | Ethambutol (EMB)..... | 35 |
| 5.1.13 | Problematika rezistence..... | 35 |
| 5.2 | Výzkum nových potenciálních antimikrobiálních sloučenin..... | 37 |
| 5.2.1 | Triklosan jako potenciální inhibitor enzymu InhA | 39 |
| 5.3 | Alzheimerova choroba a cholinergní teorie | 42 |
| 5.3.1 | Deriváty fenolů a močoviny jako potenciální inhibitory cholinesteráz | 44 |
| 5.3.1.1 | Další příklady dualistické aktivity | 46 |
| 6 | Experimentální část..... | 48 |
| 6.1 | Chemikálie a technická zařízení | 48 |
| 6.2 | Příprava prekursoru „amino-triklosanu“..... | 50 |
| 6.2.1 | Syntéza etheru nukleofilní substitucí | 50 |
| 6.2.1.1 | Metoda A..... | 50 |
| 6.2.1.2 | Metoda B..... | 51 |
| 6.2.1.3 | Metoda C | 51 |
| 6.2.1.4 | Metoda D..... | 52 |
| 6.2.1.5 | Metoda E | 52 |
| 6.2.2 | Redukce Raneyovým niklem | 54 |
| 6.3 | Jednotlivé syntézy amidů..... | 56 |
| 6.3.1 | <i>N</i> -[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid..... | 56 |
| 6.3.2 | <i>N</i> -[5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]benzamid..... | 58 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.4 | Jednotlivé syntézy močovin..... | 60 |
| 6.4.1 | 1-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)fenyl]-3-ethylurea..... | 60 |
| 6.4.2 | 1-[5-chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)]-3-fenylurea..... | 62 |
| 6.5 | Jednotlivé syntézy karbamátů..... | 64 |
| 6.5.1 | Ethyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát..... | 64 |
| 6.5.2 | Fenyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát..... | 66 |
| 7 | Biologické Testování..... | 68 |
| 7.1 | Hodnocení antimikrobní aktivity..... | 68 |
| 7.1.1 | Chemikálie a kmeny..... | 68 |
| 7.1.2 | Obecný princip měření antimykobakteriální aktivity..... | 68 |
| 7.2 | Hodnocení inhibiční aktivity cholinesteráz..... | 69 |
| 7.2.1 | Ellmanova metoda..... | 69 |
| 7.2.2 | Chemikálie a vybavení..... | 70 |
| 7.2.3 | Postup měření..... | 71 |
| 7.2.3.1 | Stanovení aktivity AChE a BuChE..... | 71 |
| 7.2.3.2 | Stanovení IC ₅₀ | 71 |
| 7.2.3.3 | Stanovení typu inhibice enzymu..... | 72 |
| 8 | Výsledky a diskuze..... | 73 |
| 8.1 | Design cílových molekul..... | 73 |
| 8.2 | Syntetická část..... | 74 |
| 8.3 | Antimikrobní aktivita..... | 76 |
| 8.4 | Inhibiční aktivity vůči cholinesterázám..... | 79 |
| 8.4.1 | Typ inhibice triklosanu..... | 81 |
| 9 | Závěr..... | 84 |
| 10 | Seznam obrázků..... | 85 |
| 11 | Seznam tabulek..... | 87 |
| 12 | Seznam schémat..... | 88 |
| 13 | Literatura..... | 89 |

2 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|------------------|---|
| AChE | acetylcholinesteráza |
| ACP | acyl carrier protein |
| Ag | antigen |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome (syndrom získaného selhání imunity) |
| ATCh | acetylthiocholin |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| BTCh | butyrylthiocholin |
| BuChE | butyrylcholinesteráza |
| DCM | dichlormethan |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxynucleic acid (deoxynukleová kyselina) |
| EMB | ethambutol |
| ETH | ethionamid |
| EthR | mykobakteriální transkripční represor |
| FAS | fatty acid synthase (syntáza mastných kyselin) |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti) |
| IC ₅₀ | inhibiční koncentrace, která snižuje aktivitu enzymu na 50 % |
| INH | izoniazid |
| InhA | enoyl-ACP-reduktáza <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| IS | inzerční sekvence |
| KatG | kataláza/peroxidáza <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| LSC | kapalinová adsorbční chromatografie |
| MDR | multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence) |

| | |
|--------|---|
| MDR-TB | lékově multirezistentní tuberkulóza |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| MTVAC | živá oslabená vakcína <i>M. tuberculosis</i> |
| NADH | nikotinamidadenin dinukleotid |
| NAT | <i>N</i> -acetyltransferáza |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PBS | fosfátový pufr |
| PCR | polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce) |
| PZA | pyrazinamid |
| RNA | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina) |
| RPM | rifampicin |
| r-RNA | ribozomální RNA |
| rt-PCR | real-time PCR (kvantitativní PCR) |
| SI | index selektivity |
| STM | streptomycin |
| TBC | tuberkulóza |
| TCH | hydrazid kyseliny thiofen-2-karboxylové |
| TEA | triethylamin |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| UV | ultrafialové záření |
| XDR-TB | lékově extenzivně rezistentní tuberkulóza |
| WHO | World Health Organization (Světová zdravotnická organizace) |

3 ÚVOD

Regulace buněčné aktivity na enzymatické úrovni je druhým nejčastějším farmakodynamickým typem mechanismu účinku léčiva. Enzym je specifický biokatalyzátor, který v buněčném organismu ovlivňuje mnoho důležitých metabolických pochodů. Slouží např. ke zpracování potravy, k degradaci a syntéze bílkovin, lipidů, sacharidů, účastní se syntézy RNA nebo DNA a mnoho dalších významných biochemických dějů. V enzymatických reakcích snižuje aktivační energii, tudíž danou reakci urychluje. Enzymy se podle jejich charakteru reakcí dělí na různé skupiny, a to na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Léčiva mohou působit na enzymy buď aktivačním (zvyšují aktivitu), či inhibičním (snižují aktivitu) účinkem. Inhibiční mechanismus léčiv je ve farmakologii poměrně běžný. Příklady nejčastějších inhibitorů využívaných jako léčiva jsou inhibitory cyklooxygenázy (k léčbě zánětů a bolesti), inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (k léčbě hypertenze), inhibitory cholinesteráz (k léčbě Alzheimerovy nemoci), inhibitory koagulačních faktorů (antikoagulancia) apod. Inhibice enzymů může být vratná nebo nevratná. [1] [2]

Mezi nejstarší choroby, které doprovází lidstvo již po staletí, se řadí tuberkulóza (TBC), která způsobuje závažné infekční a multiorgánové onemocnění postihující především plíce. Původcem choroby jsou acidorezistentní kmeny bakterií *Mycobacterium tuberculosis* komplex. [3] První, kdo objevil a popsal bakteriálního původce TBC, byl německý lékař a mikrobiolog Robert Koch, který získal za tento významný objev roku 1905 Nobelovu cenu. Na jeho počest nazvali acidorezistentní tyčinku jako Kochův bacil. [4]

TBC je celosvětově rozšířenou infekcí a podle nejnovějšího reportu Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2020 je zhruba jedna čtvrtina světové populace touto nemocí infikována. Každý rok je zaznamenáno 8 až 10 milionů nových pacientů a zhruba 2 miliony nemocných na tuto chorobu umírá. Nejvíce nakažených TBC jsou lidé z rozvojových zemí a oblastí, jako jsou Afrika, jihovýchodní Asie, východní Evropa a jižní Amerika. [5] [6]

Zásluhou vědeckých objevů včetně kombinací antituberkulotik, možností vakcinace, kvalitních a spolehlivých diagnostických metod se podařilo snížit počet nemocných a zvýšit tak počet vyléčených pacientů. I přesto je ale problematika TBC a mykobakterií stále aktuální a ve světě se dostává znovu do popředí zájmu, a to především kvůli v posledních letech výrazně zvýšené rezistenci na antibiotika způsobených mutací kmenů *Mycobacterium tuberculosis*. [7] Proces od diagnózy TBC až po její léčbu o nemocné je i finančně velmi náročný a jednotlivé státy tato problematika může v budoucnosti nejen sociálně, ale i ekonomicky zasáhnout. V neposlední řadě je důležité zmínit i sníženou kvalitu života u pacientů trpících touto

chorobou.

Kromě nebezpečných infekčních chorob lidstvo ve 21. století aktuálně trápí i různá neurodegenerativní onemocnění v podobě demencí, protože se lidská populace dožívá mnohem vyššího věku než kdysi v minulosti. Mezi nejčastěji diagnostikované demence u starších lidí nad 60 let se řadí Alzheimerova choroba nebo demence při Parkinsonově chorobě. Odhaduje se, že demencí ve světě trpí zhruba 900 milionů lidí, v České republice se jedná zhruba o 100 000 osob. Některé studie uvádí, že za 20 let se počet lidí trpící demencí může až zdvojnásobit. [8] [9]

Faktu, že jsou určité sloučeniny schopné inhibovat cílový enzym nebo enzymy, využívá i tato diplomová práce, a experimentální část práce se o tyto poznatky opírá. Jedním z řešení problematiky rezistence na antituberkulotika je např. příprava nových potenciálních antimykobakteriálních léčiv/sloučenin nebo chemická modifikace již aplikovaných antituberkulotik, kterými se i naše výzkumná skupina na katedře organické a bioorganické chemie již dlouhodobě zabývá. Kromě výzkumu nových potenciálních antituberkulotik se naše katedra zabývá i syntézou potenciálních inhibitorů cholinesteráz, konkrétně jde o acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BuChE), které by mohly být využívány jako léčiva aplikovatelná k léčbě nebo zpomalení progresu Alzheimerovy nemoci či jiných neurodegenerativních chorob. Řada zde dříve připravených sloučenin vykazala duální biologickou aktivitu – antimykobakteriální účinky v kombinaci s inhibicí obou cholinesteráz. Cílem této diplomové práce je navázat na jejich výzkum a pokračovat v syntéze a studiu biologické aktivity nových sloučenin.

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je shrnout základní fakta související s TBC (výskyt, průběh onemocnění s klinickými příznaky, možnosti diagnózy a aktuální léčba, problematika rezistence na antibiotika, možnosti řešení rezistencí na antituberkulotika) a nové poznatky z výzkumů zaměřujících se na inhibitory cholinesteráz a antimikrobiálně aktivní sloučeniny, a posléze tyto informace sumarizovat a interpretovat do kapitoly s názvem Teoretická část.

Cílem praktické části je příprava a charakterizace nových potenciálních inhibitorů vybraných enzymů odvozených od triklosanu, které by mohly být vhodnými kandidáty jakožto potenciální léčiva využitelná k terapii TBC, popřípadě i Alzheimerovy nemoci.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Tuberkulóza

5.1.1 Základní charakteristika

TBC, v minulosti nazývaná jako souchotiny, je stále jedním z nejsmrtelnějších infekčních onemocnění 21. století. [3] Postihuje především plíce jakožto hlavní bránu umožňující vstup infekčního agens do těla. Původcem onemocnění je komplex obligátních patogenů nazývaných jako *Mycobacterium tuberculosis* komplex. [7] Do této skupiny se řadí několik navzájem si příbuzných mykobakterií, a to *Mycobacterium tuberculosis*, které bylo poprvé identifikováno v roce 1882, dále *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* a *Mycobacterium pinnipedii*. Byly provedené experimenty na molekulárně biologické úrovni pomocí sekvenování druhé generace, kde se dokázalo, že si jsou tyto jednotlivě vyjmenované mykobakterie podobné v tandemových sekvencích. Je tedy nově přípustné všechny tyto mykobakterie označovat za jednotný druh, a to jako *Mycobacterium tuberculosis*. [10] Statisticky nejčastěji diagnostikovanými původci TBC je *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*. V České republice je *M. bovis* detekována výjimečně, ostatní druhy mykobakterií se na našem území nacházejí relativně vzácně. [7] [11]

5.1.2 Původce

Mycobacterium tuberculosis je nepohyblivá, acidorezistentní, nesporeující a pomalu rostoucí tyčka patřící do rozsáhlého rodu *Mycobacterium* zahrnujícího více než 50 druhů. Existuje v podobě rovné nebo prohnuté tyčky, která je zhruba 0,5 μm silná a až 3 μm dlouhá. Ve světelném mikroskopu ji lze spatřit ve tvaru vláken a protáhlých koků. V Šulově tekuté půdě, jakožto v hydrofilním prostředí, tvoří shluky provazcovitých mikrokolonií podobné vločkám. Tyčky mykobakterií nejsou barvitelné dle Grama. Důvodem tvorby shluků a nebarvitelnosti Gramovým barvením je hydrofobicita povrchu buněk. Ten v sobě obsahuje velké množství lipidů, především tuhých vosků. Díky lipofilnímu povrchu jsou také mykobakterie poměrně odolné vůči lysozomálním enzymům makrofágů. Tato výhoda je jedním z důvodů přežívání mykobakterií v organismu. Buněčné stěna je tvořena dalšími lipidy jako jsou fosfolipidy, glykolipidy (dimykolát trehalózy, označovaný podle Blochema jako cord-faktor), lipoproteiny a především mastnými kyselinami s délkou řetězce pohybující se mezi 60 až 90 atomy uhlíku –

mykolovými kyselinami. [6] [12]

Mezi druhy rodu *Mycobacterium*, které nezpůsobují TBC, patří další významný a patogenní druh způsobující lepru – *Mycobacterium leprae*. Existují další druhy, které jsou nepatogenní a jsou důležitou součástí mikrobiální složky přirozených biotopů. [6] [12]

Mycobacterium bovis BCG je záměrně oslabený nevirulentní kmen a jeho izolát se využívá jako vakcína proti TBC. Pojem kalmetizace je specifické označení pro očkování proti TBC. Po očkování mohou však nastat komplikace, u osob s imunodeficitem vedoucí až ke generalizované diseminaci. Očkování není sice 100% ochranou před onemocněním, ale zmírňuje průběh komplikovaných a akutních forem TBC, a to zejména při nebezpečné tuberkulózní meningitidě. Problém nastává při postupném snižování imunity organismu s odstupem od kalmetizace. [3] [6] [13]

Mykobakterie způsobující TBC jsou v prostředí v běžných podmínkách životaschopné 1 až 2 hodiny a jsou spolehlivě zlikvidovatelné UV zářením a teplotou nad 60 °C. Jako intracelulární patogen způsobují chronické infekce. [3] [12]

5.1.3 Epidemiologická situace

5.1.3.1 Svět

TBC je jedním z nejnebezpečnějších a globálně rozšířených infekčních onemocnění. Podle nejnovějších dat z reportu vydaného roku 2020 WHO odhaduje, že až jedna čtvrtina populace je nakažená touto nemocí. Většina infikovaných lidí má latentní formu TBC a mohou být bezpříznakovými přenašeči. Cělosvětově se odhaduje, že každým rokem přibývá přibližně 10 milionů (v rozpětí mezi 8 až 11 miliony) nových případů a v posledních letech toto číslo velmi pomalu klesá. Z celkového počtu postižených lidí TBC 8,2 % lidí trpělo zároveň i HIV. Z geografického hlediska se jednalo nejvíce o lidi z oblastí, jako je jihovýchodní Asie (44 %), Afrika (25 %) a západní Pacifik (18 %). Naopak menší výskyt TBC byl zaznamenán ve Středomoří (8,2 %), ve Spojených státech amerických (2,9 %) a v Evropě (2,5 %). V roce 2019 na TBC zemřelo 1,2 milionů lidí s HIV negativitou, což je ve srovnání s rokem 2000 příznivé číslo, jelikož v daném roce zemřelo 1,7 milionů HIV negativních lidí na TBC. V roce 2019 zemřelo na TBC 208 000 lidí, kteří byli HIV pozitivní. Toto číslo také od roku 2000 kleslo, jelikož v tomto roce zemřelo 678 000 lidí. Kvůli zvýšené migraci obyvatel z rizikových zemí, cestování po celém světě, šíření a nárůstu infekce HIV/AIDS, zvyšujícímu se počtu multirezistentní kmenů (MDR) a omezení nebo eliminaci systémů dohledu a kontroly nad TBC

došlo ve světě k jejímu znovurozšíření. Téměř u půl milionů lidí se vyvinula rezistence na rifampicin (RPM), a z toho 78 % lidí mělo lékově multirezistentní tuberkulózu (MDR-TB). WHO stanovila cíl ve světě vymýtit TBC do roku 2050. [3] [5] [6]

5.1.3.2 Česká republika

Díky celostátnímu povinnému očkování byl do roku 1990 výskyt TBC příznivý, následně do roku 1997 výskyt narůstal, v dalších letech došlo k poklesu počtu nemocných. Kvůli příznivé statistice po roce 1997 došlo ke změně v přístupu vakcinace a v roce 2010 vyšla novela, která vedla k celoplošnému zrušení povinného očkování proti TBC. Od té doby se očkují pouze ty děti, které byly v častém kontaktu s rizikovým okruhem. [6] [11] Změna měla ale negativní důsledky, které vedly v roce 2014 k hlášení 514 nových případů onemocnění a k návratu aktivní TBC všech forem, přičemž z 85 % se jednalo o TBC plic. [3]

Dle nejnovějších dat v roce 2019 bylo zaznamenáno 464 nových případů onemocnění TBC všech forem, což znamená 4,3 případů na 100 000 obyvatel. Z celkového počtu bylo 91,6 % (425) pacientů trpící plicní formou. V porovnání s rokem 2018 se počet nově hlášených nemocných zvýšil o 20 případů. Ze všech případů z roku 2019 bylo 21 lidí již dříve jednou léčeno na TBC pomocí antituberkulotik. V Praze je dlouhodobě od roku 2014 statisticky zaznamenán největší výskyt nemocných. TBC postihuje všechny věkové kategorie, avšak nejvyšší nemocnost je ve věkových skupinách mezi 45 až 64 lety. Dvě třetiny z celkových nemocných jsou muži a jedná se hlavně se o migranty ze zemí, jako jsou Ukrajina (38 osob), Vietnam (14 osob), Rumunsko (23 osob), Slovensko (11 osob) a Mongolsko (10 osob). Nemalou skupinu infikovaných tvoří tzv. profesní nákazy, která je tvořena především pracovníky zdravotnických a sociálních zařízení. V roce 2019 na TBC zemřelo 16 lidí. ČR se přesto řadí mezi státy v Evropě s nejnižším počtem nakažených, a to díky rychlým a spolehlivým diagnostickým metodám, kvalitním zdravotnickým zařízením a péči. [14]

5.1.4 Zdroj nákazy

Hlavním zdrojem nákazy je samotný infikovaný člověk s mikroskopicky pozitivní přítomností původce ve sputu. Infikovaný jedinec může při dlouhodobému kontaktu nakazit až 50 % vystavených zdravých jedinců. Nakažení bez mikroskopické positivity ve sputu mohou nakazit zhruba 6 % zdravých osob. Mezi dalšími zdroji nákazy patří domácí nebo divoká zvířata a živočišné chování v zoologických zahradách. Skot se v ČR po eliminaci bovinní TBC již

neřadí mezi zdroje nákazy. [3] [11]

5.1.5 Přenos infekce

TBC se šíří především kapénkami od nakaženého pacienta. Opakovaným kontaktem s nemocným se pravděpodobnost nakažení zvyšuje. V zemích, kde je zavedena povinná pasterizace mléka (tedy i v ČR), je alimentární přenos téměř nulový. Dalším způsobem přenosu infekčního původce je prostřednictvím kontaminovaných předmětů přes porušenou sliznici nebo kůži. Pro člověka je infekční dávkou 3 až 300 bacilů. [3] [6] [7] [11]

5.1.6 Inkubační doba

Doba se pohybuje od 2 až 12 týdnů. Po 3 až 8 týdnech od kontaktu s infikovaným jedincem nebo po očkování BCG se objevuje kožní reaktivita na tuberkulín. [3] [6] Tuberkulín je přečištěný antigenní protein skládající se ze tří bílkovinných frakcí z původců TBC. Neobsahuje tedy živé bakterie a používá se k vyvolání hypersenzitivní kožní reakce projevující se velikostně přesně definovanými červenými vypouklými „boulemi“ pouze u pacientů, kteří jsou nakaženi. U osob, které byly kalmetizovány, je tuberkulínová reakce také pozitivní, ale velikost reakce je odlišná od probíhající infekce. [15] [16]

5.1.7 Vnímavost k infekci

Nejvíce vnímaví k TBC jsou děti v raném dětství (do prvního roku), těhotné ženy, lidé se zanedbanou hygienou a sníženou životní úrovní (např. bezdomovci), polymorbidní jedinci a lidé se sníženou imunitou (např. AIDS). U mužů je výskyt TBC častější než u žen a mají obecně závažnější průběh nemoci. [3] [11]

5.1.8 Patogeneze a klinické příznaky

Průběh onemocnění závisí na množství dávky a virulenci pronikajících bakterií, opakovanosti kontaktu s infikovaným a stavu imunitního systému jedince. Na základě těchto vyjmenovaných faktorů mohou nastat tři situace. [3] [6] [16]

5.1.8.1 Jedinec nebyl infikován

Do organismu se dostalo velmi malé množství mykobakterií a jejich virulence byla nízká, kontakt s infikovaným byl jednorázový nebo imunitní stav jedince se dokázal ubránit pronikajícím bakteriím. Nedošlo tedy k nákaze a tuberkulinový test je negativní. [3] [6] [16]

5.1.8.2 Asymptomatická infekce

Mykobakterie pronikly do organismu a usídlily se v buňkách, ale organismus zdravého jedince dokázal čelit vzniku nemoci. Je to dáno rovnováhou mezi makroorganismem jedince a mikroorganismem. Nebezpečí této situace tkví v latentnosti přenašeče infekce. Tuberkulinový test by byl pozitivní. [3] [6] [16]

5.1.8.3 Manifestní TBC

Infikovaný jedinec byl např. v opakovaném styku s nemocným člověkem s vysoce virulentními mykobakteriemi, měl sníženou odolnost imunitního systému kvůli jiným závažným infekcím (např. černému kašli nebo spalničkám) nebo při dlouhodobém užívání kortikoidů, cytostatik či jiných imunopresiv. Podle klinických projevů se manifestní TBC dále dělí na primární a postprimární. [3] [6] [16]

5.1.8.3.1 Primární TBC

Primární TBC se vyznačuje vznikem primárního komplexu, který je tvořen zánětlivým ložiskem a postihuje především regionální uzliny. To vede ke vzniku peribronchiální a perivaskulární lymfangoitidy (zánět lymfatických cév) a specifické lymfadenitidy (zánět lymfatických uzlin). Tato zánětlivá ložiska odpovídají místu proniknutí infekčního agens do organismu. Ložiska se časem opouzdří a kalcifikují. Bakterie zde řadu let mohou perzistovat a nemoc může mít latentní průběh, ale později může kdykoli vypuknout tzv. endogenní reaktivační infekce. Bakteriální komplex je lokalizována hlavně v plicích. [3] [6] [7] [16]

5.1.8.3.2 Postprimární TBC

Postprimární infekce se objevuje u osob, které již v minulosti prodělaly primární TBC. Dochází k rozšíření bakterií hematogenní a lymfatickou cestou do dalších míst v těle, především

aspiračních metastáz do dýchacích cest, což vede k vykašlávání sputa. Dále se šíří do laryngu, střev, urogenitálního ústrojí, kloubů, kostí, do centrální nervové soustavy atd. [4]

TBC v pokročilém stádiu může mít mnoho klinických projevů. Mezi nejčastějšími objektivními projevy jsou kašel, dušnost, hemoptýza (vykašlávání krve), zvýšená teplota, hubnutí, únava, pocení, bolesti na prsou a podle specifické formy TBC a lokalizace postiženého orgánu se mohou objevit další klinické příznaky. [3] [6] [7] [16]

5.1.9 Základní vyšetřovací diagnostika TBC

Diagnostika TBC je poměrně složitá a komplexní. Skládá se z několika kroků a postupů, které se vzájemně doplňují. Při stanovení diagnózy se lékaři opírají kromě klinického obrazu o tato tři základní kritéria: epidemiologickou souvislost, pozitivní tuberkulínovou reakci a rentgenový snímek plic. Dalším důležitým a rozhodujícím pilířem stanovení etiologie je přímý i nepřímý laboratorní bakteriologický průkaz z biologického materiálu. [6] [7] [16]

Při vyšetřování epidemiologické souvislosti se lékaři zabývají tím, kde pacient v minulosti pobýval nebo se v současnosti zrovna nachází, s jakými kontakty je často ve styku a jaké jsou jeho hygienické návyky a životní úroveň. Zdrojem nákazy bývají častěji muži než ženy, proto je více pacientů trpících TBC mužského pohlaví. [6] [7] [16]

Diagnostika tuberkulínovým testem spočívá v lokálním podání tuberkulínu. Existují dva způsoby provedení tuberkulínové zkoušky: perkutánní (průchodem přes svrchní část kůže) masťovou reakcí podle Monrada nebo intrakutánní (nitrokožní) tuberkulínová zkouška podle Mantoux. [6] [16]

Masťová reakce dle Monrada se již v posledních letech nepoužívá, jelikož se masť již v ČR nevyrábí. Zhruba před třiceti lety se ještě používala u novorozenců k ověření vzniku postvakcinační alergie po kalmetizaci. [16]

Zkouška dle Mantoux byla roku 1958 prohlášena jako nejlepší způsob aplikace tuberkulínu. Komerčně dostupná látka tuberkulín se injikuje do levého předloktí na vydezinfikovanou a odmaštěnou kůži speciálními jehlami a injekčními stříkačkami, které jsou na jedno použití. Dezinfekční prostředek musí být nebarevný, doporučuje se lihobenzín. Pokud byla aplikace provedena správně, v místě vpichu vznikne hrbolek. Reakce se odečítá a hodnotí po 2 až 3 dnech. U pacientů ležících na lůžkovém oddělení se doporučuje odečítat 5 dní po sobě, tj. každých 24 až 120 hodin. Důvodem těchto odečítajících intervalů je výraznější pozorování patnosti dynamiky rozvoje tuberkulínové reakce, případně rychlost jejího ústupu. Pokud je infiltrát menší než 5 mm, závěr po hodnocení testu je negativní. Naopak vznik

infiltrátu většího než 15 mm se hodnotí jako postinfekční reakce. V případě velikosti infiltrátu pohybující se mezi 6 až 10 mm se hodnotí jako postvakcinační reakce. U malých dětí je hodnocení odlišné a parametry infiltrátu jsou menší. [2] [16]

Existují i kontraindikace tuberkulínové zkoušky. Tento test se nesmí provádět u osob, kteří jsou ve stejné době léčeni kortikoidy nebo jsou ozařováni při radioterapii, u osob s kožními onemocněními se zjevnými klinickými příznaky (např. ekzém, pyodermie, urtika), u osob s akutními onemocněními s vysokými horečkami a u osob, u kterých se projeví těžké alergické reakce. [6] [16]

Třetím základním kritériem ke stanovení diagnózy je radiologické vyšetření plic prostřednictvím zobrazovacích technik. K průkazu plicní formy TBC je také potřeba zhotovit hloubkové snímky plic (tomogramy) minimálně ve dvou vrstvách kvůli nálezu zvětšení hilových uzlin. [6] [7] [16]

5.1.10 Laboratorní a bakteriologický průkaz TBC

Bakteriologický laboratorní průkaz z patologického materiálu je rozhodujícím vyšetřením pro určení a potvrzení příčiny, resp. původce onemocnění. U dětí je přímý bakteriologický průkaz obtížnější než u dospělých, jelikož malé děti (do tří let) nevykašlávají sputum. K průkazu mykobakterií se využívají přímé a nepřímé metody. Do přímých metod patří mikroskopie, kultivace kmene na vaječné půdě a aktuálně jsou v mykobakteriální laboratorní diagnostice uplatňovány i molekulárně genetické metody. Mezi nepřímé metody se řadí pokus na zvířatech a imunologické testy (Quantiferonový test a detekce specifických protilátek). Pokud je průkaz úspěšný, provádí se následně druhová identifikace a vyšetření citlivosti bakteriálního kmene na obvyklá antibiotika/antituberkulotika. Velmi důležité je správné provedení odběru vzorku k vyšetření. [16] [17] [18]

5.1.10.1 Odběr materiálu a transport vzorku do laboratoře

Základním a nejčastěji vyšetřovaným materiálem je sputum, eventuálně tekutina získaná bronchoalveolární laváží. Vyšetření se provádí i při podezření na extrapulmonární (mimoplicní) případy TBC. Samotný odběr se provádí do sterilních širokých plastových nádobek s červeným víčkem, tzv. „sputovek“. Je velmi důležité provést odběr sputa kvalitně, jelikož u pacientů, kteří špatně vykašlávají, je záchytnost mykobakterií ze sputa nižší. V těchto případech je vyšetření doplněno imunologickými nebo molekulárně-biologickými metodami.

Sputum se má vykašlávat z dolních cest dýchacích a nesmí být smícháno s velkým množstvím slin ani nosním výměškem. Objem sputa by měl být alespoň 2 až 5 ml. [16] [17]

Dalším vyšetřovaným materiálem k průkazu mykobakterií je moč, a to především pokud pacient trpí urogenitální formou TBC. Vyšetření moče může být doplňujícím vyšetřením při podezření na mimoplicní formu TBC. Z moče je ale záchytnost mykobakterií kvantitativně nižší. Moč se odebírá v ranních hodinách ze středního proudu o objemu 50 až 100 ml do sterilních zkumavek a v dalších dnech musí být moč nejméně ještě odebrána a vyšetřena dvakrát. [16] [17]

Dalšími doplňujícími vyšetřovanými materiály jsou např. pleurální, peritoneální, perikardiální výpotky, likvor, sekret z abscesů nebo píštělí, laryngeální výtěry, žaludeční laváže, tracheální a bronchiální výplachy, menstruační krev, punktát z dřene nebo sleziny, stolice nebo bioptický a sekční materiál. Tyto vzorky se vyšetřují opět při podezření na mimoplicní formu TBC nebo při hematogenní formě TBC. Obecně se k těmto doplňujícím vyšetřovaným materiálům zařazuje automaticky i vyšetření ze sputa, neboť může být záchytnost mykobakterií z těchto jiných materiálů menší. [16] [17]

K provedení imunologických testů se odebírá krev do speciálních zkumavek bez protisrážlivého činidla. Krev bude tedy v nativní podobě. [17]

Všechny odebrané vzorky musí být okamžitě po odběru přepraveny do laboratoře ke zpracování ještě v den odběru. Vzorky nesmí být vystaveny přímému slunečnímu záření a světlu, jelikož tyto světelné vlivy mohou bakterie zničit a tím znehodnotit spolehlivost vyšetření. [17]

5.1.10.2 Přímý mikroskopický průkaz

Mikroskopický průkaz je základní vyšetřovací metodou a provádí se z přímého nátěru infekčního materiálu, především ze sputa. Vyšetření se opírá o charakteristické morfologické vlastnosti bakterie a její tinkční schopnosti (schopnost přijímat barvu). Malé množství materiálu se kličkou natře na podložní sklíčko, nechá se uschnout, zafixuje se nad kahanem nebo pomocí methanolu a následně se obarví podle Ziehl-Neelsena horkým karbolfuchsinem, odbarví kyselinou, a nakonec se kontrastně methylenovou modří nebo malachitovou zelení dobarví ostatní nespecifické struktury. Ve světelném mikroskopu jsou mykobakterie červené na zeleném pozadí. Vyšetření se provádí pod imerzním objektivem na 100 zorných polí. [6] [12]

Nátěr lze také obarvit speciálním fluorescenčním barvivem (auraminem) za tepla,

odbarví se následně kyselým alkoholem a v posledním kroku se dobarví fuchsinem. Nátěr se pozoruje fluorescenčním mikroskopem s UV lampou, která vyvolá sekundární fluoreskující viditelné záření. Zde stačí menší zvětšení (160 až 400×) a provádí se na 25 až 50 zorných polí. [6] [12]

Výhodou přímé mikroskopie je její rychlost a specifita. Již do hodiny lze zjistit předběžný orientační výsledek. Naopak nevýhodou této metody je její nízká citlivost, jelikož k získání pozitivního nálezu je potřeba, aby v 1 ml vzorku bylo alespoň 10^5 mikrobů. Nález z mikroskopie se hodnotí kvantitativně (Tabulka 1). [6] [12] [16] [17]

Tabulka 1 Kvantitativní hodnocení mikroskopického nálezu

| | |
|-----|--|
| - | 1-9 tyčinek v nátěru |
| + | 10-20 |
| ++ | 21-100 (tj. 1-10 v každém zorném poli) |
| +++ | více než 100 (tj. více než 10 v každém poli) |

Negativní nález však nevylučuje TBC a mikroskopie musí být doplněná ještě kultivační metodou. [17]

5.1.10.3 Kultivační průkaz

Kultivační průkaz zvyšuje citlivost vyšetření až na dvojnásobek v porovnání s přímou mikroskopií mykobakterií. K úspěšné kultivaci je potřeba minimální koncentrace bacilů 10^2 v 1 ml. Vysoká výtěžnost této metody je ale v praxi omezená negativními vlivy, jako je např. způsob transportu vzorku, kvalitou kultivační půdy, a především správnými postupy sloužící k dekontaminaci původní přirozené mikroflóry v odebraném materiálu. Při špatném laboratorním postupu a vlivem jmenovaných nepříznivých faktorů dochází až k 90% ztrátě životaschopnosti mikrobů z vyšetřovaného vzorku. Při dekontaminaci průvodní mikrobiální flóry se nejčastěji používá samotný 4% roztok hydroxidu sodného nebo jeho nižší koncentrace v kombinaci s jinými detergenty. Následuje další krok, který vede k centrifugaci, a vzniklý sediment se očkuje bakteriologickou kličkou na půdy. Ke kultivaci *M. tuberculosis* se používá nejčastěji pevná Löwenstein-Jensenova půda. Půda obsahuje vaječnou emulzi v roztoku biogenních solí s glycerolem koagulovanou při 85 °C. Dále se ke kultivaci používá Šulova tekutá pomnožovací půda, která kromě biogenních solí obsahuje navíc kaseinový hydrolyzát a hovězí sérum, které slouží jako zdroj dusíku. [4] [13]

Výhodou pevné půdy je její lepší budoucí zisk čisté kolonie, která se dá následně přeočkovat, a naopak nevýhodou je nižší kvantita narostlých kolonií. Výhodou tekuté pomnožovací půdy je její vyšší výtěžnost bakterií, ale nevýhodou je menší čistota samotné cílové bakteriální kultury. Obecně nevýhodou kultivace na obou půdách je délka jejich kultivace a inkubace, jelikož mykobakterie rostou velmi pomalu. Půdy se inkubují v termostatu při 37 °C, nejlépe v atmosféře s příměsí 5 % oxidu uhličitého. Výsledky se předběžně odečítají až za 3 týdny a po 6 týdnech se výsledek může uzavřít. Negativní půdy bez narostlých kolonií se nechávají ještě další 3 týdny v tzv. prodloužené kultivaci. Mykobakteriální kmeny, které jsou již mikroskopem viditelné z čerstvě odebraného materiálu, narostou už po 3 týdnech. Kmeny, které se označují jako dysgonické (např. *M. bovis* nebo jiné kmeny rezistentní na antituberkulotika), nebo kmeny získané z malého inokula, rostou pomaleji nebo dokonce ztrácí schopnost se množit. Některé mykobakterie vyžadují jiné podmínky k růstu. Např. *M. marinum*, které nezpůsobuje TBC, ale u člověka může vyvolat vážné kožní onemocnění, vyžaduje nižší teplotní optimum. *M. paratuberculosis*, které způsobuje paratuberkulózu, potřebuje k růstu přítomnost růstových faktorů (mykobaktin nebo extrakty z mykobakteriálních kultur) nebo netuberkulózní *M. haemophilicum* potřebuje hemin, resp. přímo lidskou krev. [6] [16]

Při odečítání se narostlé mykobakteriální kultury hodnotí makroskopicky a kvantitativně. Stupeň pozitivity se určuje počtem narostlých kolonií (Tabulka 2).

Tabulka 2 Kvantitativní hodnocení narostlých kolonií na pevné půdě

| | |
|-----|----------------------|
| - | 1-9 kolonií |
| + | 10-19 kolonií |
| ++ | 20-99 kolonií |
| +++ | více než 100 kolonií |

Aby byla tekutá půda vyhodnocena jako negativní, musí být bez zákalu. Hodnotí se dále i vzhled a velikost kolonie, její pigmentace, které jsou důležitou diferenciální vlastností jednotlivých typů mykobakterií. [6] [16]

Laboratorní diagnostiku lze provádět také pomocí automatizovaných systémů, které jsou založené na principu detekce oxidu uhličitého, který produkují bakterie. Lze i detekovat přítomnost narostlých kultur podle množství spotřebovaného kyslíku. [12]

5.1.10.4 Biologický průkaz pokusem na zvířeti

Tato metoda je ze všech předchozích vyjmenovaných metod nejcitlivější, avšak nejnáročnější a finančně nejnákladnější k průkazu *M. tuberculosis*. Pokus se provádí nejčastěji na morčeti, ale metoda se již běžně v rutinní praxi neprovádí. Průkaz *M. bovis* a *M. avium* nebo dalších atypických mykobakterií lze provést i na králících, myších nebo u slepic. Metoda se praktikuje, pokud měly vyšetřované materiály nízkou kvantitu mykobakterií nebo u materiálů, které byly získány jednorázově a velmi obtížným způsobem. Další nevýhodou je fakt, že některé kmeny mykobakterií se sníženou virulencí nemusejí vůbec vyvolat TBC a jsou pro různé jednotlivé druhy zvířat nepatogenní. [6] [16]

Při pokusu na morčeti stačí k průkazu bakterií minimální inokulum (10 mikrobů) a za příznivých podmínek může i jeden bacil vyvolat TBC. Při mimořádných situacích se využívají křečci, opice nebo jiná zvířata. Přítomnost bakterií v injikovaném zvířeti vede do 3 až 4 týdnů ke změně tuberkulínové reakce z negativní na pozitivní. Na kůži se může objevit inokulační vřed a regionální uzliny se začnou postupně zvětšovat. Pokud morče nezahyne do 8 týdnů, diethyletherem se usmrtí a pitvou se hodnotí nález v uzlinách, v játrech, ve slezině a plicích. [6] [16]

Pro zajímavost, k průkazu lepry se vzácně používá malého inokula odebraného patologického materiálu do myších tlapek, protože *M. leprae* se ještě nikomu zatím nepodařilo vykultivovat. [6] [16]

5.1.10.5 Průkaz pomocí molekulárně genetických metod

Metody jsou využívány pro jejich rychlost, jelikož výrazně zkracují dobu identifikace mykobakterií. Spolehlivé výsledky lze získat již za 24 až 48 hodin. Metoda je založená na principu hybridizace oligonukleotidové sekvence sondy s cílovou vyšetřovanou sekvencí denaturované DNA nebo RNA mikroba. Tato metoda není k průkazu ale vždy dostatečně citlivá, především u paucibacilárních materiálů, tj. pokud obsahují malé množství bakterií, jež jsou při diagnostice špatně identifikovatelné. Vhodným řešením je nahrazení hybridizačních sond kvantitativní metodou real-time PCR (rt-PCR), při které se velké (1400 bp) cílové sekvence kódujících vysoce konzervovaných genů pro specifické Ag nebo opakující se insertivní sekvence amplifikují. [6] [12]

Odběrový materiál je shodný jako u materiálů určené k mikroskopii a kultivaci. Vzorek ale nesmí být ve zkumavkách za přítomnosti heparinu, který se chová jako inhibitor. Test je

velmi citlivý a spolehlivý. Citlivost rt-PCR metody převyšuje citlivost přímé mikroskopie i kulturační průkaz mykobakterií. Nedochází ke zkřížené reakci s jinými druhy mykobakterií ani s jinými mikroby. [17]

Pokud je výsledek pozitivní, je i přesto potřeba počkat na další opakovaný výsledek, aby se spolehlivě vyloučila laboratorní kontaminace. Při pozitivním nálezem v mikroskopu s kombinací pozitivitu rt-PCR testu je vysoká až absolutní spolehlivost průkazu infekce způsobené *M. tuberculosis*. Negativní výsledek u rt-PCR s pozitivním nálezem v mikroskopu znamená kolonizaci nebo infekci jiným druhem mykobakterií. Opakovaná samotná pozitivita rt-PCR testu s negativním kulturačním průkazem spolehlivě znamená přítomnost *M. tuberculosis*. Při interpretaci a odečítání výsledků je důležité si dát pozor u pacientů, kteří již v minulosti prodělali TBC a byli přeléčeni, jelikož není známo, za jak dlouho je DNA mrtvých mykobakterií ještě zachytitelná, může se tak totiž jednat o falešnou pozitivitu. [17]

5.1.10.6 Průkaz na základě humorální a buněčné imunitní odpovědi organismu

TBC lze prokázat prostřednictvím různé reakce buněčné imunitní odpovědi. Tato *in vitro* metoda je založená na detekci odezvách T-lymfocytů (CD4+ a CD8+) stimulovaných specifickými Ag. T-lymfocyty po stimulaci produkují interferon gamma, který se detekuje spektrofotometricky pomocí enzymově imunochemických metod. Tato metoda je známá pod názvem Quantiferonový test. Krev se nabírá do tří speciálních zkumavek označené jako QuantiFERON®-TB Gold in tube, s tím, že každá zkumavka má jinou barvu víčka. Jedná se o trojkombinaci víček červené, šedé a fialové barvy. Každá zkumavka obsahuje jiné Ag, které specificky stimulují určité T-lymfocyty. [17] [19] [20]

Druhý průkaz je založený na humorální imunitní odpovědi, kdy se analyzují kvalitativně i kvantitativně vzniklé protilátky proti specifickým Ag mykobakterií. Nejčastěji se vyšetřují imunoglobuliny IgG, IgM a zřídka IgA. Vyšetření se provádí ze srážlivé krve a lze ji provést z krve, která byla odebrána do zkumavek určená pro Quantiferonový test. [17]

U aktivního průběhu TBC dochází ke zvýšené stimulaci imunitní odpovědi alespoň z jedné těchto reakcí (aktivace T-lymfocytů nebo vznik protilátek). U hospitalizovaných pacientů ležících na jednotce intenzivní péče lze u Quantiferonového test očekávat falešně negativní výsledek. Důvodem je, že tito pacienti mají slabou buněčnou odpověď, tudíž mají sníženou imunitní reakci i po antigenní stimulaci. Doporučuje se proto při podezření na aktivní formu TBC provést oba testy. I pokud výsledky obou testů budou pozitivní, je vždy potřeba nález potvrdit konfirmačními testy, kam spadá přímá mikroskopie a kultura mykobakterií.

[17] [19] [20]

5.1.10.7 Dodatečně pomocné vyšetřovací metody

Existují další doplňující vyšetření, která slouží k upřesnění diagnózy a k ověření nejednoznačného nálezu, k získání vzorků k laboratornímu vyšetření nebo ke zjištění různých nežádoucích následků způsobených TBC. Patří sem např. bronchoskopické vyšetření, hrudní punkce, funkční vyšetření plic nebo histologické vyšetření. [11] [16]

Do pomocných laboratorních vyšetření řadíme sedimentaci erytrocytů, rutinní a základní biochemické vyšetření krve (minerály, cholesterol, bilirubin, jaterní testy, kreatinin, proteiny akutní fáze atd.), krevní obraz a semikvantitativní vyšetření moče pomocí močových proužků (pH, přítomnost leukocytů a krve atd.). U nekomplikované primární TBC jsou výsledky ve fyziologickém rozmezí. U akutní komplikované formy TBC (tuberkulózní meningitida nebo pleuritida) je zvýšená sedimentace erytrocytů, leukocytóza s posunem doleva a zvýšená hladina proteinů akutní fáze a imunoglobulinů. Tato vyšetření nejsou rozhodujícími k diagnostice TBC, avšak díky nim lze lépe sledovat její průběh a monitorovat vedlejší účinky při terapii léčiv. [11] [16]

5.1.10.8 Typizace jednotlivých druhů

Dříve se identifikovaly jednotlivé druhy mykobakterií pokusem na zvířatech *in vivo* metodou, jelikož každý druh je pro každé zvíře jinak patogenní. Např. *M. tuberculosis* je patogenní pro morče, *M. bovis* pro morče i králíka a *M. avium* pro slepici. Některé kmeny mykobakterií, které jsou rezistentní na isoniazid (INH), mají sníženou virulenci, takže bývají pro testovaná zvířata nepatogenní nebo málo patogenní. To je i jedním z důvodů, proč se od experimentu na zvířatech opustilo a nahradilo se v současnosti laboratorními metodami *in vitro*. Ty jsou založené na průkazu druhové odlišnosti, které jsou dané fenotypickými charakteristickými růstovými znaky, tj. makroskopickou a mikroskopickou morfologií a také různou rychlostí růstu jednotlivých mykobakterií. Např. v mikroskopickém nátěru *M. tuberculosis* tvoří provazce a roste na půdě s přidavkem hydrazidu kyseliny thiofen-2-karboxylové (TCH). *M. bovis* tvoří provazce, ale neroste v přítomnosti TCH. *M. avium* roste při 25 °C i 45 °C. *M. kansasii* je fotochromogenní (vlivem světla tvoří barvu) a roste při 25 °C i 45 °C. Obecně platí, že nepatogenní mykobakterie rostou rychleji (2 až 7 dní) než ty patogenní (3 až 9 týdnů), kam spadají tuberkulózní zástupci *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*

a *M. avium*. [6] [16]

Dále se provádí zkoušky založené na biochemických principech. Nejčastěji využívaným a základním testem je niacinový test, tj. schopnost mykobakterie produkovat niacin. Produkce je vždy pozitivní u *M. tuberculosis* a negativní pro *M. bovis*, *M. avium* a další atypické druhy mykobakterií. Dále to jsou nitrátové (schopnost redukce dusičnanového aniontu), katalázové (bakterie má enzym peroxidázu, která rozloží přidaný peroxid vodíku na kyslík a vodu, výsledkem je tvorba bublinek) a peroxidázové testy (po rozložení peroxidu vodíku vznikající kyslík oxiduje *p*-fenylendiamin za vzniku purpurového indofenolu). [21]

Identifikace jednotlivého druhu mykobakterie lze zjistit také prostřednictvím DNA nebo RNA genetických sond, které jsou založené na principu analýzy polymorfismu restrikčních fragmentů. Tyto oligonukleotidové sondy, které jsou komerčně vyráběny pro *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*, hybridizují s druhově specifickými cílovými sekvencemi. Princip metody je založený na tom, že dochází nejprve k rozložení genomového DNA bakterie určitými restrikčními enzymy, následně se jednotlivé frakce v gelu elektroforeticky rozseparují a po rozdělení se jednotlivé části Southern blotem přenesou na blotovací membránu. Specifickými sondami se nakonec prokazují počty kopií a lokalizují se polohy určité repetitivní inzertní sekvence (IS). Nejčastěji jde o část IS 6110, která byla poprvé nalezená u *M. tuberculosis* a je dlouhá 1358 bp. Tyto screeningové metody spolehlivě odliší izoláty *M. tuberculosis* od jiných klinicky významných i nepatogenních kmenů. [6] [16] [22] [23]

5.1.10.9 Vyšetření citlivosti na antituberkulótika

Do skupiny antituberkulotik 1. řady patří celkem pět léčiv, a to INH (Obrázek 1), RMP (Obrázek 2), pyrazinamid (PZA) (Obrázek 3), streptomycin (STM) (Obrázek 4) a ethambutol (EMB) (Obrázek 5). [6]

Do druhé linie antituberkulotik se řadí např. kanamycin, ciprofloxacin plus další fluorochinolony a thioamidy (ethionamid, prothionamid). [6] [7]

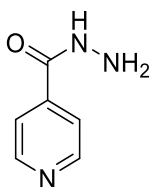
Schopnost růstu kmenů *M. tuberculosis*, které nebyly dosud vystavené působení antituberkulotik, budou při jejich minimálních inhibičních koncentracích potlačena a zastavena. Tyto kmeny se nazývají jako divoké kmeny a jsou považovány za citlivé na antituberkulótika (Tabulka 3). Některé kmeny, které rostou i za přítomnosti vyšších koncentrací konkrétního antituberkulotika, se považují za rezistentní. Rezistence se dělí na primární a sekundární. Primární rezistence je u pacienta, který se ještě nikdy předtím neléčil antituberkulotiky. Primární rezistenci lze také definovat jako intrinsic (vnitřní) a vysvětluje např. rezistenci

mykobakterií k nechráněným penicilinům v důsledku rozsáhlé produkce betalaktamáz. [24] Sekundární neboli získaná rezistence je u pacientů, kteří se v minulosti již léčili antituberkulotiky a došlo u nich ke ztrátě citlivosti na jedno či více léčiv. Rezistenci vysvětluje mutačně selekční teorie. [6] [7] [12] [16]

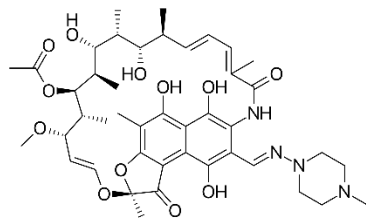
Tabulka 3 Kritická koncentrace esenciálních antituberkulotik

| Léčivo | Kritická koncentrace [mg/l] |
|--------|-----------------------------|
| INH | 0,20 |
| RPM | 5,00 |
| PZA | 400,00 |
| STM | 5,00 |
| EMB | 2,00 |

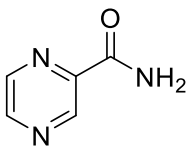
Jednou z možností k určení citlivosti je využívání tzv. proporčních testů. Postup proporčního testu je takový, že se daný bakteriální kmen inokuluje ve dvou ředěních (nejčastěji v 10^{-3} a 10^{-5}) na kontrolní půdě a na půdách, které obsahují antituberkulotika v kritických koncentracích (breakpointech). Po 3 uplynulých týdnech inkubace v termostatu se vypočítá procento rezistentních kmenů. Pokud bude stupeň laboratorní rezistence na dané léčivo vysoký, je třeba ho nahradit jiným. Zajímavým faktem je, že rezistence laboratorní, která se týká zejména netuberkulózních mykobakterií, se nemusí vždy shodovat s rezistencí klinickou. To znamená, že i když jsou mykobakterie *in vitro* citlivé na určitou kombinaci léčiv, v praxi *in vivo* ale nemoc nemusí po podání testovaného léčiva ustupovat a přetrvává. Platí i opačná situace, kdy navzdory zjištěné *in vitro* rezistenci je léčivo *in vivo* účinné. [6] [7] [12] [16]



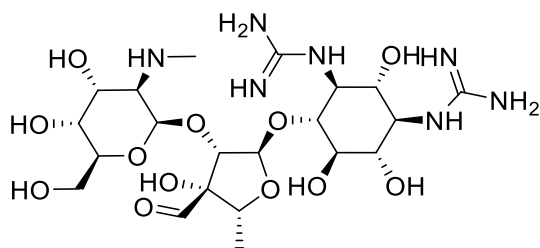
Obrázek 1 izoniazid



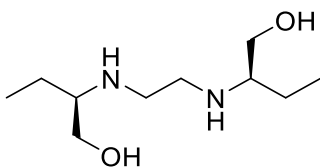
Obrázek 2 rifampicin



Obrázek 3 pyrazinamid



Obrázek 4 streptomycin



Obrázek 5 ethambutol

5.1.11 Terapie TBC

Léčba TBC je velmi náročná a jedná se o dlouhodobou záležitost. Základním pilířem léčby je podávání antimikrobiálních chemoterapeutik, které je doplněné další, komplementární terapií k zachování kvality života. Dalšími cíli jsou zábrana znovuvzplanutí nemoci, nakažení dalších jedinců, vzniku lékové rezistence na antituberkulotika a prevence vzniku pozdních nežádoucích důsledků. U mimoplicních forem jsou navíc častěji prováděné chirurgické zákroky a u stavů s prokázaným imunodeficitem musí být k antimikrobní terapii připojena navíc i imunomodulační léčba, např. podání kortikoidů. Základní řada antituberkulotik zahrnuje INH, RPM, PZA, EMB a STM. Při léčbě TBC je nutné vždy kombinovat více léčiv najednou kvůli zvýšení účinnosti a zabránění možnosti vzniku rezistencí. Druhou, alternativní řadu

antituberkulotik představují aminoglykosidová (amikacin, kanamycin), fluorochinolonová (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin) a polypeptidová (kapreomycin) antibiotika. Do druhé linie dále spadá ethionamid (ETH) a prothionamid, kyselina 4-aminosalicylová, cykloserin, chráněné betalaktamy či betalaktamy stabilní vůči hydrolázám (typicky imipenem u MDR/XDR-TB), klofazimin, klarithromycin nebo linezolid. [6] [7] [12] [25]

Současná strategie terapie je založená na dvou léčebných režimech skládajících se z iniciální a pokračovací fáze. Iničiálně fáze probíhá v podobě hospitalizace v nemocnici na plicním oddělení a trvá minimálně dva měsíce. Podává se kombinace čtyř antituberkulotik (dříve se podávala pětikombinace léčiv), kdy cílem je rychlá debacilizace. Čtyřkombinace se skládá z INH, RPM, PZA a EMB. Další pokračovací fáze probíhá ambulantně a trvá zhruba čtyři měsíce. V této fázi se podává dvojkombinace antituberkulotik (dříve to byla trojkombinace) skládající se z INH a RPM. Při podávání léčiv musí být vždy přítomný lékař nebo zdravotní sestra. Celková délka léčby může trvat v rozmezí od 6 měsíců (u plně citlivé infekce) až 2 let. U některých pacientů, kteří např. trpí MDR-TB, může být léčba až doživotní. [6] [7] [12] [25]

5.1.12 Základní řada používaných antituberkulotik

5.1.12.1 Isoniazid (INH)

Je to hydrazid kyseliny isonikotinové (Obrázek 1) a je nejúčinnějším lékem ze základní řady antituberkulotik. Jedná se o poměrně malou hydrofilní molekulu, která má strukturální podobnost s nikotinamidem, známým též jako vitamin B₃. Existuje v injekční formě, ale v tabletové lékové formě pro perorální podání je preferovanější. Doporučenou dávkou je 5 až 10 mg na 1 kg hmotnosti nemocného. Užívá se jednou denně ráno na lačno. Působí na proliferující intracelulární i extracelulární mykobakterie. Specifický mechanismus baktericidního účinku INH jakožto proléčiva spočívá v jeho aktivaci unikátním mykobakteriálním enzymem katalázou-peroxidázou (u *M. tuberculosis* označována jako KatG), která následně INH změní na isonikotinacylový radikál. Ten se spojí s NADH a výsledkem je vznik isonikotinoyl-NADH komplexu (Schéma 1). [26] Tento komplex se váže na enzym enoyl-ACP-reduktázu a inhibuje tak její aktivitu. U *M. tuberculosis* se tento enzym specificky označuje jako InhA, je důležitý k finálnímu kroku při syntéze mykolových kyselin. Tímto mechanismem zabrání tvorbě buněčné stěny, která dodává bakterií odolnost a schopnost

přežívat v organismu. InhA je součástí systému nazývaného fatty acid synthase II (FAS II), který se nenachází u lidí. [27]

Pokud se neprokáže u nemocného rezistence nebo nesnášenlivost INH, nesmí při terapii TBC v žádné lékové kombinaci antituberkulotik chybět. Nejčastějším vedlejším účinkem při užívání INH je periferní neuropatie, která se projevuje mravenčením končetin a svalovou slabostí. Tomu lze preventivně zabránit tak, že se podává pacientovi navíc vitamin B₆. INH způsobuje totiž zvýšené vylučování pyridoxinu, jelikož reaguje s aktivní formou vitamínu B₆, což je pyridoxal, resp. jeho fosfát, za vzniku Schiffovy baze, resp. hydrazidu-hydrazonu (Schéma 2). Tento vzniklý konjugát je hydrofilní a vylučuje se močí z těla ven. [28] Dalšími nežádoucími účinky jsou bolesti hlavy, nespavost, horečka, kožní vyrážky, jaterní poruchy nebo zvracení. Obecně se u všech léčiv uvádí, že se zvyšováním dávky a délkou užívání se prohlubují nežádoucí účinky. [7] [16] [29]

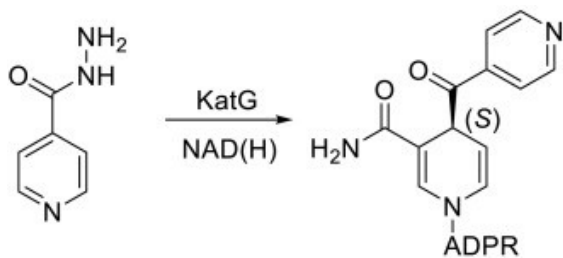


Schéma 1 Vznik isonikotinoyl-NADH komplexu

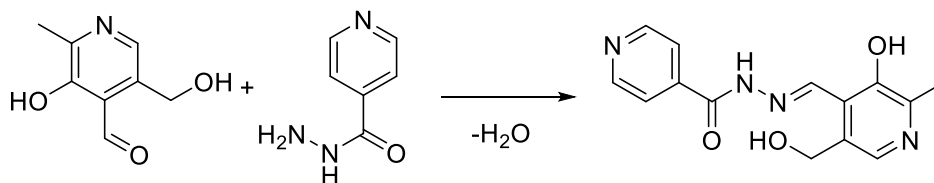


Schéma 2 Reakce pyridoxalu s INH za vzniku hydrazidu-hydrazonu

5.1.12.2 Rifampicin (RPM)

Patří mezi komplexní semisyntetická (polosyntetická) antibiotika (Obrázek 2), jelikož je odvozen od derivátu rifamycinu B, který je produkován grampozitivní bakterií *Streptomyces mediterranei*. Kromě léčby TBC, ve které hraje významnou roli, se uplatňuje při léčbě dalších onemocnění, která jsou způsobena grampozitivními i gramnegativními koky, některými střevními bakteriemi, atypickými mykobakteriemi nebo chlamydiemi. Zkouší se jeho nepřímá imunopresivní účinnost při léčbě leukémie a jiných chorob. [30]

Jedná se o derivát s vysokou molekulovou hmotností a vylučuje se převážně játry, tudíž je farmakokineticky vhodný k léčbě zánětu žlučových cest, avšak spektrem a farmakodynamikou je podstatně méně vhodný. Doporučená dávka je 8 až 12 mg na 1 kg hmotnosti pacienta a tableta se užívá ráno jednu hodinu před jídlem, jelikož současná přítomnost potravy blokuje jeho vstřebávání. RPM působí stejně jako INH na intracelulární i extracelulární mykobakterie baktericidním způsobem, ale musí se podávat společně s dalšími antituberkulotiky. RPM má klíčový účinek i na formy, které se právě aktivně nedělí. Mechanismus účinku spočívá v jeho schopnosti se pevně vázat na DNA-dependentní RNA polymerázu, čímž u bakterií zabrání možnosti transkripce. [7] [16] [29]

Při užívání RPM mohou nastat nežádoucí účinky v podobě hepatotoxicity, poruchy krvetvorby, nevolnosti nebo dochází k neškodnému zabarvení moči, sputa, slz a stolice do oranžové a růžové barvy. [7] [16] [29]

5.1.12.3 Pyrazinamid (PZA)

PZA (Obrázek 3) je sloučenina strukturálně podobná nikotinamidu. Účinkuje výhradně vůči *M. tuberculosis*, *M. bovis* je primárně (přirozeně) rezistentní. V neutrálním pH je neaktivní, ale v kyselém prostředí o pH 5,0 působí silně baktericidně vůči mykobakteriím usídleným v makrofázích. Dávkuje se 20 až 30 mg na 1 kg hmotnosti a užívá se jednou denně perorálně ráno na lačno. Četnými nežádoucí účinky jsou jaterní a renální poruchy, bolesti kloubů nebo zvýšení acidity žaludku. [7] [16] [29]

5.1.12.4 Streptomycin (STM)

Patří mezi aminoglykosidová antibiotika (Obrázek 4) a jako streptomycin sulfát existuje v krystalické podobě. Komerčně je dodáván ve sterilních lahvičkách v podobě kapalné substance po 1 g. STM působí na extracelulárně uložené mykobakterie, protože není schopený se dostat přes cytoplazmatickou membránu buňky. Používá se hlavně při léčbě opakovaných onemocnění TBC, specificky u některých mimoplicních forem TBC nebo při MDR-TB. V ČR se používá zřídka, protože není u nás aktuálně registrován. Aplikuje se jednou denně intramuskulárně v dávce 15 až 20 mg na 1 kg hmotnosti pacienta. Vedlejšími účinky jsou bolest v místě vpichu a neurotoxické poškození VIII. hlavového nervu (nervus vestibulocochlearis). [7] [16] [29]

5.1.12.5 Ethambutol (EMB)

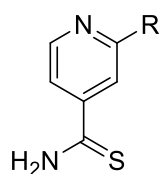
EMB (Obrázek 5) je syntetický hydrofilní derivát odvozený od ethylendiaminu s dobrým antimykobakteriálním účinkem vůči různým druhům mykobakteriím. Mechanismus účinku je vysvětlován tak, že dokáže inhibovat mykobakteriální enzym arabinosyl transferázu, čímž blokuje syntézu arabinogalaktanu, který je nutný k syntéze buněčné stěny. [31] Denní doporučená dávka EMB je 25 mg na 1 kg hmotnosti a nesmí se podávat dětem mladším 13 let. Ve srovnání s jinými antituberkulotiky má EMB nejméně vedlejších účinků. Nejčastějším nežádoucím účinkem je poškození očního nervu, proto se doporučuje při jeho užívání pravidelně kontrolovat visus. [7] [16] [29]

5.1.13 Problematika rezistence

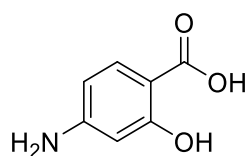
Léčba TBC je náročná, avšak v dnešní době jsou kvalitně propracované léčebné postupy a režimy, které vedou k úspěšnému vyléčení nemocného. Problém nastává, pokud nejsou správně dodržovány, tím vzniká riziko pomnožení mutantních kmenů mykobakterií rezistentních na antituberkulotika. Tento stav se označuje jako získaná (sekundární) rezistence a důvodů vedoucích k jejímu vývoji je celá řada. Hlavním důvodem vzniku je tzv. „man-made“ příčina. Ta je způsobená neracionálním podáváním léčiv, např. pacient je léčený pouze jedním antituberkulotikem (monoterapie), nízká dávka léčiva, nedodržování intervalů dávkování, vynechávání, nízká kontrola zdravotníky nebo kvůli předčasnému ukončení léčebného režimu. Dalšími příčinami jsou genetické mutace mykobakterií, migrace obyvatel z rizikových zemí nebo selekce mutantních rezistentních kmenů. První případy rezistence byly popsány již roku 1943, kdy byl ve stejném roce objeven STM. Od jeho objevení se okamžitě začal s nadšením používat, ale po pár měsících se zjistilo, že si *M. tuberculosis* vytvořilo rezistenci. [6] [32]

Pokud je kmen *M. tuberculosis* rezistentní pouze na jedno antituberkulotikum první řady, jedná se o monorezistenci. Polyrezistence nastává, když je rezistentní na dva a více antituberkulotik první řady, vyjma INH a RPM. Může nastat situace, kdy *M. tuberculosis* je současně rezistentní na dvě nejúčinnější molekuly, INH i RPM, popř. na další antituberkulotika, a tento jev se označuje MDR-TB. První výskyt MDR-TB byl zaznamenán roku 1970. V roce 2006 vznikl další termín, a to extenzivně rezistentní TBC (XDR-TB), kdy mají pacienti diagnostikovanou MDR-TB, a navíc jsou rezistentní vůči chinolonům a vůči jednomu z injekčních léčiv 2. linie (konkrétně jde o amikacin, kanamycin nebo kapreomycin). XDR-TB je léčitelná, byť s obtížemi. K léčbě lze aplikovat thioamidy (Obrázek 6), kyselinu 4-

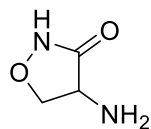
aminosalicylovou (Obrázek 7), aminoglykosidy, cykloserin (Obrázek 8), imipenem (Obrázek 9) a hlavně nová antituberkulotika delamanid (Obrázek 10) a bedachilin (Obrázek 11). Bohužel léčiva delamanid a bedachilin jsou extrémně drahá, tudíž v klinické praxi nepatří mezi běžná léčiva. [7] XDR-TB je u pacientů s HIV pozitivitou vysoce smrtelná. Podle informačních zdrojů z Jihoafrické republiky je medián přežití HIV pozitivních pacientů bez léčby pouhých 16 dní. K průkazu rezistencí se využívají laboratorní vyšetření citlivosti na konkrétní antituberkulotika. [32] [33] [34] [35]



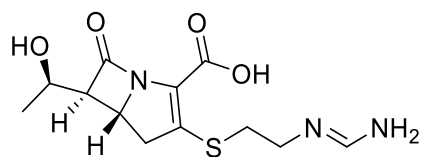
Obrázek 6 thioamidy



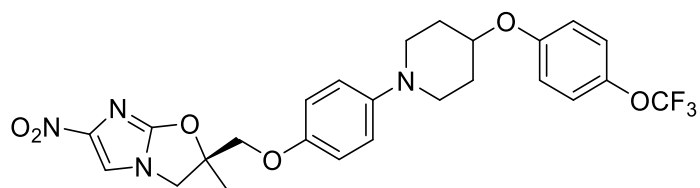
Obrázek 7 kyselina 4-aminosalicylová



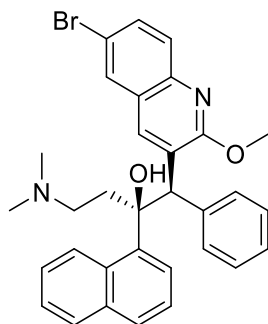
Obrázek 8 cykloserin



Obrázek 9 imipenem



Obrázek 10 delamanid



Obrázek 11 bedachilin

Ve více než 45 zemích byla zaznamenána MDR-TB a většina z nich byly státy bývalého Sovětského svazu, státy ze střední Asie a Afriky. V ČR se situace ohledně MDR-TB dlouhodobě nemění a řadí se mezi státy s příznivou epidemiologickou situací. V ČR z celkového počtu nemocných na TBC tvoří 2 % lidí s MDR-TB nálezem a jedná se zhruba o 20 případů za rok. V této 2% skupině jsou až dvě třetiny zastoupeny cizinci z výše uvedených států. [32] [33] [35]

Mechanismus vzniku rezistence se zakládá např. na schopnosti bakterie modifikovat cílová místa, změnit farmakokinetiku, rychle se pomnožovat nebo metabolizovat léčiva. Příkladem je schopnost rezistentního kmene *M. tuberculosis* metabolizovat INH, kdy acylací prostřednictvím enzymu *N*-acetyltransferázy (NAT) dokáže léčivo deaktivovat, nebo mutace enzymu KatG, který je důležitým krokem k aktivaci INH jakožto proléčiva. [26] [32] [33] [35]

Tento alarmující fakt vedl k ještě většímu důrazu na strategii terapie TBC. Před nasazením antibiotické léčby je vždy potřeba provést kontrolní testy citlivosti na plánovaná užívaná antituberkulotika. [32]

5.2 Výzkum nových potenciálních antimikrobiálních sloučenin

Vědecké skupiny po celém světě se snaží stále studovat a vyvíjet nové potenciální antimikrobiální sloučeniny. Hlavními cíli a záměry, kromě přípravy a testování zcela nových molekul, je chemická modifikace již klinicky aplikovaných antituberkulotik, a to především INH, RPM, PZA, EMB, thioamidů, nitro sloučenin (např. delamanid) a skupiny chinolonů. Výzkum se dále zaměřuje na studium sloučenin extrahovaných z rostlin a jejich analog. Nové strategie také spočívají v podávání kombinací léčiv, které by zkrátily dobu terapie a zamezily vzniku rezistence. Další strategií je optimalizace využití známých molekul. [26] [33] [36]

Byly připravené a stále se objevují nové tzv. boostery (posilovače) a inhibitory represoru EthR pro antituberkulózní léčivo ETH z druhé linie. Bylo totiž prokázáno, že různé

malé molekuly zvyšují aktivitu léčiva ETH tím, že inhibují mykobakteriální transkripční represor EthR *in vivo* i *ex vivo*. ETH, stejně jako INH, je proléčivo, které potřebuje být aktivováno mykobakteriálním enzymem. U ETH je potřeba flavin-dependentního monooxygenázového enzym EthA, jehož exprese je řízená transkripčním represorem EthR, který je zodpovědný za aktivaci ETH. Právě malé molekuly ligandu (různé deriváty amidů, sulfonamidů, močoviny a karbamátů) jsou schopné vázat se na DNA, tudíž ruší i transkripční represorovou funkci EthR a tím zvyšují aktivitu ETH. Podávání inhibitorů EthR s posilovací účinku ETH je perspektivní terapeutickou strategií k léčbě TBC. Mezi nejúčinnější posilovače patří BDM43266. [37] [38]

V rámci výzkumu nových molekul s antimikrobiální aktivitou je snaha vyvíjet sloučeniny s co nejmenší molekulovou strukturou kvůli zvýšení efektivity vstřebatelnosti. Aktuálním trendem je hledání a zkoumání nových mykobakteriálních cílů na molekulární úrovni k jejich možné inhibici nebo deaktivaci, a to především enzymů. Nejčastějšími cílovými enzymy jsou ty, které mykobakterie potřebují nutně k přežití a množení. To jsou především enzymy účastníci se syntézy RNA a DNA, ochranné lipidové buněčné stěny nebo enzymy klíčové v intermediárním metabolismu. Jiným z možných přístupů je například příprava sloučenin, které by dokázaly inhibovat enzym NAT, který pomáhá mykobakteriím metabolizovat INH. Existují další alternativní imunoterapeutické možnosti léčby, při kterých se nevyužívají antituberkulotika, a to např. terapie prostřednictvím aktivace cytokinového systému. Také se pracuje na vývoji nových lékových forem již aplikovaných antituberkulotik s výhodnějším uvolňováním účinné látky. [26] [33] [36]

Další vědecké skupiny se zaměřují na témata ohledně způsobu vakcinace a přípravy nových očkovacích látek proti TBC. Některé skupiny zkoumají a plánují inovace již klinicky využívané BCG vakcíny. Např. z experimentů na makacích rhesus se zjistilo, že vakcinace injekčním podáním intravenózním způsobem je účinnější než injekční podání do dermální tkáň. Vysvětlení spočívá ve faktu, že BCG vakcína při intravenózním podání putuje masivně do plic a tam organismus začne produkovat velké množství T-lymfocytů, které hrají hlavní roli v imunitní reakci proti mykobakteriím. [39] Jiná vědecká skupina připravila živou oslabenou vakcínu *M. tuberculosis* (MTVAC), která je prvním a zatím jediným vhodným kandidátem k vakcinaci. MTVAC vakcína by měla plnit účel prevence před TBC u novorozenců, adolescentů a dalších rizikových skupin dospělé populace, a nahradit tak současnou BCG vakcínu. [40]

5.2.1 Triklosan jako potenciální inhibitor enzymu InhA

I přes to, že léčivo INH je neúčinnější preparát z první řady antituberkulotik, jeho limitem je fakt, že k aktivaci je zapotřebí enzymu KatG. Mutací KatG dochází k nedostatečné přeměně INH na aktivní formu a bakterie se tak stává rezistentní; tato mutace je nejčastější příčinou rezistence na INH. Je tedy potřeba vyvinout léčiva, která by dokázala přímo inhibovat enzym InhA bez nutnosti předchozích aktivačních kroků. Tyto tzv. přímé inhibitory začaly být systematicky zkoumány. Významným přínosem v oblasti vývoje nových antituberkulotik se stal triklosan, jeho deriváty a analoga. Experimentálně bylo ověřeno, že tato malá polychlorovaná molekula (Obrázek 12) nepotřebuje žádnou bioaktivaci, tudíž dokáže přímo ovlivnit funkci enzymu InhA, a to i v případě rezistence na INH. [41]

Triklosan, pod dalším triviálním názvem známý také jako irgasan, jehož systematický název je 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol, se používá již dlouhá léta jako silné lipofilní neionogenní antibakteriální a antifungální činidlo. Jako přísada je součástí dezinfekčních prostředků, zubních past, mýdel, ústních vod, deodorantů, šamponů a dalších přípravků pro osobní hygienu a výrobků využívaných běžně v domácnosti. V přípravcích k osobní péči je jeho povolená koncentrace mezi 0,1 až 0,3 %. Ve vysokých koncentracích je schopný narušovat strukturu a funkci buněčné stěny patogenů včetně bílkovin a lipidů, které jsou součástí membrány, a při nízkých koncentracích inhibuje InhA a RNA syntázu. Bezpečnost triklosanu byla zpochybněna zjištěním, že pokud se triklosan dlouhodobě dostává do lidského organismu, může se v těle kumulovat a přispět tak ke vzniku rezistence bakterií nebo může vyvolat zkříženou rezistenci vůči ostatním antimikrobiálním léčivům. Tyto testy byly prováděné *in vitro*, tudíž není úplně dokázané, že by takové vlastnosti vykazoval i v klinických *in vivo* podmínkách. Některé vědecké publikace se shodují na tom, že triklosan může narušovat endokrinní systém jako hormonální disruptor, ani toto však nebylo s definitivní platností potvrzeno. Na druhou stranu odborná literatura a studie uvádí, že není akutně toxický, karcinogenní ani mutagenní. [41] [42]

Byla připravena řada různých derivátů odvozených od triklosanu a stále se připravují další sloučeniny, které by vykazovaly inhibiční aktivitu vůči InhA. Např. vědecká skupina Sullivana s využitím strukturního designu léčiv vyvinula řadu alkyldifenyletherů (Obrázek 13), které vykazovaly silnou inhibiční aktivitu vůči InhA *in vitro*, a zároveň dokázaly zabránit růstu i rezistentních kmenů *M. tuberculosis*. Předpokládali, že objemnější substituenty na kruhu A mohou vést k dalším interakcím mezi inhibitorem, substrátem a cílovou molekulou. Tato hypotéza byla potvrzena experimentem prostřednictvím superpozicí struktur InhA komplexu

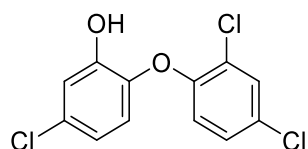
s triklosanem a *S*-(2-hexadecenoyl)-*N*-acetylcysteaminem. Z experimentů se také zjistilo, že hodnota IC₅₀ (inhibiční koncentrace, která snižuje aktivitu enzymu na 50 %) pro triklosan vůči InhA byla 1 μM. Po odstranění dvou atomů chloru z kruhu B a nahrazení jednoho chloru v kruhu A (označený jako des-chlortriklosan) za ethylový zbytek vedlo ke dvojnásobnému zvýšení hodnoty IC₅₀ ve srovnání s původní hodnotou triklosanu, z čehož vyplývá, že substituce chlorem hraje významnou roli při inhibici InhA. Dalším zajímavým poznatkem bylo, že je-li alkylový substituent R v *meta*-poloze na kruhu A dlouhý od dvou až do osmi atomů uhlíkového řetězce, došlo k poklesu IC₅₀ pro InhA od 2 μM do 5 nM. Nejúčinnějším difenyletherem v této studii byly sloučeniny 2-fenoxy-5-hexylfenol a 2-fenoxy-5-oktylfenol (Obrázek 14). [41] [43]

Ende a spol. [44] konstatovali, že i přes slibné *in vitro* aktivity mají 5-alkyl sloučeniny nízkou rozpustnost, což způsobuje jejich omezenou účinnost *in vivo*. Na základě vypořádaného vztahu mezi lipofilitou a účinností *in vivo* byla připravená další řada polárnějších inhibitorů InhA, která byla odvozená ze struktury difenyletheru. Kruh B byl nahrazen isosterickými dusíkatými heterocykly, které způsobily malou sterickou poruchu. Druhá řada nových polárnějších sloučenin na aromatickém kruhu B obsahují nitro, karbamoylovou, amino nebo piperazinylovou funkční skupinu v *ortho*-, *para*- nebo *meta*-poloze. Zjistilo se, že přítomnost objemného substituentu na kruhu B nebo jeho nahrazení aromatickými dusíkatými heterocykly obecně vedou ke snížení inhibice InhA i antimykobakteriální aktivity. Avšak zavedení amino nebo nitro skupiny v *ortho*- a *para*-pozicích vedlo ke srovnatelnému účinku jako u 2-fenoxy-5-hexylfenolu. Nejúčinnější sloučeniny této polárnější řady jsou shrnuty na obrázku 15. [41] [44]

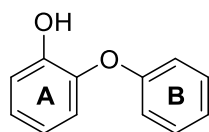
Freundlich a kol. [45] hodnotili řadu monochlortriklosanových derivátů (Obrázek 16) modifikovaných na pozici 5 na kruhu A. Předpokládali, že substituent na poloze 5 na kruhu A (R¹) vyčnívá do hydrofobní kavity enzymu InhA. Obecně platí, že deriváty triklosanu s hydrofobními substituenty, tj. alkyly, fenylalkyly, pyridylmethyly a cykloalkylmethyly byly účinnější než některé hydrofilní skupiny (karboxyl, amid, 2*H*-tetrazol-5-yl). Je důležité poznamenat, že inhibiční účinnost těchto derivátů má tendenci se zvyšovat s prodlužující se délkou řetězce, což naznačuje, že delší alkylové řetězce jsou schopné vytvářet rozsáhlejší hydrofobní interakce. Naopak se zjistilo, že sloučeniny s rozvětveným řetězcem se stejným počtem uhlíků jako u lineárních substituentů vykazovaly horší inhibiční aktivitu. Důvodem je pravděpodobně sterická interakce s enzymem. Triklosanové deriváty z této studie se stejnou délkou alkyly vykazovaly lepší *in vitro* inhibiční aktivitu v porovnání s jeho des-chlorovanými protějšky publikovanými Sullivanem. Toto zjištění potvrzuje fakt, že dva atomy chloru na kruhu B přispívají k vazbě inhibitoru na enzym InhA. Avšak ze studie vztahů mezi strukturou

a aktivitou, kterou provedla skupina Sivaramana a kol., se zjistilo, že dva atomy chloru na kruhu B nejsou pro InhA aktivitu zcela nutné. Přitom je ale zároveň podmínkou, aby kruh B byl zachován kvůli lepší vazbě molekuly na enzym. Pokud jde o zbytek R² na kruhu B, zkusili Freundlich a kol. atom chloru nahradit za nitrilovou funkční skupinu (Obrázek 16). Ze změřených hodnot IC₅₀ se zjistilo, že se inhibiční aktivita zhoršila, tudíž se opět potvrdilo, že atom chloru přispívá k lepším inhibičním hodnotám. [41] [43] [45] [46]

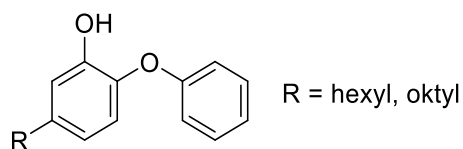
Vědecká skupina Freundlich et al. [47] se dále zabývali přípravou a studiem derivátů diarylmočoviny (Obrázek 17), kde byla hydroxylová funkční skupina na aromatickém kruhu A molekuly triklosanu nahrazena aminem (Obrázek 18). Krystalografická analýza odhalila, že prostřednictvím fenolické části molekuly triklosan interaguje s InhA, což vede k inhibici. Snažili se tedy molekulu optimalizovat a modifikovat tak, aby si nově připravená analoga zachovala schopnost tvořit vodíkové můstky, a to právě náhradou OH skupiny za amin. Jejich výzkum však byl orientován na jiný patogen, než je *M. tuberculosis*. Enzym ACP se totiž nachází i v patogenních prvocích patřících do rodu *Plasmodium*, kteří způsobují rozšířenou nemoc zvanou malárie. Testování připravených močovín tak bylo prováděno na plasmodiích. Konkrétními zkoumanými zástupci byli *Plasmodium falciparum*, které je patogenní pro člověka, a *Plasmodium berghei*, které je myším patogenem. Diarylmočoviny na bázi „amino-triklosanu“ vykazovaly slibnou *in vitro* inhibiční aktivitu vůči ACP enzymu *P. falciparum* a *in vivo* aktivitu v myším modelu infekce *P. berghei*. Plánují se další kroky vedoucí k lepšímu prozkoumání vztahu mezi těmito diarylmočovinnými deriváty triklosanu a jejich strukturou. V plánu je dále podrobná biologická studie ke stanovení molekulárních cílů těchto slibných sloučenin. [47] Ačkoli byla tato práce publikována v roce 2013, navazující výzkum nebyl dosud zveřejněn.



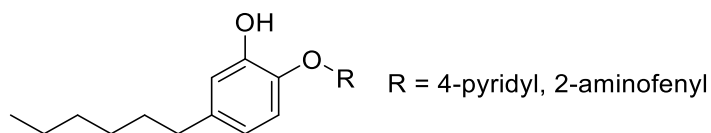
Obrázek 12 triklosan



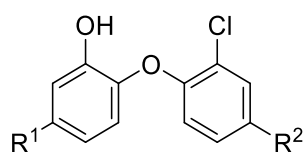
Obrázek 13 difenyletherová struktura základního modelu



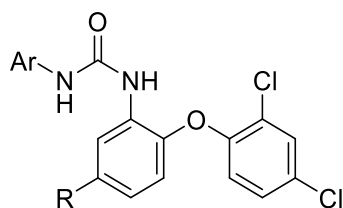
Obrázek 14 obecná struktura neúčinnějších 5-alkyl-2-fenoxyfenolů



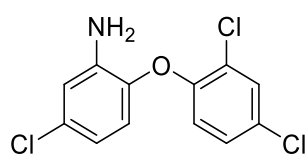
Obrázek 15 obecná struktura derivátů 5-hexyl-2-fenoxyfenolů s aminovými funkcemi



Obrázek 16 obecná struktura monochlor-triklosanových derivátů



Obrázek 17 obecný vzorec diarylmočoviny odvozených od „amino-triklosanu“



Obrázek 18 analog triklosanu s aminovou skupinou nahrazující hydroxylovou skupinu („amino-triklosan“)

5.3 Alzheimerova choroba a cholinergní teorie

Lidé trpící Alzheimerovou nemocí mají zvýšenou mozkovou aktivitu enzymů acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE). Tyto enzymy jsou zodpovědné za hydrolytickou reakci významného neurotransmiteru v centrální i periferní části nervové soustavy – acetylcholinu (Schéma 3). Zvýšená aktivita AChE a BuChE vede, zjednodušeně

řečeno, ke vzniku kognitivní dysfunkce, která způsobuje poruchu soustředěnosti, porozumění řeči i textu, chování, rychlosti a paměti; tento syndrom se souhrnně označuje jako demence. Alzheimerovu nemoc jako její nejčastější příčinu nelze zcela vyléčit, avšak jedním z řešení ke zpomalení progresu nemoci je podání léčiv, které inhibují aktivitu těchto hydrolytických enzymů. Inhibitory cholinesteráz zpomalují rozklad synaptického acetylcholinu a zvyšují tak hladinu acetylcholinu v mozku, čímž pomáhají ke zlepšení cholinergního přenosu v synapsích u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou nebo jinými typy demencí. Mezi nejčastěji užívaná léčiva v praxi patří donepezil (Obrázek 19) a galantamin (Obrázek 20), které inhibují selektivně pouze AChE. Dále je to dualistické karbamátové léčivo rivastigmin (Obrázek 21), které dokáže inhibovat jak AChE, tak i BuChE. [48] [49] [50] Dualistické léčivo je léčivo, které dokáže svůj farmakologický účinek zprostředkovat dvěma odlišnými mechanismy působení. [51]

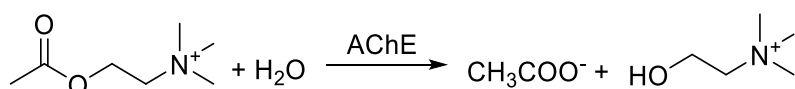
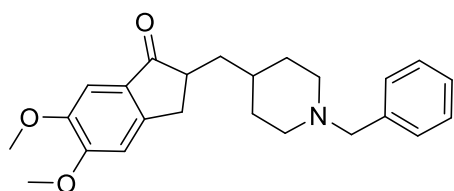
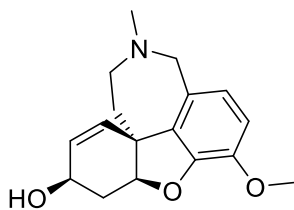


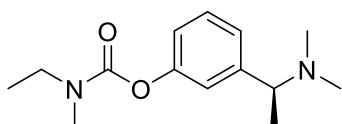
Schéma 3 Degradace acetylcholinu prostřednictvím AChE



Obrázek 19 donepezil



Obrázek 20 galantamin



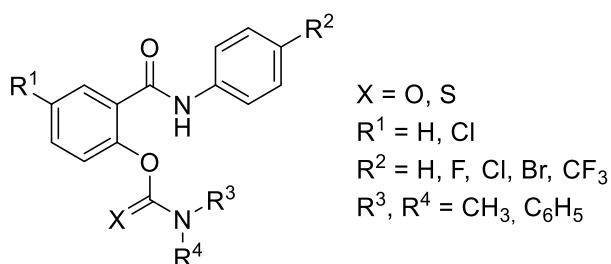
Obrázek 21 rivastigmin

5.3.1 Deriváty fenolů a močovín jako potenciální inhibitory cholinesteráz

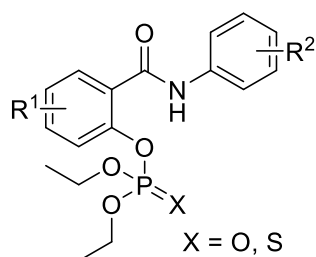
Vědecká skupina prof. Vinšové na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty UK v minulosti provedla řadu experimentů, ze kterých se zjistilo, že sloučeniny na bázi salicylanilidových (thio)karbamátů (Obrázek 22) vykazovaly *in vitro* duální biologickou aktivitu – byly účinné antimikrobiálně, ale také inhibovaly jak AChE, tak BuChE. Nasyntetizovali řadu sloučenin obsahující jako substituent fenolické skupiny karbamátovou, thiokarbamátovou, thiofosfátovou (Obrázek 23) a fosfátovou (Obrázek 23) funkční skupinu. Některé připravené sloučeniny vykazovaly dokonce lepší (pro AChE) nebo srovnatelný (BuChE) inhibiční účinek v porovnání se standardy, a to s rivastigminem (Obrázek 21) a galantaminem (Obrázek 20). Molekulární docking ukázal, že karbamátové sloučeniny, zejména sloučeniny s *N*-fenylem (Obrázek 22) mohou fungovat jako nekovalentní inhibitory s mnoha interakcemi na periferním aniontovém místě enzymů AChE a BuChE. Důvodem této dvojí aktivity je přítomnost salicylanilidové části, která primárně dodává sloučeninám antimikrobiální vlastnosti, a přítomnost (thio)fosfátové a (thio)karbamátového fragmentu, který inhibuje cholinesterázy. [52] [53] [54]

Arylmočoviny vykazující *in vitro* inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám připravila výzkumná skupina Kurta a spol. Vytvořili dvě řady sloučenin. První řada zahrnovala 38 hybridů benzofuranylthiazolových arylmočovín (Obrázek 24) a druhou řadu představovalo celkem 42 kumarylthiazolových derivátů obsahující močovinou nebo thiomčovinou skupinu (Obrázek 25). Všechny připravené deriváty z obou řad vykazovaly duální inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE a výsledné hodnoty se porovnávaly se standardy (takrin, kvercetin, galantamin, donepezil a rivastigmin). Deriváty měly navíc antioxidační vlastnosti. Tento výzkum se opíral z přechozích zjištění, že inhibovat AChE lze prostřednictvím benzofuranové, amidové, imidové, močovinové, karbamátové nebo sulfonamidové skupiny. Zajímavým poznatkem bylo např., že inhibitory AChE na bázi amidů nebo imidů fungují jako donory vodíkových vazeb; tyto skupiny interagují s katalytickou triádou Ser203-Glu334-His447 aktivního místa enzymu. Tyto vodíkové vazby byly také popsány u molekul, které mají jako spacery močovinu, sulfonamid nebo karbamát. Několik studií odhalilo, že tricyklické a heterocyklické kruhy (např. chinolizidinyl, takrin nebo deriváty kumarinu) vykazovaly silné π - π patrové interakce. [55] [56] Výsledky ukázaly, že z benzofuranylthiazolových derivátů vykazovala nejlepší inhibiční aktivitu vůči AChE 1-[4-(5-brombenzofuran-2-yl)thiazol-2-yl]-3-(2-fluorfenyl)močovina s IC_{50} 3,38 μ M a nejlepší inhibici BuChE vykazovala 1-(4-jodfenyl)-3-[4-(5-nitrobenzofuran-2-yl)thiazol-2-yl]močovina s hodnotou IC_{50} 2,03 μ M. Z druhé řady kumarylthiazolů

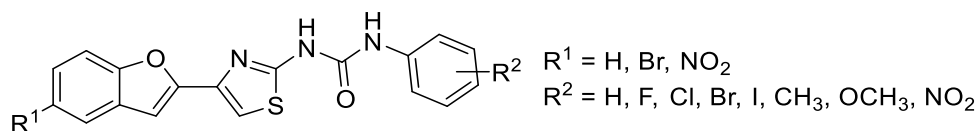
vykazovala nejlepší inhibiční účinek vůči AChE 1-[4-(8-methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl]-3-(4-chlorfenyl)thiomocovina s IC_{50} 4,58 μ M a nejlepší inhibici BuChE měla 1-(4-fluorfenyl)-3-[4-(6-nitro-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)thiazol-2-yl]mocovina (IC_{50} = 4,93 μ M). [57] [58]



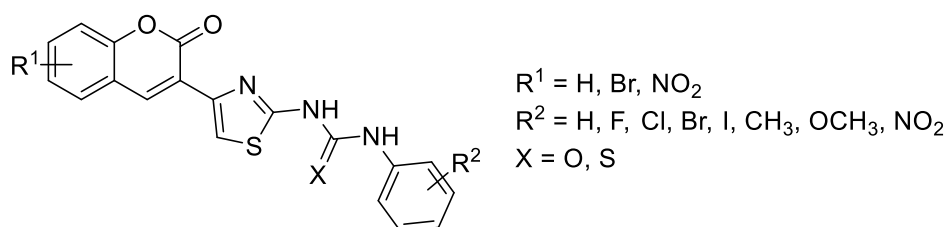
Obrázek 22 obecný vzorec salicylanilidových (thio)karbamátů



Obrázek 23 obecný vzorec salicylanilidových diethyl-(thio)fosfátů

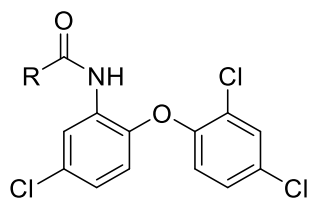


Obrázek 24 obecný vzorec benzofuranylthiazolových hybridů

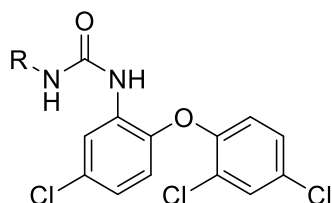


Obrázek 25 obecné vzorce kumarylthiazolových derivátů obsahujících (thio)mocovinovou skupinu

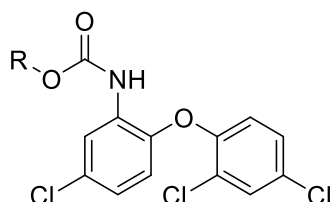
Na základě těchto poznatků jsme nechali naše připravené „amino-triklosanové“ deriváty otestovat i na inhibiční schopnost vůči AChE a BuChE. Zde je přehled obecných vzorců „amino-triklosanových“ derivátů s amidovou skupinou (Obrázek 26), s močovinovou (Obrázek 27) a s karbamátovou skupinou (Obrázek 28).



Obrázek 26 obecný vzorec derivátů amino-triklosanu s amidovou skupinou



Obrázek 27 obecný vzorec derivátů „amino-triklosanu“ s močovinovou skupinou



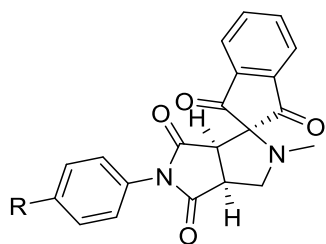
Obrázek 28 obecný vzorec derivátů „amino-triklosanu“ s karbamátovou skupinou

5.3.1.1 Další příklady dualistické aktivity

Současnou schopnost antimikrobní a inhibiční aktivity vůči cholinesterázám jiných strukturních typů sloučenin studovaly i další vědecké skupiny. Např. Bharkavi a kol. připravili nové dihydro-2'*H*-spiro[inden-2,1'-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol]tetraony stereoselektivní syntézou *in situ* v mikrovlnném reaktoru. Všechny připravené sloučeniny vykazovaly inhibiční aktivitu vůči AChE a antimikrobiální aktivitu vůči *M. tuberculosis*. Konkrétně 5'-(4-chlorfenyl)-2'-methyl-2',3',3a',6a'-tetrahydro-4'*H*-spiro[inden-2,1'-pyrrolo[3,4-*c*]pyrrol]-1,3,4',6(5''*H*)-tetraon

(Obrázek 30, R = Cl) vykazoval ze všech testovaných derivátů nejlepší antimykobakteriální aktivitu ($IC_{50} = 1,30 \mu M$), což je ve srovnání se standardy cykloserinem ($IC_{50} 12,47 \mu M$) 10× a pyrimethaminem ($IC_{50} 37,35 \mu M$) 29× aktivnější. Tento 4-chlorfenylový derivát vykazoval vůči *M. tuberculosis* MIC 25 μM . Všechny připravené deriváty vykazovaly inhibiční interakci vůči AChE a výsledné hodnoty se porovnávaly s léčivem donepezilem. Nejlepší aktivitu vůči AChE vykazovala sloučenina 5'-(4-methoxyfenyl)-2'-methyl-2',3',3a',6a'-tetrahydro-4'H-spiro[inden-2,1'-pyrrolo[3,4-c]pyrrol]-1,3,4',6(5''H)-tetraon (Obrázek 29, R = OCH₃) s hodnotou $IC_{50} 0,78 \mu M$. [59]

Jovanović a spol. hodnotili schopnost inhibiční aktivity vůči oběma cholinesterázám a antimikrobiální vlastnosti látek extrahovaných z rostliny *Seseli rigidum*. Hlavní složkou extraktů získaných z různých částí rostlin (z kořenu, květu, listu a plodu) byly éterické oleje. Až 99,9 % všech získaných složek bylo jednotlivě identifikováno prostřednictvím plynové chromatografie spojenou s hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem vybaveným vzorkovačem a extraktorem typu headspace. Testovanými bakteriemi byly *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a houby *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. Rozsah minimální inhibiční koncentrace testovaných extraktů proti bakteriím a houbám byl v rozmezí 10-1500 μM a mikrobicidní koncentrace činily 20-3000 μM . V interakci s cholinesterázami se všechny oleje chovaly jako inhibitory. Konkrétními příklady složek éterických olejů byly např. kyselina skořicová, angelicin, psoralen, bergapten, oroselol, agasyllin atd. Získané extrakty vykazovaly navíc i antioxidační schopnosti. [60]



Obrázek 29 obecný vzorec tetraonů

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Chemikálie a technická zařízení

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

Průběh všech reakcí byl pravidelně sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 (Merck, Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava DCM (dichlormethan):hexan v poměru 1:1 a 3:1 (V/V), detekce byla prováděna UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

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

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

NMR (nukleární magnetická rezonance) spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 150 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) nebo chloroform (CDCl_3). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (u DMSO- d_6 při $\delta = 39,5$ ppm, u CDCl_3 77,0 ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy. Všechny hodnoty $\log P$, tj. hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda, byly vypočteny v programu SwissADME. Jde o zprůměrované hodnoty pěti různých přístupů k výpočtu $\log P$.

6.2 Příprava prekurzoru „amino-triklosanu“

Náš plánovaný prekurzor k přípravě byl inspirován článkem vytvořený vědeckou skupinou Freundliche z roku 2013 [47], a to konkrétně prekurzorová sloučenina „amino-triklosan“, která se dalšími reakčními kroky modifikovala.

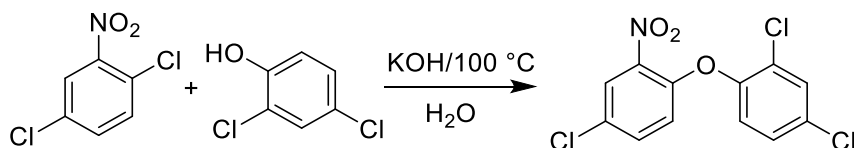
6.2.1 Syntéza etheru nukleofilní substitucí

Slouží k přípravě symetrických i nesymetrických etherů. Jedná se o nukleofilní substituci halogenderivátu fenolátem. [61] Aromatický halogenderivát je k této reakci aktivován přítomností nitro skupiny v *ortho*-poloze vůči atomu chloru, který je během reakce substituován. [62]

Prostřednictvím této nukleofilní substituce jsme připravili 2,4-dichlor-1-(4-chlor-2-nitrofenoxy)benzen jako prekurzor k další modifikaci.

6.2.1.1 Metoda A

Reakční schéma:

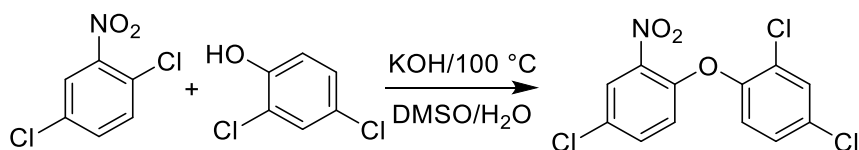


Pracovní postup [63]:

Do 500 ml baňky bylo přidáno 200 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 8150,0 mg (0,05 mol) 2,4-dichlorfenolu a 9800,0 mg (0,05 mol) 1,4-dichlor-2-nitrobenzenu. Nakonec bylo přidáno 5000,0 mg (0,084 mol) KOH. Reakční směs se ponechala za stálého míchání zahřívát za teploty varu rozpouštědla (100 °C) pod zpětným chladičem. Po 5 h byl zpětný chladič odebrán a voda ve směsi se nechala vyvařit. Pomocí TLC se zjistilo, že nedošlo ale k žádné reakci.

6.2.1.2 Metoda B

Reakční schéma:

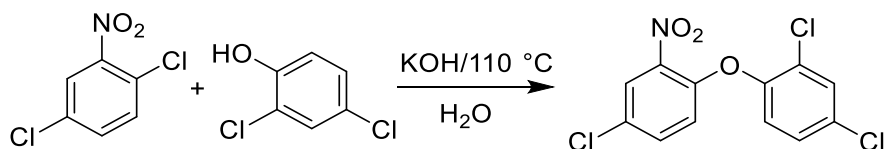


Pracovní postup [47]:

V 500 ml baňce bylo rozpuštěno 8150,0 mg (0,05 mol) 2,4-dichlorofenolu a 9800,0 mg (0,05 mol) 1,4-dichlor-2-nitrobenzenu v DMSO. Reakční směs se nechala zahřívát ve vodní lázni na 100 °C pod zpětným chladičem. Po rozpuštění obou přidaných sloučenin byl přidán roztok KOH (5000,0 mg KOH v 15 ml vody). Po 4 h zahřívání bylo provedeno TLC, nedošlo však opět k žádné reakci.

6.2.1.3 Metoda C

Reakční schéma:

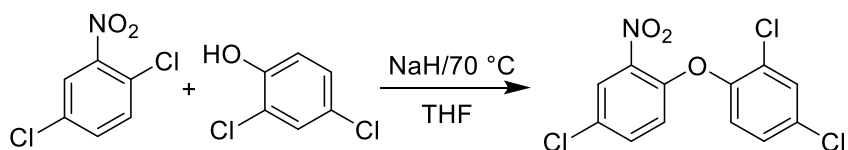


Pracovní postup [64]:

Do 500 ml baňky bylo přidáno 1018,0 mg (0,0065 mol) 2,4-dichlorofenolu a ponechalo se roztavit při 110 °C. Po roztavení 2,4-dichlorofenolu bylo přidáno 350,0 mg (0,0065 mol) KOH a nechalo se roztavit dohromady s 2,4-dichlorofenolem. Teplota byla neustále monitorována, aby nepřesáhla 110 °C. Po roztavení obou sloučenin se přidalo zhruba 15 ml vody. Směs se ponechala míchat 30 minut a po 30 minutách bylo přidáno 1225,0 mg (0,0065 mol) 1,4-dichlor-2-nitrobenzenu. Směs byla za stálého míchání zahřívána na 150 °C 4 hodiny. Následně byla ponechána vychladnout za laboratorní teploty. Po vychladnutí bylo přidáno 15 ml 10 % roztoku KOH a 30 ml destilované vody. Po přidání vody se objevily krystaly. Poté byl vzniklý produkt přefiltrován. U této metody byl 57% výtěžek produktu (1200,0 mg).

6.2.1.4 Metoda D

Reakční schéma:

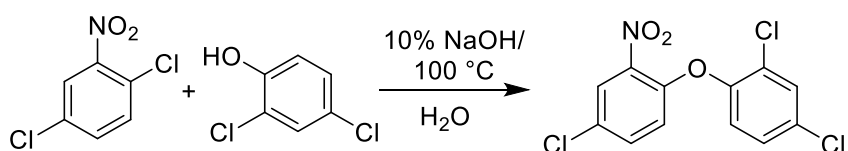


Pracovní postup:

Do 50 ml suchého tetrahydrofuranu (THF) bylo přidáno 1018,0 mg (0,0065 mol) 2,4-dichlorofenolu spolu s 1225,0 mg (0,0065 mol) 1,4-dichlor-2-nitrobenzenu a obě sloučeniny se nechaly za stálého míchání v THF dokonale rozpustit. Po rozpuštění bylo přidáno 312,0 mg (0,013 mol) NaH. Směs se nechala zahřívát za varu při 70 °C pod zpětným chladičem. Po 2 hodinách byl ohřev přerušen. Reakční směs byla odpařena do sucha a vzniklý produkt ve formě oranžových krystalů byl odfiltrován. U této metody byl 0,5% výtěžek produktu (10,0 mg).

6.2.1.5 Metoda E

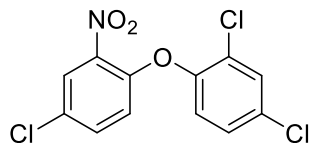
Reakční schéma:



Pracovní postup [63]:

Do 500 ml baňky bylo přidáno 8150,0 mg (0,05 mol) 2,4-dichlorofenolu s 9800,0 mg (0,05 mol) 1,4-dichlor-2-nitrobenzenu a obě sloučeniny se ponechaly za stálého míchání roztavit při 130 °C. Po roztavení obou sloučenin bylo přidáno 3 ml vody a následně bylo přidáno 3 ml 10 % roztoku NaOH. Reakční směs se ponechala zahřívát při 130 °C 3 až 4 hodiny a následně se reakční směs nechala vychladnout za laboratorní teploty. Posléze bylo přidáno do reakční směsi 10 ml vody a vzniklý produkt ve formě krystalů byl odfiltrován a vysušen. U této metody byl 84% výtěžek (13 500,0 mg).

2,4-Dichlor-1-(4-chlor-2-nitrofenoxy)benzen [NO₂-ETER]



Sumární vzorec: C₁₂H₆Cl₃NO₃

Mr: 318,53

Výtěžek: 13 500,0 mg (84 %)

Vzhled: oranžovo-žluté krystaly

NMR: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.25 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H2), 7.83 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H3'), 7.75 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, H4), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H5'), 7.28 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H6'), 7.13 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 149.62, 147.59, 140.82, 135.03, 130.62, 130.10, 129.33, 128.12, 125.73, 125.70, 122.49, 121.41.

IČ [cm⁻¹]: 3084, 1609 (C=C_{Ar}), 1527 (NO₂ as), 1470, 1344 (NO₂ sym), 1263, 1171, 1156, 1099, 1074, 1057, 827, 815, 772, 759, 691, 682.

Elementární analýza: vypočteno: C, 45.25; H, 1.90; N, 4.40, nalezeno: C, 45.29; H, 1.85; N, 4.34.

R_f (DCM/hexan; 1:1 V/V): 0,70

T_t [°C]: 89,3 (84-85 [65])

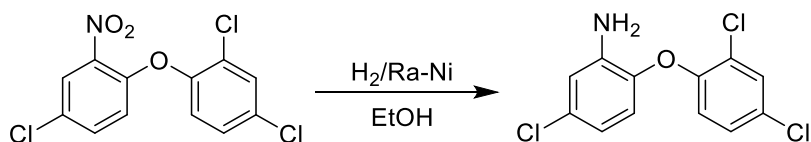
LogP: 3,94

6.2.2 Redukce Raneyovým niklem

Raneyův nikl je činidlo, které se používá jako katalyzátor v organické chemii. Existuje většinou v podobě pevného šedého prášku. Byl vyvinut inženýrem Murrayem Raneyem v roce 1926. [66]

Prostřednictvím Raneyova činidla jsme zredukovali 2,4-dichlor-1-(4-chlor-2-nitrofenoxy)benzen na 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilin. Tento produkt sloužil jako prekurzor k syntéze dalších sloučenin.

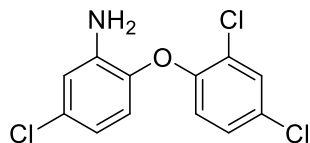
Reakční schéma:



Pracovní postup:

500,0 mg (0,0015 mol) 2,4-dichlor-1-(4-chlor-2-nitrofenoxy)benzenu bylo rozpuštěno v 98 % ethanolu (získán komerčně). Po rozpuštění bylo za stálého míchání při pokojové teplotě přidáno 50 mg (10 molárních procent) Raneyova niklu a následně se do baňky pustil pomalu vodík. Po 5 hodinách míchání se provedlo TLC, po kompletní redukci byl katalyzátor odfiltrován. Filtrát se vzniklým produktem byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel, MF: DCM/hexan; 1:1 V/V). Následně byl produkt odpařen do sucha na rotační vakuové odparce. I přes indukovanou krystalizaci ethyl-acetátem s *n*-hexanem (či jinými rozpouštědly) se nepodařilo získat produkt v pevném stavu a čistý produkt byl získán jako viskózní kapalina. Výsledný produkt byl v kapalném stavu poslán na NMR měření. Syntéza byla provedena celkem třikrát, aby se získalo dostatečné množství prekurzoru k dalším syntézám.

5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilin („amino-triklosan“) [NH₂-ETER] [47]



Sumární vzorec: C₁₂H₈Cl₃NO

Mr: 288,55

Výtěžek: 300,0 mg (70 %)

Vzhled: oranžová viskózní kapalina

NMR: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.69 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H3'), 7.34 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, H5'), 6.84 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H2), 6.81 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H6'), 6.71 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H5), 6.51 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, H4), 5.35 (2H, s, NH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 189.10, 179.13, 177.43, 167.27, 166.76, 165.92, 164.49, 161.52, 158.21, 156.49, 152.89, 152.23.

IČ [cm⁻¹]: 3390 (N-H), 1619 (C=C_{Ar}), 1498, 1472, 1254, 1232, 1187 (C-O), 1099, 809, 863, 789, 766.

Elementární analýza: vypočteno: C, 49.95; H, 2.79; N, 4.85, nalezeno: C, 49.90; H, 2.81; N, 4.87.

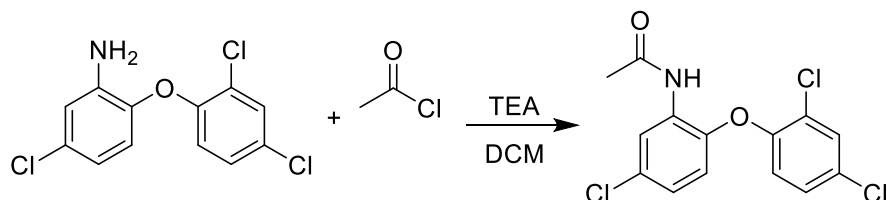
R_f (DCM/hexan; 1:1 V/V): 0,53

LogP: 4,19

6.3 Jednotlivé syntézy amidů

6.3.1 *N*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid

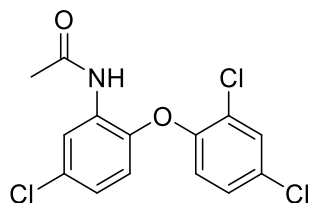
Reakční schéma:



Pracovní postup:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu v 30 ml suchého DCM. Po rozpuštění bylo přidáno 104 μ l (0,00075 mol) TEA a následně bylo pomalu přidáno 150 μ l (0,0021 mol) acetylchloridu. Reakční směs se ponechala 1 hodinu míchat za laboratorní teploty. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄ přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Z NMR byla patrná přítomnost další alifatické nečistoty, produkt s nečistotou byla znovu vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl a následně vysušena nad bezvodým Na₂SO₄. Následně byl produkt odpařen na rotační vakuové odparce dosucha a byl přidán ethyl-acetát a *n*-hexan. Produkt byl ponechán při -20 °C krystalizovat do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny.

N-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid [A1] [47]



Sumární vzorec: C₁₄H₁₀Cl₃NO₂

Mr: 330,59

Výtěžek: 120,0 mg (52 %)

Vzhled: světlé žluté krystaly

NMR: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₂), 7.77 (1H, bs, NH), 7.51 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₃'), 7.26 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, H₅'), 6.99-6.94 (2H, m, H₄, H₅), 6.61 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H₆'), 2.23 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 168.33, 149.93, 143.54, 130.75, 130.56, 129.86, 129.49, 128.45, 126.62, 123.54, 121.73, 120.95, 116.82, 24.87.

IČ [cm⁻¹]: 3090 (C-H_{Ar}), 1696 (C=O), 1603, 1519, 1469, 1459, 1414, 1251, 1229, 1115 (C-O), 906, 872, 802, 666, 656.

Elementární analýza: vypočteno: C, 50.86; H, 3.05; N, 4.24, nalezeno: C, 50.82; H, 3.09; N, 4.28.

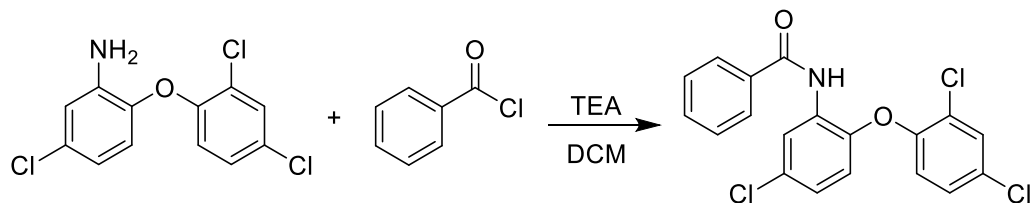
R_f (DCM/hexan; 3:1 V/V): 0,22

T_t [°C]: 108,2

LogP: 4,36

6.3.2 *N*-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]benzamid

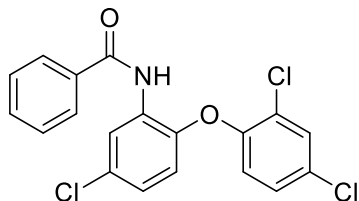
Reakční schéma:



Pracovní postup:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu ve 30 ml suchého DCM. Po rozpuštění bylo přidáno 104 μ l (0,00075 mol) TEA a následně bylo pomalu přidáno 87 μ l (0,00075 mol) benzoylchloridu. Reakční směs se ponechala přes noc míchat za laboratorní teploty. Druhý den byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄ přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Produkt byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel, MF: DCM/hexan; 1:1 V/V). Následně byl produkt s rozpouštědlem zahuštěn mírným odpařením na rotační vakuové odparce a byl přidán *n*-hexan k iniciaci krystalizace. Tato soustava byla ponechána při -20 °C krystalizovat přes noc. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny.

N-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]benzamid [A2] [47]



Sumární vzorec: C₁₉H₁₂Cl₃NO₂

Mr: 392,66

Výtěžek: 55,0 mg (20 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.73 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₂), 8.52 (1H, bs, NH), 7.89-7.86 (2H, m, H₂'', H₆''), 7.60-7.56 (1H, m, H₄''), 7.53-7.48 (3H, m, H₃', H₃'', H₅''), 7.27 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, H₅'), 7.05-7.01 (2H, m, H₄, H₅), 6.70 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H₆').

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 165.24, 149.98, 143.83, 134.33, 132.25, 130.83, 130.64, 130.07, 129.77, 128.93, 128.45, 127.06, 126.60, 123.75, 121.55, 121.06, 116.96.

IČ [cm⁻¹]: 3086 (C-H_{Ar}), 1674 (C=O), 1601 (C=C_{Ar}), 1519, 1495, 1445, 1417, 1123 (C-O), 870, 843, 796, 753, 709.

Elementární analýza: vypočteno: C, 58.12; H, 3.08; N, 3.57, nalezeno: C, 58.18; H, 3.05; N, 3.50.

R_f (DCM/hexan; 1:1 V/V): 0,48

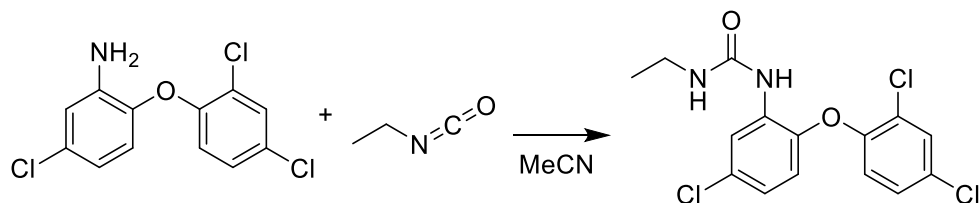
T_t [°C]: 127,2

Log*P*: 5,41

6.4 Jednotlivé syntézy močovin

6.4.1 1-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)fenyl]-3-ethylurea

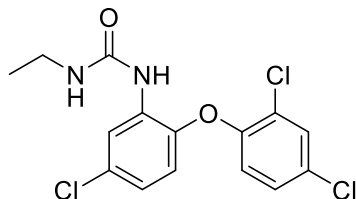
Reakční schéma:



Pracovní postup:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu v 30 ml suchého acetonitrilu (MeCN). Po rozpuštění bylo přidáno 65 μ l (0,00077 mol) ethylisokyanátu. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla 10 h. Poté byl ohřev přerušen a reakční směs se ponechala celkem 5 dní míchat za laboratorní teploty. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄ přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Produkt byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel, MF: DCM/hexan; 5:1 V/V). Následně byl produkt odpařen na rotační vakuové odparce a byl přidán ethyl-acetát a *n*-hexan. Tato směs byla ponechána při -20 °C krystalizovat přes noc do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Syntéza byla opakována celkem dvakrát.

1-[5-chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)fenyl]-3-ethylurea [M1]



Sumární vzorec: C₁₅H₁₃Cl₃N₂O₂

Mr: 359,63

Výtěžek: 50,0 mg (20 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H2), 7.44 (1d, *J* = 2.5 Hz, H3'), 7.18 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, H5'), 6.90-6.83 (3H, m, aryl-NH, H4, H5), 6.58 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H6'), 4.82 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, ethyl-NH), 3.28 (2H, qd, *J* = 7.2, 5.4 Hz, CH₂), 1.16 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 154.51, 150.57, 143.05, 131.61, 130.71, 130.10, 130.04, 128.46, 126.20, 122.01, 121.03, 120.21, 117.59, 35.45, 15.31.

IČ [cm⁻¹]: 3321 (N-H), 1648 (C=O), 1599 (C=C_{Ar}), 1584, 1555, 1525, 1468, 1417, 1251, 1231, 1100 (C-O), 802, 688, 666.

Elementární analýza: vypočteno: C, 50.10; H, 3.64; N, 7.79, nalezeno: C, 50.06; H, 3.62; N, 7.84.

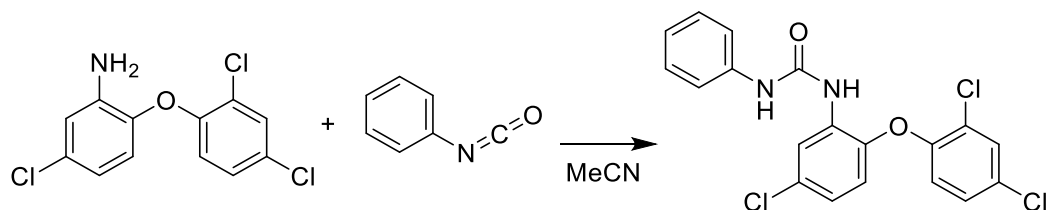
R_f (DCM/hexan; 1:1 V/V): 0,43

T_t [°C]: 148,2

LogP: 4,40

6.4.2 1-[5-chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)]-3-fenylurea

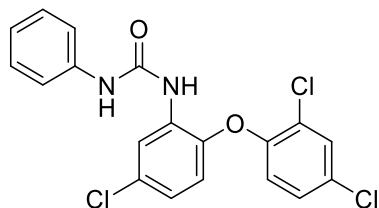
Reakční schéma:



Pracovní postup:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu v 30 ml suchého MeCN. Po rozpuštění bylo přidáno 85 μ l (0,00077 mol) fenylisokyanátu. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla 5 h. Poté byl ohřev přerušen a reakční směs se ponechala přes noc míchat za laboratorní teploty. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄ přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Následně byl přidán ethyl-acetát a *n*-hexan. Produkt byl ponechán při -20 °C krystalizovat do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny.

1-[5-chlor-2-(2,4-dichlorbenzyl)fenyl]-3-fenylurea [M2] [47]



Sumární vzorec: C₁₉H₁₃Cl₃N₂O₂

Mr: 406,00

Výtěžek: 122,0 mg (43 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H2), 7.44 (1H, s, fenyl-NH), 7.38 (1d, *J* = 2.5 Hz, H3'), 7.28-7.23 (4H, m, H2'', H3'', H5'', H6''), 7.13 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H5'), 7.11-7.08 (1H, m, H4''), 7.04 (1H, s, NH-difenylether), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, H4), 6.79 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H5), 6.60 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H6').

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 152.72, 150.49, 143.25, 137.37, 131.03, 130.69, 130.16, 129.97, 129.49, 128.37, 125.99, 124.98, 122.79, 121.77, 120.60, 120.54, 117.86.

IČ [cm⁻¹]: 3330 (N-H), 1663 (C=O), 1620, 1553, 1531, 1499, 1468, 1419, 1323, 1251, 1212, 846, 824, 750, 693.

Elementární analýza: vypočteno: C, 55.98; H, 3.21; N, 6.87, nalezeno: C, 55.93; H, 3.23; N, 6.90.

R_f (DCM/hexan; 3:1 V/V): 0,11

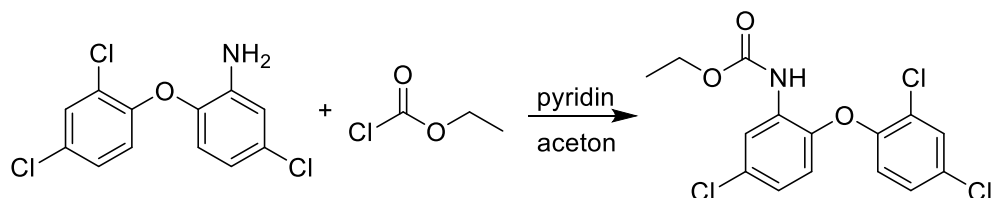
T_t [°C]: 177,3

LogP: 5,26

6.5 Jednotlivé syntézy karbamátů

6.5.1 Ethyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát

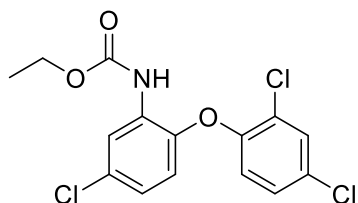
Reakční schéma:



Pracovní postup:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu ekvimolárně s 56,4 μl pyridinu v 10 ml suchého acetonu. Po rozpuštění byl pomalu přidán roztok 67,0 μl (0,0007 mol) ethyl-chloroformiátu v 5 ml acetonu (baňka se směsí byla chlazená ledem). Reakční směs byla míchána hodinu za laboratorní teploty. Po hodině bylo míchání přerušeno a následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodným Na₂SO₄ přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Po odpaření začaly vznikat krystaly, tudíž byl produkt ponechán při -20 °C krystalizovat do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Syntéza byla opakována celkem dvakrát.

Ethyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát [K1]



Sumární vzorec: C₁₅H₁₂Cl₃NO₃

Mr: 360,62

Výtěžek: 88,0 mg (35 %)

Vzhled: hnědé krystaly

NMR: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.27 (1H, s, NH), 7.48 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₂), 7.22 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H₅'), 7.19 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₃'), 6.92 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H₅), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, H₄), 6.57 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H₆'), 4.24 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 1.31 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 153.18, 150.24, 143.36, 130.87, 130.49, 130.29, 129.78, 128.45, 126.77, 122.69, 121.62, 119.51, 117.08, 61.78, 14.55.

IČ [cm⁻¹]: 3396 (N-H), 1726 (C=O ester), 1605 (C=C_{Ar}), 1530, 1467, 1422, 1217, 1063, 841, 768, 649.

Elementární analýza: vypočteno: C, 49.96; H, 3.35; N, 3.88, nalezeno: C, 49.90; H, 3.40; N, 3.95.

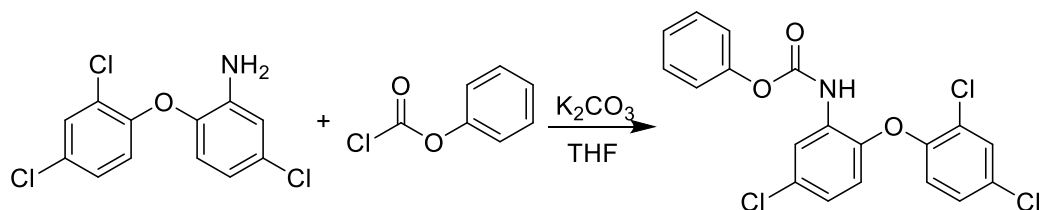
R_f (DCM/hexan; 1:0,1 V/V): 0,83

T_t [°C]: 94,1

LogP: 4,74

6.5.2 Fenyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát

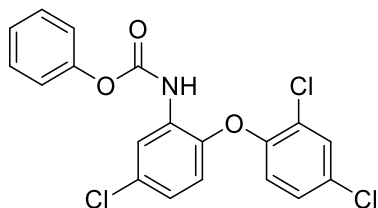
Reakční schéma:



Postup přípravy:

V suché baňce bylo rozpuštěno 200,0 mg (0,0007 mol) 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu v 10 ml suchého THF (baňka se směsí byla chlazená ledem). Po rozpuštění bylo přidáno 193,5 mg (0,0014 mol) K_2CO_3 a po kapkách bylo pomalu přidáno 132,0 μ l (0,00105 mol) fenyl-chloroformiátu. Reakční směs byla míchána hodinu za laboratorní teploty. Poté se reakční směs zfiltrovala přes vatu a následně byla odpařena na rotační vakuové odparce do sucha a pomocí destilované vody a ethyl-acetátu byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5% $NaHCO_3$ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodným Na_2SO_4 přibližně 30 minut. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Po částečném odpaření začaly vznikat krystaly, tudíž byl produkt ponechán při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ krystalizovat do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Syntéza byla opakována celkem třikrát.

Fenyl-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]karbamát [K2]



Sumární vzorec: C₁₉H₁₂Cl₃NO₃

Mr: 408,66

Výtěžek: 63,0 mg (22 %)

Vzhled: světle růžové krystaly

NMR: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (1H, s, NH), 7.51 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H2), 7.43-7.38 (3H, m, H3', H3'', H5'), 7.32-7.29 (1H, m, H4'), 7.26 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, H5'), 7.22-7.18 (2H, m, H2'', H6''), 7.00 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H5), 6.94 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, H4), 6.61 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H6').

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 151.34, 150.44, 150.02, 143.76, 130.98, 129.93, 129.58, 128.55, 127.30, 126.98, 126.05, 123.37, 121.97, 121.62, 120.49, 119.74, 116.88.

IČ [cm⁻¹]: 3392 (N-H), 1758 (C=O ester), 1604 (C=C_{Ar}), 1524, 1478, 1466, 1420, 1253, 1210, 1176, 1098, 780, 737, 707.

Elementární analýza: vypočteno: C, 55.84; H, 2.96; N, 3.43, nalezeno: C, 55.88; H, 2.99; N, 3.37.

R_f (DCM/hexan; 1:1 V/V): 0,57

T_t [°C]: 108,4

LogP: 5,56

7 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

7.1 Hodnocení antimikrobní aktivity

7.1.1 Chemikálie a kmeny

- *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra10-M (ATCC9431)
- *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) (Braunschweig, Německo)
- *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) (Braunschweig, Německo)
- bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- 0,4% glycerol (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- 10% růstový přídatek Middlebrook OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase), což je olejová albumin-dextróza kataláza (Himedia, Mumbai, Indie)
- DMSO (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- INH (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- triklosan (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- sodná sůl resazurinu (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- 10% vodný roztok stabilizátoru Tween 80 (Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim, Německo)
- destilovaná voda
- námi připravené sloučeniny

7.1.2 Obecný princip měření antimykobakteriální aktivity

Tato metodika je dopodrobna popsána v článku Krátkého et al. [67] U všech námi připravených sloučenin společně s triklosanem jako komparátorem byla stanovena antimykobakteriální aktivita *in vitro*. Hodnocení bylo provedené na avirulentním kmeni *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra10-M získaným z Belgian Coordinated Collections of Microorganism a na rychle rostoucích kmenech atypických mykobakterií, tj. *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 získaných od German Collection of Microorganism and Cell Cultures. Při testování byla použita mikrodiluční bujónová metoda pomocí 96-jamkových mikrotitračních destiček. Jako kultivační médium byl použit bujón Middlebrook 7H9 obohacený o 0,4 % glycerolu a 10% růstový přídatek Middlebrook OADC.

Konečná hustota byla bujónem upravena na hodnotu 1,0 podle McFarlandovy stupnice

a zředěna v poměru 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie) nebo 1:10 (pro *M. tuberculosis*).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Následně byl přidán bujón tak, aby se získala koncentrace 2000 mg/l. Jako standard pro stanovení antimykobakteriální aktivity byl použit INH a dále triklosan. Výsledné koncentrace byly dosažené binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze a byly stanoveny na 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,9 mg/l nebo 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 a 0,39 mg/l podle konečné hodnoty MIC. INH byl zředěn v rozmezí 500 až 3,91 μM pro screening na rychle rostoucí mykobakterie a v rozmezí 1 až 0,0078 mg/l proti *M. tuberculosis*. Koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (V/V) a neovlivnila růst *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* ani *M. aurum*. Pozitivní a negativní kontroly byly zahrnuty též.

Mikrodestičky byly inkubovány ve tmě při 37 °C 14 a 21 dnů statickým způsobem. Po přidání 0,01% roztoku sodné soli resazurinu proběhla inkubace: 48 hod v případě *M. smegmatis*, 72 hodin u *M. aurum* a 120 hodin v případě *M. tuberculosis*.

MIC byla hodnocena na principu změny barvy destiček. V případě aktivní sloučeniny vzniklo modré zbarvení a u neaktivní sloučeniny, resp. její koncentrace, se objevilo růžové zbarvení. Všechna měření byla prováděna v duplikátech.

7.2 Hodnocení inhibiční aktivity cholinesteráz

7.2.1 Ellmanova metoda

Kolorimetrická Ellmanova metoda je nejčastější metodou ke stanovení aktivity cholinesteráz, respektive i účinnosti jejich inhibitorů. Principem této metody je schopnost cholinesteráz hydrolyzovat estery acetylthiocholin (ATCh) nebo butyrylthiocholin (BTCh) s tím, že AChE štěpí acetylthiocholin a BuChE butyrylthiocholin. Po rozštěpení příslušných substrátů, acylthiocholinů, ve vodném prostředí dochází ke vzniku aniontů příslušných kyselin a thiocholinu. Thiocholin obsahující -SH skupinu reaguje s Ellmanovým činidlem (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)) za vzniku barevného žlutého produktu (5-sulfanyl-2-nitrobenzoátový aniont) (Schéma 4). Tento chromofor je detekovatelný spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. [68] [69] [70]

Prostřednictvím této metody byly hodnoceny *in vitro* i všechny naše připravené sloučeniny a triklosan. Jako standard pro porovnání hodnot IC_{50} bylo použito léčivo rivastigmin. Aktivita byla stanovena na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice na Katedře biologických a biochemických věd pod vedením paní Mgr. Šárky Štěpánkové, Ph.D.,

a Mgr. Kataríny Svrčkové, Ph.D.

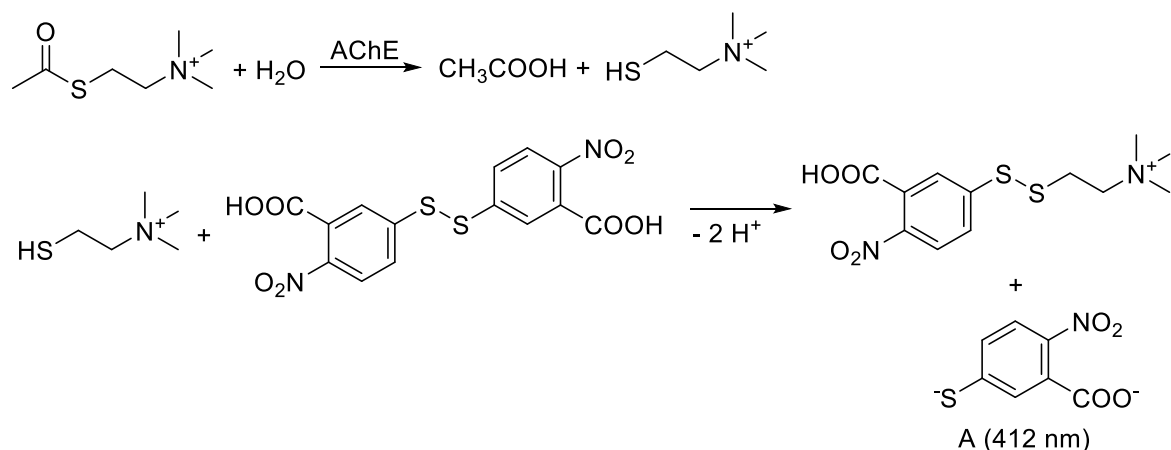


Schéma 4 Princip Ellmanovy metody [68]

7.2.2 Chemikálie a vybavení

- Ellmanovo činidlo (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)); použito v koncentraci 5×10^{-4} M a 0,1 M (Sigma-Aldrich/Merck; Praha, Česká republika)
- fosfátový pufr (PBS) s pH 7,4; použit 0,1 M (4,0 g NaCl, 0,1 g KH_2PO_4 , 1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g KCl do 500 ml destilované vody) (Lach-Ner; Neratovice, Česká republika)
- ATCh·I a BTCh·I; 0,1 M (Sigma-Aldrich/Merck; Praha, Česká republika) roztok rozpuštěný v PBS při stanovení aktivity AChE a 0,001 M roztok rozpuštěný v PBS při stanovení IC_{50}
- AChE rozpuštěná v 0,1 M PBS; původem z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) (Sigma-Aldrich/Merck; Praha, Česká republika)
- BuChE rozpuštěná v 0,1 M PBS; původem z koňského séra (Sigma-Aldrich/Merck; Praha, Česká republika)
- destilovaná voda
- námi připravené potenciální inhibitory včetně triklosanu
- spektrofotometr s diodovým polem (Hewlett-Packard 8453, Agilent Technologies, USA)

7.2.3 Postup měření

7.2.3.1 Stanovení aktivity AChE a BuChE

Před samotným měřením IC_{50} připravených inhibitorů bylo vždy potřeba stanovit aktuální aktivitu pro AChE a BuChE. Pro měření aktivity obou cholinesteráz platil stejný postup. Nejprve se změřil slepý roztok („blank“). Slepý roztok o celkovém objemu 2 ml byl připraven smícháním 0,8 ml roztoku Ellmanova činidla s 0,008 ml roztoku ATCh a 1,192 ml PBS.

Reakční směs ke stanovení aktivity cholinesteráz byla připravená smícháním 0,8 ml roztoku Ellmanova činidla s 0,008 ml roztoku ATCh, 0,008 ml roztoku AChE (nebo BuChE) a 1,184 ml PBS. Přidáním enzymu AChE (nebo BuChE) se odstartovala reakce, která byla spektrofotometricky změřená prostřednictvím závislosti absorbance na čase (konkrétně 70 s). Změřené hodnoty sloužily k vypočítání aktuální aktivity cholinesterázy podle rovnice: $y \cdot 17,67$, kde y je koeficient parametrické rovnice dané závislosti vypočítané pro $x=60$ (což vychází z definice 1 U). Číslo 17,67 je konstanta, která zahrnuje celkový objem vzorku s objemem enzymu a molární absorpčním koeficientem ϵ (412 nm) = $14\,150 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Měření aktivit jednotlivých enzymů bylo provedeno celkem šestkrát a poté byly všechny naměřené hodnoty zprůměrovány.

7.2.3.2 Stanovení IC_{50}

V prvním kroku byl připraven slepý roztok, který vznikl napipetováním 0,4 ml roztoku Ellmanova činidla, 1,52 ml PBS a 0,08 ml roztoku ATCh (0,001 M).

Následně byla třikrát změřena reakce bez inhibitoru. Reakční směs bez inhibitoru byla připravena smícháním 0,4 ml roztoku Ellmanova činidla s 0,08 ml roztoku ATCh (0,001 M). Objem přidaného roztoku s AChE (nebo BuChE) se vypočítal podle aktuální aktivity, která byla získána měřením její aktivity. Reakční směs bez inhibitoru byla doplněna PBS tak, aby celkový objem v kyvetě byly 2 ml.

V třetím kroku byly změřeny reakční směsi s našimi připravenými potenciálními inhibitory s tím, že koncentrace přidávaných inhibitorů byly různé podle jejich inhibiční aktivity. Byly zvoleny čtyři různé objemy roztoků inhibitorů pohybující se v rozmezí koncentrací 2×10^{-6} až 6×10^{-5} M. Každé měření s určitou koncentrací inhibitoru bylo měřeno dvakrát. Do měrné kyvety bylo vždy napipetováno 0,4 ml roztoku Ellmanova činidla a 0,08 ml

roztoku ATCh (0,001 M). Objem přidaného enzymu se vypočítal podle aktuální aktivity enzymu. Měrná kyveta byla doplněna PBS tak, aby celkový objem reakční směsi byly 2 ml.

Ze všech změřených hodnot (změna absorbance závislá na čase) byla vypočítána v programu Excel (Microsoft; Redmond, Spojené státy americké) reakční rychlost: $v = \Delta A / \Delta t$. Následně byl vytvořen graf závislosti v_0/v_i na $c(I)$, ze kterého se získala rovnice parametrické přímky. Prostřednictvím parametrické přímky byla dále vypočítána hodnota x , pro y platila hodnota 2. Vyplývá to z definice IC_{50} , což je koncentrace inhibitoru, která zpříčiní 50% inhibici enzymu (tj. způsobí pokles aktivity enzymu na 50 %).

Z naměřených hodnoty pro AChE a BuChE byl také vypočítán index selektivity (SI). Ten vyjadřuje, jakou selektivitu má inhibitor vůči AChE. Získává se výpočtem poměru $IC_{50} \text{ BuChE} / IC_{50} \text{ AChE}$. Je-li je hodnota SI sloučeniny nad 10, vykazuje selektivitu pro AChE, a pokud je hodnota pod 0,1, pak značí selektivitu pro BuChE.

7.2.3.3 Stanovení typu inhibice enzymu

Inhibitory mohou být reverzibilní nebo ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory lze rozdělit do čtyř skupin, a to na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené inhibitory. Typ inhibice je možné zjistit pomocí linerizace z Lineweaver-Burkova grafu a podle odpovídajícího porovnání dvou kinetických parametrů, jimiž jsou Michaelisova konstanta (K_M) a maximální rychlost (V_M) inhibované a neinhibované reakce. V naší práci jsme stanovovali typ inhibice triklosanu jakožto nejúčinnějšího inhibitoru cholinesteráz v rámci testovaných sloučenin. Postup měření k určení typu inhibice enzymu byl obdobný jako při stanovení IC_{50} . Aktivita enzymu v konečné reakční směsi byla 0,2 U/ml a koncentrace ATCh a BTCh byla v rozmezí od 20 μM až do 80 μM . Koncentrace Ellmanova činidla byla 0,1 mM. Pro každou z koncentrací substrátu byly použity čtyři různé koncentrace inhibitoru. Konkrétně u stanovení typu inhibice pro enzym AChE byly koncentrace 10 μM , 20 μM , 30 μM a 40 μM . U stanovení BuChE byly koncentrace 5 μM , 10 μM , 15 μM a 20 μM . Ze závislosti absorbance na čase byla vypočítána reakční rychlost. Všechna měření byla provedena vždy dvakrát a pro zhotovení Lineweaver-Burkova grafu byly použity zprůměrované hodnoty reakční rychlosti. Z rovnic regresivních křivek z Lineweaver-Burkova grafu byly vypočítány a zjištěny hodnoty maximální rychlosti a hodnoty Michaelisovy konstanty, a tím byl určen i typ inhibice. [71]

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce byla příprava šesti sloučenin a jejich dvou prekurzorů jako analog k molekule triklosanu, a biologické testování a hodnocení připravených sloučenin (antimikrobní aktivita vůči třem vybraným mykobakteriálním kmenům a inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE). Práce navazuje na předešlé studium potenciálních sloučenin vykazujících duální inhibiční biologickou aktivitu vůči mykobakteriím a cholinesterázám na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Z plánovaných sloučenin se podařilo připravit všechny finální produkty s dostatečnými výtěžky k měření NMR, IR, teploty tání, elementární analýzy i biologickému testování.

8.1 Design cílových molekul

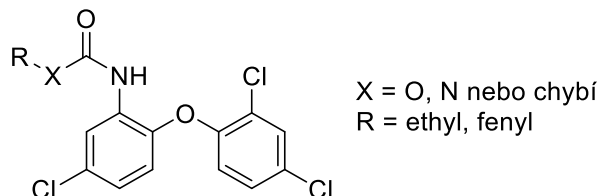
Sloučenina „amino-triklosan“ byla vybrána kvůli isosterické podobnosti s triklosanem (Obrázek 30), u kterého bylo prokázáno, že k inhibici InhA nepotřebuje žádnou bioaktivaci, tudíž dokáže přímo ovlivnit funkci enzymu InhA, a to i v případě rezistence na INH. [41] „Amino-triklosan“ stejně jako triklosan dokáže tvořit vodíkové můstky s enzymem InhA a různé substituenty mohou popř. přinést další interakce mezi molekulou a enzymem. Inspirací k přípravě prekurzoru „amino-triklosanu“ byl výzkum Freundlicha et al., kteří připravili řadu diarylmočovin na bázi „amino-triklosanu“. Ty vykazovaly slibnou *in vitro* aktivitu vůči ACP enzymu *P. falciparum* a *in vivo* aktivitu v myším modelu infekce *P. berghei*. [47]



Obrázek 30 isosterie "amino-triklosanu" s triklosanem

Účelem bylo ověřit, zda nahrazení fenolické za aminovou funkční skupinu ovlivní biologickou aktivitu, jelikož aminová skupina je hydrofilnější než hydroxylová, a další výhodou aminu je schopnost i po derivatizaci tvořit vodíkový můstek s cílovými enzymy. Při volbě substituentů byl kladen důraz na velikost struktury molekuly, proto byl vybrán malý alifatický (ethylový) a základní aromatický (fenylový) substituent (Obrázek 31). Oba substituenty patří k výchozím (základním) strukturám, jelikož je možné tyto substituenty dále podle naměřených

výsledků biologické aktivity snadno a rozsáhle obměňovat. Přítomnost karbamátové a močovinnové funkční skupiny byla zvolena, neboť karbamáty a močoviny jsou farmakofory pro jak pro antimikrobní aktivitu, tak AChE/BuChE inhibici.



Obrázek 31 obecný vzorec se substituenty

8.2 Syntetická část

Celkový počet všech připravených sloučenin je osm, z nichž šest sloučenin je cílových z hlediska charakterizace a hodnocení biologické aktivity (**A1**, **A2**, **M1**, **M2**, **K1** a **K2**), jejich prekurzory již byly v literatuře popsány. Všech šest cílových sloučenin vycházelo z připraveného prekurzoru „amino-triklosanu“ (5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)anilinu; **NH₂-ETER**), který byl připravený dvoukrokovou syntézou inspirovanou publikací Freudlicha a spol. z roku 2013. [47] V prvním kroku se prostřednictvím nukleofilní substituce aromatické připravil chlorovaný diarylether, konkrétně 2,4-dichlor-1-(4-chlor-2-nitrofenoxy)benzen (**NO₂-ETER**). Východí aromatický halogenderivát je aktivován nitro skupinou v *ortho*-poloze vůči atomu chloru, který podléhá substituci *in situ* vzniklým fenolátem. Dalším krokem byla redukce nitro skupiny na aminovou funkční skupinu. Ta byla provedena pomocí Raneyova niklu plynným vodíkem.

Již při pilotním reakčním kroku nastaly komplikace, kdy reakce, ačkoli byly převzaty z literatury, neproběhly vůbec nebo s malými výtěžky. K přípravě sloučeniny **NO₂-ETER** bylo proto vyzkoušeno a využito pět metod: 1) reakce, kdy se 2,4-dichlorfenol rozpustil spolu s 1,4-dichlor-2-nitrobenzenem ve vodě s následným přidáním KOH, a poté se celá reakční směs zahřála na teplotu varu rozpouštědla; 2) reakce, která byla shodná s první reakcí, pouze bylo použito odlišné rozpouštědlo, a to DMSO, s tím, že se směs zahřívala ve vodní lázni; 3) reakce, kdy se nechal nejdřív samotný 2,4-dichlorfenol roztavit při teplotě 110 °C a po roztavení byl přidán KOH, který se nechal spolu s 2,4-dichlorfenolem rozpustit, a následně byl přidán 1,4-dichlor-2-nitrobenzen a celá směs se nechala tavit, následně se přidala voda; 4) reakce, kdy se 2,4-dichlorfenol nechal rozpustit spolu s 1,4-dichlor-2-nitrobenzenem v THF, místo KOH byl použit NaH jako baze; a 5) postup, který byl shodný s třetí reakcí, pouze místo KOH bylo

použito NaOH. Nejlepší reakce z hlediska výtěžku byla třetí a pátá, kdy se nám osvědčila metoda dokonalého roztavení příslušného fenolu s nitrobenzenem bez přítomnosti rozpouštědla, resp. rozpouštědlo bylo přidáno až po roztavení všech přidávaných pevných sloučenin. Díky této metodě se nám podařilo získat vysoké výtěžky cílového produktu, které se pohybovaly v rozmezí 57-84 %. Redukce nitro skupiny probíhala hladce a bez komplikací. Redukce byla opakována celkem třikrát, protože výtěžky (70 %) z každé jednotlivé reakce by nebyly dostatečné k získání dostatečného množství aminového prekurzoru pro syntézu dalších plánovaných sloučenin. Domníváme se, že příčinou nižších výtěžků tohoto reakčního kroku byl fakt, že při purifikaci pomocí LSC došlo k částečné adsorbci produktu na silikagelu, neboť podle TLC byla konverze úplná. Produkt **NH₂-ETER**, i přes řadu pokusů o indukovanou krystalizaci a opakovanou purifikaci, byl získán jako viskózní kapalina, což se ukázalo být v souladu s literaturou. [63]

Dva amidy (**A1** a **A2**) se nám podařilo získat bez opakování syntéz hned na poprvé s dostatečnými výtěžky pro změření biologické aktivity i jejich charakterizaci, proto nebyla tato reakce dále optimalizována. Zvolena byla přímá acylace aminu acyl chloridy v přítomnosti terciárního aminu (triethylamin). Výtěžky amidů se pohybují v rozmezí 20-52 %. Domníváme se, že důvodem nízkých výtěžků byla neúplná konverze výchozí látky na produkt, resp. vznik vedlejších produktů, jelikož jsme ho pozorovali na TLC. Další ztrátu produktu způsobila purifikace sloučeniny **A2**, kdy bylo zvoleno přečištění produktu pomocí LSC metody, kde mohlo dojít k částečné ztrátě/adsorbci produktu na sloupci.

Syntéza močoviny **M1** byla problematictější. Sloučenina **M1** musela být nasyntetizována dvakrát, ačkoli při prvním pokusu bylo z TLC zřetelné, že vznikal produkt (i když to nebyla 100% konverze), nepodařilo se nám však získat ho ani v minimálním množství k charakterizaci. Až při druhém pokusu se nám podařilo získat produkt s 20% výtěžkem. Domníváme se, že důvodem neúspěchu při prvním pokusu mohl být přidáný isokyanát, který nebyl vlivem skladování v laboratoři chemicky čistý. Proto byl při opakované syntéze použit nový isokyanát a tato reakce již vedla k zisku produktu. Další důvod nízké výtěžnosti mohl spočívat v purifikaci a izolaci cílové sloučeniny. Příprava močoviny **M2** proběhla naopak bez komplikací a již při prvním pokusu byl výtěžek vyšší v porovnání s **M1**, a to 43 %. To opět může nepřímou naznačovat, že problémem mohl být opravdu „starý“ isokyanát, jelikož produkt **M2** byl připraven stejným způsobem jako **M1**.

Syntézy karbamátů se musely také opakovat, jelikož konečné produkty vznikaly při pilotních reakcích s velmi nízkými výtěžky. Příprava **K1** byla opakována dvakrát s 35% výtěžkem a **K2** třikrát s výtěžkem 22 %. Důvodem opakování syntéz u obou karbamátů bylo,

že podle TLC vznikaly další vedlejší produkty, tudíž konverze výchozí sloučeniny na produkt nebyla vždy 100%.

Praktické výtěžky, ačkoli nejsou příliš vysoké, byly dostatečné pro biologické hodnocení a charakterizaci připravených sloučenin.

Sedm sloučenin (**NO₂-ETER**, **A1**, **A2**, **M1**, **M2**, **K1** a **K2**) je v krystalické podobě a jedna sloučenina (**NH₂-ETER**) je v kapalném skupenství.

8.3 Antimikrobní aktivita

V Tabulce 4 jsou uvedené výsledky z měření MIC všech osmi připravených sloučenin včetně triklosanu a referenčního antituberkulotika INH vůči třem mykobakteriálním kmenům: avirulentnímu kmeni *M. tuberculosis* a dvěma kmenům rychle rostoucích atypických mykobakterií (*M. smegmatis* a *M. aurum*).

Tabulka 4 Hodnoty MIC

| Kód | MIC [mg/l] | | |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | <i>M. smegmatis</i> | <i>M. aurum</i> | <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra |
| NO₂-ETER | ≥500 | ≥500 | ≥500 |
| NH₂-ETER | 31,25 (108,30 μM) | 31,25 | 31,25 |
| A1 | 31,25 (94,52 μM) | 15,625 (47,26 μM) | 7,81 (23,62 μM) |
| A2 | ≥500 | ≥500 | ≥500 |
| M1 | ≥250 | ≥250 | ≥250 |
| M2 | 31,25 (76,97 μM) | 250 | 7,81 (19,24 μM) |
| K1 | ≥500 | ≥500 | ≥500 |
| K2 | 125 | 62,5 | 62,5 |
| triklosan | 15,625 | 7,81 | 7,81 |
| INH | 15,625 | 3,91 | 0,25 |

Všech osm připravených sloučenin vykazovalo vůči třem testovaným mykobakteriálním kmenům antimikrobní účinek. Obecně platí, že sloučeniny **NO₂-ETER**, **A2** a **K1** vykazovaly nejnižší účinek vůči všem mykobakteriím s hodnotami MIC větší nebo rovnou 500 mg/l. Tučně zvýrazněné hodnoty v tabulce znamenají nejnižší MIC pro daný kmen, tudíž nejlepší antimikrobní aktivitu. Sloučenina **A1** (*N*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid) vykazovala nejlepší inhibiční účinek vůči všem třem testovaným kmenům, a i v porovnání s triklosanem měla srovnatelný antimikrobní účinek.

Účinek plně srovnatelný s triklosanem má i sloučenina **M2** vůči *M. smegmatis* a *M. tuberculosis* a „amino-triklosan“ (**NH₂-ETER**) v případě *M. smegmatis*. Je zajímavé, že sloučeniny **NO₂-ETER** a **NH₂-ETER**, které se liší pouze ve funkční skupině ve stejné poloze na kruhu A, mají značně rozdílnou hodnotu MIC. Redukce nitro skupiny tak zvyšuje aktivitu nejméně 16×. Předpokládáme, že důvodem je schopnost amino skupiny ve sloučenině **NH₂-ETER** tvořit vodíkové můstky se svým buněčným cílem (na základě poznatků z krystalografické analýzy Freudlicha a spol. [47]), tj. interagovat s InhA. I další sloučeniny (amidy **A**, močoviny **M** a karbamáty **K**), které byly připraveny, mohou hypoteticky tvořit vodíkové můstky (**A1**, **A2**, **M1**, **M2**, **K1** a **K2**), ale mají různé hodnoty MIC v závislosti na typu funkční skupiny a její substituci. Např. sloučeniny **A2** a **K1** mají stejné MIC hodnoty jako **NO₂-ETER** (≥500 mg/l) vůči všem testovaným mykobakteriím i přes možnost vytvářet vodíkové můstky. Naopak sloučeniny **A1**, **M2** a **K2** mají ve srovnání s **NO₂-ETER** vůči třem druhům mykobakterií lepší hodnoty MIC pohybující se od 7,81 až 250 mg/l. Triklosan vykazoval srovnatelný inhibiční účinek s léčivem INH vůči *M. smegmatis* a *M. aurum* s hodnotami MIC 15,625 a 7,81 mg/l, ale má jasně vyšší MIC vůči *M. tuberculosis*.

U *M. smegmatis* měly nejlepší inhibiční účinky sloučeniny **NH₂-ETER**, **A1** a **M2** se stejnou hodnotou MIC 31,25 mg/l. I přesto, že triklosan s INH vykazovaly vůči tomuto mykobakteriálnímu kmeni inhibiční účinek s hodnotou MIC 15,625 mg/l, lze říci, že antimikrobní účinky sloučenin **NH₂-ETER**, **A1** a **M2** jsou srovnatelné s hodnotou triklosanu a INH, jelikož je rozdíl pouze v jednom ředění. Je zajímavé, že sloučenina **A1** s acetamidovou skupinou měla lepší MIC s hodnotou 31,25 mg/l oproti benzamidu **A2** s hodnotou MIC větší nebo rovnou 500 mg/l vůči *M. smegmatis*. Opět podle výzkumu Ende a spol. [44] jsme teoreticky předpokládali, že důvodem horšího antimikrobního účinku je aromatická struktura, která by mohla potenciálně způsobit sterickou poruchu při interakci s InhA, čímž by tedy mohla snížit antimykobakteriální aktivitu. To však nebylo opět potvrzeno, jelikož sloučeniny **M2** a **K2**, ve kterých je fenylový zbytek, mají lepší hodnotu MIC (v rozmezí 31,25 až 125 mg/l) než jejich analoga s ethylem **M1** (≥250 mg/l) a **K1** (≥500 mg/l).

U *M. aurum* vykazovala nejlepší hodnotu MIC sloučenina **A1** (15,625 mg/l). Triklosan vůči tomuto mykobakteriálnímu kmeni vykazoval MIC 7,81 mg/l, což je srovnatelná hodnota s **A1**. Po **A1** vykazovala sloučenina **NH₂-ETER** druhý nejlepší antimikrobní aktivitu s hodnotou MIC 31,25 mg/l a za ní následovala sloučenina **K2** s MIC 62,5 mg/l. Je zajímavé, že sloučeniny **M2** a **K2**, které obsahují fenylový substituent (výjimkou je sloučenina **A2**) vykazovaly nižší MIC hodnoty než jejich analoga **M1** a **K2** s alifatickým substituentem. Tím

se opět nepotvrdil předpoklad analogický k práci Ende a spol. [44]

Zajímavým zjištěním byla shodná hodnota 7,81 mg/l MIC vůči avirulentnímu kmeni *M. tuberculosis* H₃₇Ra u sloučenin **A1** a **M2**. Tato hodnota je stejná jako v případě triklosanu. Po **A1** a **M2** vykazovala sloučenina **NH₂-ETER** druhou nejlepší MIC hodnotu vůči *M. tuberculosis* H₃₇Ra (31,25 mg/l) a za ní následoval **K2** s hodnotou MIC 62,5 mg/l. Sloučeniny **M2** a **K2** obsahující fenylový zbytek vykazovaly opět lepší hodnoty MIC než jejich analoga s ethylem (**M1** a **K1**).

Celkové závěry ohledně výhodnosti acetylu či fenylu a také amidu, karbamátu nebo močoviny nebylo možno učinit, neboť výsledky jsou protichůdné. Pouze karbamáty jeví tendenci k nižší aktivitě než močoviny a amidy. Modifikací antimykobakteriálně *in vitro* účinného „amino-triklosanu“ (**NH₂-ETER**) lze získat sloučeniny s vystupňovanou aktivitou vůči *M. tuberculosis* (**A1**, **M2**), u atypických bakterií jsou její deriváty podobně či méně aktivní. K lepšímu objasnění vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou by bylo vhodné rozšířit sérii sloučenin, aby bylo možné naměřené hodnoty mezi sebou lépe srovnávat a korelovat. Prokázali jsme však, že aminový isoster triklosanu a jeho *N*-substituované deriváty mají antimykobakteriální aktivitu. Předpokládaný mechanismus účinku (inhibice InhA) však musí být ještě potvrzen experimentálně.

8.4 Inhibiční aktivity vůči cholinesterázám

V Tabulce 5 jsou uvedené hodnoty IC_{50} všech osmi připravených potenciálních inhibitorů cholinesteráz ze spektrofotometrického měření prostřednictvím Ellmanovy metody včetně triklosanu. Jako standard ke komparaci bylo použito klinicky užívané karbamátové léčivo rivastigmin.

Tabulka 5 Hodnoty IC_{50} a SI sloučenin vůči AChE a BuChE

| Kód | IC_{50} AChE [μ M] | IC_{50} BuChE [μ M] | SI |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|
| NO₂-ETER | 56,08±2,58 | >500 | >8,92 |
| NH₂-ETER | 151,14±2,76 | 11,93±0,04 | 0,08 |
| A1 | 48,85±0,68 | 46,11±0,82 | 0,94 |
| A2 | 61,88±0,24 | 367,74±18,89 | 5,94 |
| M1 | 69,83±0,64 | 164,03±4,76 | 2,35 |
| M2 | 67,31±1,43 | 201,21±7,67 | 2,99 |
| K1 | 76,14±4,91 | 28,82±0,92 | 0,38 |
| K2 | 71,54±0,25 | 116,17±7,76 | 1,62 |
| triklosan | 50,08±1,62 | 11,81±0,04 | 0,26 |
| rivastigmin | 56,10±1,41 | 38,40±1,97 | 0,68 |

SI je zkratkou pro index selektivity a vyjadřuje, jakou selektivitu má inhibitor vůči AChE. Získává se výpočtem poměru IC_{50} BuChE/ IC_{50} AChE. Je-li hodnota SI sloučeniny nad 10, vykazuje selektivitu pro AChE a naopak. Tučně označené výsledky znamenají nejlepší naměřenou inhibiční aktivitu vůči konkrétní cholinesteráze a nejvyšší selektivitu pro daný enzym.

Ze všech připravených sloučenin měla sloučenina **A1** (*N*-[5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid) s amidovou funkční skupinou nejlepší inhibiční účinek vůči AChE (48,85 μ M), což je v porovnání se standardem rivastigminem (56,10 μ M) mírně lepší inhibiční hodnota. Připravený prekurzor „amino-triklosan“ **NH₂-ETER** vykazoval nejlepší inhibiční účinek vůči BuChE (11,93 μ M), opět v porovnání s rivastigminem (38,40 μ M) má trojnásobně lepší inhibiční aktivitu.

NO₂-ETER (56,08 μ M) vykazoval srovnatelnou inhibiční aktivitu vůči AChE jako léčivo rivastigmin (56,10 μ M). Tento nitrovaný diarylether vykazoval lepší inhibiční účinek vůči AChE než **NH₂-ETER** (151,14 μ M) s volnou aminovou funkční skupinou. Naopak **NH₂-ETER** (11,93 μ M) měl podstatně lepší hodnoty IC_{50} vůči BuChE než jeho neredukovaný prekurzor **NO₂-ETER** (větší než 500 μ M). Redukce nitro skupiny na amino skupinu tak

podstatně zvyšuje inhibici BuChE (nejméně 42×) při současném zvýšení IC₅₀ pro AChE (2,7×).

Očekávali jsme na základě analogie, že dvojice sloučenin **K1** a **K2** obsahující karbamátovou funkční skupinu bude vykazovat ze všech připravených sloučenin nejlepší inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE, avšak z měření se zjistilo, že vystupňované účinnosti bylo dosaženo pouze vůči druhému enzymu, a to dokonce jen u jedné ze sloučenin – **K1** (IC₅₀ BuChE = 28,82 μM); podle předpokladů jde o její nejúčinnější inhibitor z připravených *N*-modifikovaných sloučenin. Sloučenina **K2** měla v porovnání s **K1** horší inhibiční aktivitu vůči BuChE (116,17 μM), na AChE **K2** vykazovala srovnatelnou inhibiční aktivitu (71,54 μM) jako **K1** (76,14 μM). Sloučenina **K1** dokonce inhibovala BuChE lépe než rivastigmin.

Inhibice BuChE byla znatelně horší, pokud byl do struktury sloučeniny zaveden další aromatický kruh (náhrada ethylu za fenyl). Např. benzamid **A2** (367,74 μM) vykazoval výrazně horší inhibiční aktivitu vůči BuChE než acetamid **A1** (46,11 μM), močovina **M2** (201,21 μM) s fenylovým zbytkem vykazovala horší účinek vůči BuChE než močovina **M1** (164,03 μM) a karbamát **K2** (116,17 μM) měl vyšší hodnoty IC₅₀ než karbamát **K1** (28,82±0,92 μM). Naopak inhibice AChE je u amidů snížena jen mírně, u karbamátů a močovín vede fenyl dokonce k mírně lepší inhibici. Fenylový fragment tedy zvyšuje selektivitu pro AChE.

Co se týče indexu selektivity (SI), pouze jedna sloučenina, **NH₂-ETER**, vykazuje selektivitu vůči BuChE, a to s hodnotou 0,08. Žádná z osmi sloučenin, ani triklosan, nevykazuje selektivitu vůči AChE. Ostatní inhibitory mají hodnoty SI mezi 0,1 a 10. Triklosan s hodnotou SI 0,26 a karbamát **K1** (SI = 0,38) jsou další inhibitory s více vyjádřenou selektivitou vůči BuChE, naopak sloučenina **NO₂-ETER** má nejbližší k hodnotě 10, tj. inhibuje výrazně selektivněji AChE. Amid **A1** inhibuje oba enzymy stejně účinně, ostatní sloučeniny jsou mírně účinnější inhibitory AChE.

Překvapením byly dosud v literatuře nepublikované hodnoty IC₅₀ triklosanu (vůči AChE 50,08 μM, vůči BuChE 11,81 μM), jelikož vůči oběma enzymům vykazoval srovnatelný či lepší *in vitro* inhibiční účinek než léčivo rivastigmin (vůči AChE 56,10 μM, BuChE 38,40 μM). Triklosan vykazoval srovnatelnou inhibici AChE s připravenou sloučeninou **A1** (48,85 μM), která vykazovala nejlepší hodnotu IC₅₀ vůči AChE. Vůči BuChE měl triklosan srovnatelnou hodnotu IC₅₀ s jeho aminovým isosterem **NH₂-ETER** (11,93 μM), která vykazovala nejlepší inhibiční schopnost vůči BuChE z nově syntetizovaných derivátů. Pro inhibici BuChE tedy není důležité, zda je diarylether substituovaný hydroxylovou nebo aminovou funkční skupinou, kdežto v případě AChE je přítomnost hydroxylové skupiny jednoznačně výhodnější; rozdíl IC₅₀ triklosanu a „amino-triklosanem“ je trojnásobný. Tyto

poznatky jsou perspektivní k přípravě a dalšímu studiu triklosanových analog jakožto potenciálních inhibitorů AChE a BuChE.

Lze ještě konstatovat důležitý závěr, že vůči AChE vykazují nejlepší inhibiční účinek amidy a vůči BuChE působí nejlépe karbamáty. Chemická modifikace „amino-triklosanu“ vždy zlepšuje aktivitu vůči AChE, avšak na druhou stranu zhoršuje inhibici BuChE.

Z výsledků se potvrdily závěry dříve publikovaných studií, že sloučeniny obsahující amidovou, karbamátovou nebo močovinovou skupinu dokáží inhibovat AChE. [52] [53] [54] [57] [58] Dále se potvrdil obecný poznatek z bakalářské práce [72], že pokud má sloučenina dobrou inhibiční účinnost na AChE, tak aktivita vůči BuChE bude naopak horší. Toto tvrzení platí i naopak; bude-li inhibiční aktivita vůči BuChE dobrá, vůči AChE bude inhibiční aktivita horší.

8.4.1 Typ inhibice triklosanu

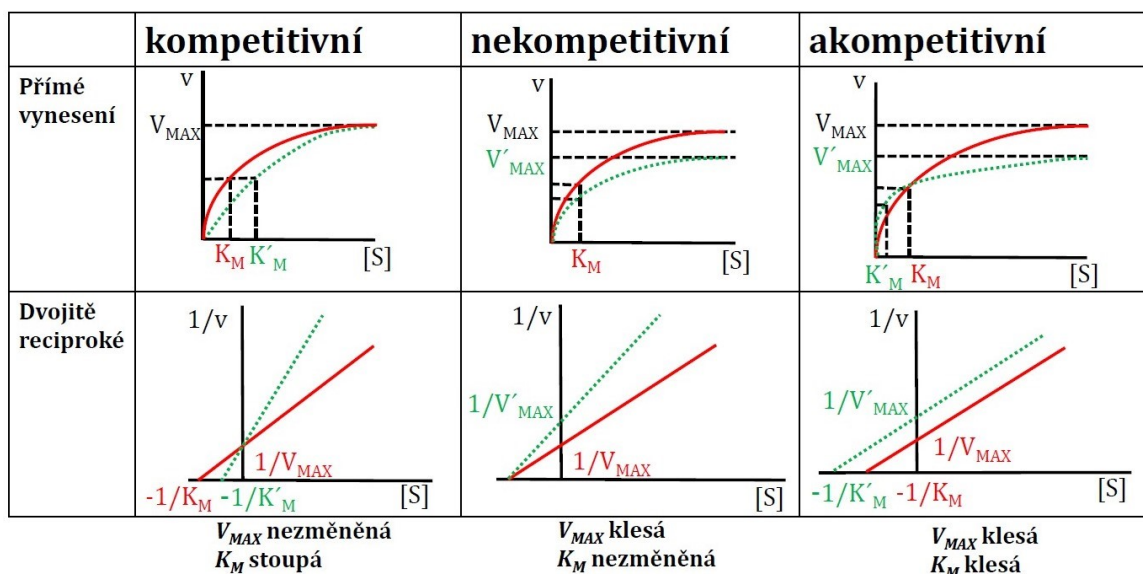
V odborné literatuře jsou popsány čtyři hlavní typy reversibilní enzymové inhibice. Pro kompetitivní inhibici platí, že inhibitor i substrát mezi sebou soutěží o volný enzym. Struktura inhibitoru je podobná substrátu a inhibitor se váže do aktivního místa enzymu. Kompetitivní inhibitor snižuje koncentraci volného enzymu schopného vázat substrát. K dosažení mezní rychlosti je proto nutné zvýšit koncentraci substrátu, tím se vytěsňuje inhibitor z vazby na enzym a dochází tak ke zvýšení Michaelisovy konstanty. [73]

U nekompetitivní inhibice neovlivňuje inhibitor vazbu substrátu, neváže se do aktivního místa enzymu a inhibitor se váže na volný enzym i na komplex [enzym-substrát]. Zvýšením koncentrace substrátu se rychlost nezvýší, Michaelisova konstanta se nemění a mezní rychlost se snižuje. Většina fyziologických inhibitorů vykazuje nekompetitivní typ inhibice. [73]

U akompetitivní inhibice nastává situace, že inhibitor nereaguje s volným enzymem, ale po navázání substrátu na enzym se pozmění konformaci enzymu a inhibitor se poté naváže na komplex [enzym-substrát] a vzniká tak komplex [enzym-substrát-inhibitor]. V tomto případě inhibitor brání přeměně substrátu na produkt. S akompetitivní inhibicí se setkáváme většinou u enzymů pracujících s více substráty. Pro akompetitivní typ inhibice platí, že se hodnoty Michaelisovy konstanty a mezní rychlosti snižují stejnou měrou a jejich poměr zůstává neměnný. [73]

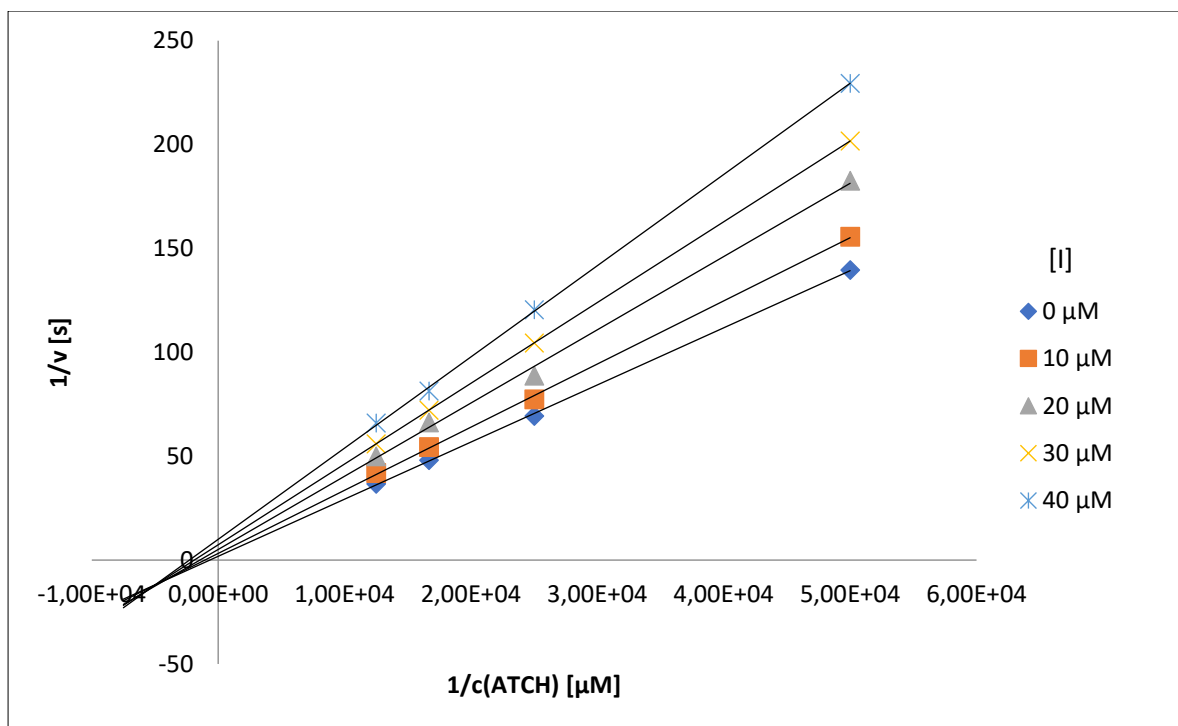
Čtvrtým typem inhibice je smíšená inhibice. U smíšené inhibice se hodnoty Michaelisovy konstanty a mezní rychlosti mění a zároveň se v porovnání s neinhibovanou reakcí mění i poměr obou těchto hodnot. [73]

Na Obrázku 32 jsou shrnuty tři typy reverzibilních inhibicí bez smíšené inhibice. [74]

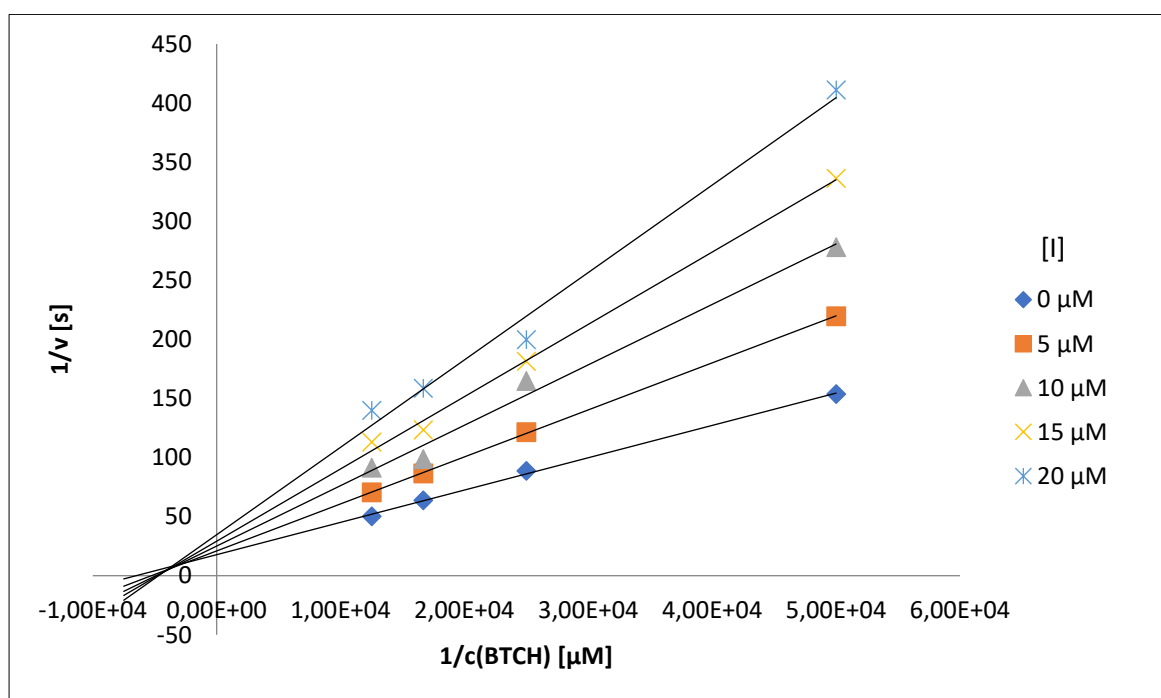


Obrázek 32 Shrnutí reverzibilní inhibice [74]

U triklosanu jakožto molekuly kombinující vysokou inhibiční účinnost na obě cholinesterázy jsme se rozhodli stanovit typ inhibice, a to i vzhledem k absenci literárních údajů. Z naměřených hodnot reakčních parametrů (konkrétně z mezní rychlosti a Michaelisovy konstanty) triklosanu vůči AChE (Obrázek 33) a BuChE (Obrázek 34) bylo zjištěno, že triklosan je smíšeným inhibitorem AChE i BuChE. Vyplyývá to z faktu, že se u inhibovaných reakcí mění jak Michaelisova konstanta, tak i mezní rychlost, a zároveň se v porovnání s reakcí, která není inhibována, mění i jejich poměr.



Obrázek 33 Graf inhibiční aktivity trikloranu vůči AChE podle Lineweavera a Burka



Obrázek 34 Graf inhibiční aktivity trikloranu vůči BuChE podle Lineweavera a Burka

9 ZÁVĚR

Podářilo se připravit šest plánovaných sloučenin plus jejich dva prekurzory. Všechny produkty byly získány v čistém stavu a v dostatečném množství pro všechna potřebná měření (IČ, NMR, teplota tání, elementární analýza, IC₅₀, antimykobakteriální aktivita). Připravené deriváty byly biologicky otestovány a na základě získaných výsledků byly stanoveny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. *N*-[5-Chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl]acetamid měl vůči všem mykobakteriím nejlepší antimikrobní účinek. Předpokládáme, že mechanismus účinku spočívá v inhibici InhA. Tato sloučenina vykazovala také nejlepší hodnotu IC₅₀ vůči AChE a má lepší *in vitro* inhibiční účinek než klinicky používané karbamátové léčivo rivastigmin. Nejnížší hodnotu IC₅₀ vůči BuChE vykazoval prekurzor „amino-triklosan“ a v porovnání se standardem rivastigminem vykazoval trojnásobně lepší inhibiční účinek. Také jsme objevili, že triklosan vykazuje duální inhibici obou enzymů a jedná se o smíšený typ inhibice. Ze vztahů mezi biologickou aktivitou a strukturou vyplývá, že analoga na bázi „amino-triklosanu“ jsou perspektivní pro další studium jakožto potenciální inhibitory AChE a BuChE a antimykobakteriální látky.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 izoniazid..... | 30 |
| Obrázek 2 rifampicin..... | 31 |
| Obrázek 3 pyrazinamid | 31 |
| Obrázek 4 streptomycin | 31 |
| Obrázek 5 ethambutol | 31 |
| Obrázek 6 thioamidy | 36 |
| Obrázek 7 kyselina 4-aminosalicylová | 36 |
| Obrázek 8 cykloserin..... | 36 |
| Obrázek 9 imipenem | 36 |
| Obrázek 10 delamanid..... | 36 |
| Obrázek 11 bedachilin..... | 37 |
| Obrázek 12 triklosan | 41 |
| Obrázek 13 difenyletherová struktura základního modelu | 41 |
| Obrázek 14 obecná struktura nejúčinnějších 5-alkyl-2-fenoxyfenolů | 42 |
| Obrázek 15 obecná struktura derivátů 5-hexyl-2-fenoxyfenolů s aminovými funkcemi | 42 |
| Obrázek 16 obecná struktura monochlor-triklosanových derivátů | 42 |
| Obrázek 17 obecný vzorec diarylmočoviny odvozených od „amino-triklosanu“ | 42 |
| Obrázek 18 analog triklosanu s aminovou skupinou nahrazující hydroxylovou skupinu („amino-triklosan“) | 42 |
| Obrázek 19 donepezil..... | 43 |
| Obrázek 20 galantamin | 43 |
| Obrázek 21 rivastigmin..... | 43 |
| Obrázek 22 obecný vzorec salicylanilidových (thio)karbamátů | 45 |
| Obrázek 23 obecný vzorec salicylanilidových diethyl-(thio)fosfátů | 45 |
| Obrázek 24 obecný vzorec benzofuranylthiazolových hybridů..... | 45 |
| Obrázek 25 obecné vzorce kumarylthiazolových derivátů obsahujících (thio)močovinou skupinu | 45 |
| Obrázek 26 obecný vzorec derivátů amino-triklosanu s amidovou skupinou | 46 |
| Obrázek 27 obecný vzorec derivátů „amino-triklosanu“ s močovinou skupinou..... | 46 |
| Obrázek 28 obecný vzorec derivátů „amino-triklosanu“ s karbamátovou skupinou..... | 46 |
| Obrázek 29 obecný vzorec tetraonů | 47 |
| Obrázek 30 isosterie "amino-triklosanu" s triklosanem..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 31 obecný vzorec se substituenty | 74 |
| Obrázek 32 Shrnutí reverzibilní inhibice [74] | 82 |
| Obrázek 33 Graf inhibiční aktivity triklosanu vůči AChE podle Lineweavera a Burka | 83 |
| Obrázek 34 Graf inhibiční aktivity triklosanu vůči BuChE podle Lineweavera a Burka..... | 83 |

11 SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Kvantitativní hodnocení mikroskopického nálezu..... | 24 |
| Tabulka 2 Kvantitativní hodnocení narostlých kolonií na pevné půdě..... | 25 |
| Tabulka 3 Kritická koncentrace esenciálních antituberkulotik..... | 30 |
| Tabulka 4 Hodnoty antimikrobní aktivity..... | 76 |
| Tabulka 5 Hodnoty IC ₅₀ a SI sloučenin vůči ACHE a BuChE..... | 79 |

12 SEZNAM SCHÉMAT

| | |
|---|----|
| Schéma 1 Vznik isonikotinoyl-NADH komplexu | 33 |
| Schéma 2 Reakce pyridoxalu s INH za vzniku hydrazidu-hydrazonu..... | 33 |
| Schéma 3 Degradace acetylcholinu prostřednictvím AChE | 43 |
| Schéma 4 Princip Ellmanovy metody [68] | 70 |

13 LITERATURA

1. PLESKOT, Ondřej, HERINK, Josef, FUSEK, Josef. *Základy speciální farmakologie*. Univerzita Pardubice. **2019**. ISBN 9788075602589.
2. BULTAS, Jan. Působení léčiva na úrovni ovlivnění funkce enzymu. *Remedia*. **2014**, 24(4), 1-5.
3. HAMPLOVÁ, Lidmila. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol. Stanislav Juhaňák – Triton, **2015**. ISBN 9788073879341.
4. HAVLOVÁ, Květa. Jeden z otců mikrobiologie Robert Koch zemřel před 100 lety. *Euro.cz* [online]. **2010** [cit. 2020-09-15] Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/denni-zpravy/profesni-aktuality/jeden-z-otcu-mikrobiologie-robert-koch-zemrel-pred-100-lety-451997>
5. Global Tuberculosis Report 2020. *World Health Organization*. [online]. **2020** [cit. 2020-10-22] ISBN 9789240013131. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
6. BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANĀKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK, Jiří VÁVRA a kol. *Lékařská mikrobiologie*. Triton, **1996**. ISBN 8594031505280.
7. VAŠÁKOVÁ Martina, Ivana HRICÍKOVÁ a Emília KOPECKÁ. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. *Remedia*. **2016**, 2016(3), 236-241.
8. *Zpráva o stavu demence*. Praha: Česká alzheimerská společnost. **2016**. ISBN 9788086541501.
9. VALIŠ, Martin, Filip CAISBERGER a Libor ŠIMŮNEK. Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia*. **2014**(6), 396-399.
10. RIOJAS, A. Marco, Katya J. MCGOUGH, Cristin J. RIDER-RIOJAS, Nalin RASTOGI a Manzur Hernando HAZBÓN. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2018**, 2018 (68), 324-332.
11. SOLOVIČ, Ivan, VAŠÁKOVÁ, Martina a kol. *Tuberkulóza ve faktech i obrazech*. Praha. Maxdorf-Jessenius. **2019**. ISBN 9788073456139.
12. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha. Grada, **2010**. Sestra (Grada). ISBN 9788024731704.

13. SABLE, Suraj B., James E. POSEY a Thomas J. SCRIBA. Tuberculosis Vaccine Development: Progress in Clinical Evaluation. *Clinical Microbiology Reviews*. **2019**, 33(1), e00100-19.
14. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2019. Praha. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. [online]. **2019**. [cit. 2020-10-28] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008314/tbc2019-cz.pdf>
15. Tuberkulínový test. *Lab tests online*. [online]. **2020** [cit. 2020-09-16] Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/tuberkulinovy-test.html>
16. KŘEPELA, Karel. *Tuberkulóza dětí a dorostu a její diferenciální diagnostika*. Praha. Maxdorf-Jessenius. **1995**. ISBN 8085912031.
17. JIRSA, Roman. Vyšetření na tuberkulosu a mykobakteriosy – Provádění, možnosti a interpretace mikrobiologických vyšetření. *Klaudianova nemocnice, Oddělení klinické mikrobiologie, Laboratorní příručky a postupy*. [online]. **2020** [cit. 2020-09-22] Dostupné z: http://www.klaudianovanemocnice.cz/assets/File.ashx?id_org=427004&id_dokumenty=1667
18. KŘEPELA, Karel. Diagnostika a léčba tuberkulózy dětí a mladistvých v ČR. *Pediatric pro praxi*. **2007**, 8(4), 208-210.
19. PETRUCCIOLI, Elisa, Valentina VANINI, Teresa CHIACCHIO, Gilda CUZZI, Daniela Maria CIRILLO, Fabrizio PALMIERI, Giuseppe IPPOLITO a Delia GOLETTI. Analytical evaluation of QuantiFERON-Plus and QuantiFERON-Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. **2017**, 106, 38-43.
20. PIETERMAN, Elise D., F.G. LIQUI LUNG, Annelies VERBON a kol. A multicentre verification study of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay. *Tuberculosis*. **2018**, 108, 136-142.
21. GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, **2003**. ISBN 8071576573.
22. MCEVOY, Christopher R.E., Alecia A. FALMER, Nicolaas C. Gey VAN PITTIUS, Thomas C. VICTOR, Paul D. VAN HELDEN a Robin M. WARREN. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. **2007**, 87(5), 393-404.
23. ROYCHOWDHURY, Tanmoy, Saurav MANDAL a Alok BHATTACHARYA. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*. **2015**, 5(1), 12567.
24. NASIRI, Mohammad J., Mehri HAEILI, Mona GHAZI, Hossein GOUDARZI, Ali

- PORMOHAMMAD, Abbas A. IMANI FOOLADI a Mohammad M. FEIZABADI. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*. **2017**, 8.
25. PIH Guide to the Medical Management of Multidrug-Resistant Tuberculosis. International Edition. *Partners In Health*. **2003**. ISBN 09744222207.
26. SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum. **2017**. ISBN 9788024637334.
27. MARRAKCHI, Hedia, Gilbert LANÉELLE a Annaïk QUÉMARD. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. **2000**, 146(2), 289-296.
28. BADRINATH, Madhuri a Savio JOHN. Isoniazid Toxicity. *StatPearls Publishing*. [online]. **2020** [cit. 2020-10-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531488/>
29. KATZUNG, G. Bertram ed. *Základní & klinická farmakologie*. Jinočany: H & H, **1995**. Lange Medical Book. ISBN 8085787350.
30. KALLICK, Charles A., Daniel A. FRIEDMAN a Mramba B.A. NYINDO. Could ehrlichial infection cause some of the changes associated with leukemia, myelodysplastic diseases and autoimmune disorders, and offer antibiotic treatment options? *Medical Hypotheses*. **2015**, 85(6), 891-893.
31. LEE, Nick a Hoang NGUYEN. Ethambutol. *StatPearls Publishing*. [online]. **2020** [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559050/>
32. BÁRTŮ, Václava. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína*. **2007**, 9(9), 372-373.
33. KRÁTKÝ, Martin a Jarmila VINŠOVÁ. Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově rezistentní kmeny. *Chemické listy*. **2010**, 104, 998-1005.
34. BÁRTŮ, Václava. Tuberkulóza – infekční choroba v 21. století. *Medicína pro praxi*. **2008**, 5(6), 245-248.
35. CADE, Christine E., Adrienne C. DLOUHY, Katalin F. MEDZIHRADESKY, Saida Patricia SALAS-CASTILLO a Reza A. GHILADI. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Science*. **2010**, 19(3), 458-474.
36. UPTON, A. M., A. MUSHTAQ, T. C. VICTOR, S. L. SAMPSON, J. SANDY, D-M. SMITH, P. V. VAN HELDEN a E. SIM. Arylamine *N*-acetyltransferase of *Mycobacterium*

- tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Molecular Microbiology*. **2001**, 42(2), 309-317.
37. NIKIFOROV, O. Petar, Michal BLASZCZYK, Sachin SURADE, Helena I. BOSHOFF, Andaleeb SAJID, Vincent DELORME, Nathalie DEBOOSERE, Priscille BRODIN, Alain R. BAULARD, Clifton E. BARRY III., Tom L. BLUNDELL a Chris ABELL. Fragment-sized EthR Inhibitors Exhibit Exceptionally Strong Ethionamide Booster Effect in Whole-Cell *Mycobacterium tuberculosis* Assays. *ACS Chemical Biology*. **2017**, 12(5), 1390-1396.
38. PASTOR, Alexandra, Arnaud MACHELART, Xue LI, Nicolas WILLAND, Alain R. BAULARD, Priscille BRODIN, Ruxandra GREF a Didier DESMAËLE. A novel codrug made of ethionamide and its potentiating booster: synthesis, self-assembly into nanoparticles and antimycobacterial evaluation. *Organic and Biomolecular Chemistry*. [online]. **2019**, 20 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z:
<https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2019/OB/C9OB00680J#!divAbstract>
39. BEHAR, Samuel M. a Chris SASSETTI. Tuberculosis vaccine finds an improved route. *Nature*. **2020**, 577(7788), 31-32.
40. MARTIN, Carlos, Nacho AGUILO a Jesús GONZALO-ASENSIO. Vaccination against tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **2018**, 36(10), 648-656.
41. VOSÁTKA, Rudolf, Martin KRÁTKÝ a Jarmila VINŠOVÁ. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2018**, 114, 318-331.
42. RODRIGUEZ, Frédéric, Nathalie SAFFON, Jose Camilla SAMMARTINO, Giulia DEGIACOMIC, Maria Rosalia PASCA a Christian LHERBET. First triclosan-based macrocyclic inhibitors of InhA enzyme. *Biorganic Chemistry*. **2020**, 95, 1-10.
43. SULLIVAN, Todd J., James J. TRUGLIO, Melissa E. BOYNE a kol. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chemical Biology*. **2006**, 1(1), 43-53.
44. Am ENDE, Christopher W., Susan E. KNUDSON, Nina LIU a kol. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether InhA inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18(10), 3029-3033.
45. FREUNDLICH, Joel S., Feng WANG, Catherine VILCHÈZE a kol. Triclosan Derivatives: Towards Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*. **2009**, 4(2), 241-248.
46. SIVARAMAN, Sharada, Todd J. SULLIVAN, Francis JOHNSON, Polina NOVICHENOK, Guanglei CUI, Carlos SIMMERLING a Peter J. TONGE. Inhibition of

- the Bacterial Enoyl Reductase FabI by Triclosan: A Structure–Reactivity Analysis of FabI Inhibition by Triclosan Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 47(3), 509-518.
47. ANDERSON, W. John, Dimitri SARANTAKIS, L. Ager WILLIAM, R. JACOBS Jr. Guy A. Schiehser Sean ENKIS, James C. SACCHETTINI, David P. JACOBUS, David A. FIDOCK a Joel S. FREUNDLICH. Novel diaryl ureas with efficacy in a mouse model of malaria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, 23, 1022-1025.
48. BRUNOVSKÝ, Martin. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. **2007**, 2007(2), 112-117.
49. DEUTCH, Ariel Y. a Robert H. ROTH. Neurotransmitters. *Fundamental Neuroscience*. **2013**, 2013(6), 117-138.
50. NAGAENDRAN, Kandiah, Ming-Chyi PAI a Vorapun SENANARONG. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular demetia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*. **2017**, 2017(12), 697-707.
51. PATOČKA, Jiří, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. Ladostigil – další snaha o dualistické kognitivum. *Psychiatrie*. **2013**, 17(2), 71-73.
52. IMRAMOVSKY, Ales, Sarka STEPANKOVA, Jan VANCO, Karel PAUK, Juana MONREAL-FERRIZ, Jarmila VINSOVA a Josef JAMPILEK. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Salicylanilide *N*-Alkylcarbamates and Their Molecular Docking. *Molecules*. **2012**, 17(9), 10142-10158.
53. VINŠOVÁ, Jarmila, Martin KRÁTKÝ, Markéta KOMLÓOVÁ, Echchukattula DADAPEER, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína VORČÁKOVÁ a Jiřina STOLAŘÍKOVÁ. Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterase Inhibition. *Molecules*. **2014**, 19(6), 7152-7168.
54. KRÁTKÝ, Martin, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína VORČÁKOVÁ, Markéta ŠVARCOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules*. **2016**, 21(2), 291.
55. FANG, Lei, Birgit KRAUS, Jochen LEHMANN, Joerg HEILMANN, Yihua ZHANG a Michael DECKER. Design and synthesis of tacrine–ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18(9), 2905-2909.
56. FANG, Lei, Xubin FANG, Shaohua GOU, et al. Design, synthesis and biological evaluation of D-ring opened galantamine analogs as multifunctional anti-Alzheimer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, 76, 376-386.

57. KURT, Belma Zengin, Isil GAZIOGLU, Livia BASILE, Fatih SONMEZ, Tiziana GINEX, Mustafa KUCUKISLAMOGLU a Salvatore GUCCIONE. Potential of aryl-urea-benzofuranylthiazoles hybrids as multitasking agents in Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2015**, 102, 80-92.
58. KURT, Belma Zengin, Isil GAZIOGLU, Fatih SONMEZ a Mustafa KUCUKISLAMOGLU. Synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel coumarylthiazole derivatives. *Bioorganic Chemistry*. **2015**, 59, 80-90.
59. BHARKAVI, Chelliah, Sundaravel VIVEK KUMAR, Mohamed ASHRAF ALI, Hasnah OSMAN, Shanmugam MUTHUSUBRAMANIAN a Subbu PERUMAL. One-pot microwave assisted stereoselective synthesis of novel dihydro-2'*H*-spiro[indene-2,1'-pyrrolo-[3,4-*c*]pyrrole]-tetraones and evaluation of their antimycobacterial activity and inhibition of AChE. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2017**, 27(14), 3071-3075.
60. STANKOV-JOVANOVIĆ, V.P., M.D. ILIĆ, V.D. MITIĆ, T.M. MIHAJLOV-KRSTEV, S.R. SIMONOVIĆ, S.D. NIKOLIĆ MANDIĆ, J.C. TABET a R.B. COLE. Secondary metabolites of *Seseli rigidum*: Chemical composition plus antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibition activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2015**, 111, 78-90.
61. JANEČKOVÁ, Anna a Pavel KLOUDA. *Organická chemie*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda. **1998**, ISBN 80-902155-6-4/9802.
62. HRABÁLEK, Alexandr, KUBICOVÁ, Lenka, KUNEŠ, Jiří, POUR, Milan a Jarmila VINŠOVÁ. *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum. **1999**. ISBN 8071849685.
63. Jiangsu Youpu Biochemical Technology Co., Ltd. Zhang Jiqian; Wang Renwei; Shi Yunyun; Xu Yingying. Method for synthesizing 2,4,4'-trichlorine-2'-aminodiphenyl ether through hydrogenation reduction. CN108218729. **2018**. A.
64. DORF KETAL CHEMICALS (I) PRIVATE LIMITED. WO2009/90669. A process for the preparation of 5-chloro-2(2,4-dichlorophenoxy) aniline. **2009**, A2.
65. FUHRER, H., P. SUTTER a C. D. WEIS. A new ring closure reaction of 2-phenoxyphenols and 3-(phenoxy)pyridines. Synthesis of halogenated 10-methylphenoxazines and 10-methyl[1,4]benzoxazino[3,2-*b*]pyridines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1979**, 16(6), 1121-1134.
66. YANG, Teng-Kuei, LEE, Dong-Sheng a HAAS, Julia. „Raney Nickel“. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. New York: John Wiley & Sons. [online]. **2005** [cit. 2021-2-1]. Dostupné z: doi:10.1002/047084289X.rr001.pub2.

67. KRÁTKÝ, Martin, Ondřej JANDŮREK, Zsuzsa BARANYAI, Eva NOVOTNÁ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Szilvia BŐSZE a Jarmila VINŠOVÁ. Phenolic *N*-monosubstituted carbamates: Antitubercular and toxicity evaluation of multi-targeting compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2019**, 181 (1), 111578.
68. ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, Kamil KUČA, Daniel JUN a Jiří BAJGAR. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků. *Chemické listy*. **2010**, 104(1), 46-50.
69. ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Stanovení aktivity AChE ELM: Protokol k laboratorním praktikám z biochemie*. Fakulta chemicko-technologická v Pardubicích [cit. 2021-16-02].
70. ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Stanovení IC₅₀: Protokol k laboratorním praktikám z biochemie*. Fakulta chemicko-technologická v Pardubicích [cit. 2021-16-02].
71. KRÁTKÝ, Martin, Katarína SVRČKOVÁ, Quynh Anh VU, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ a Jarmila VINŠOVÁ. Hydrazones of 4-(Trifluoromethyl)benzohydrazide as New Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase. *Molecules*. **2021**, 26(4), 989. ISSN 1420-3049.
72. VU, Quynh Anh. Syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů cholinesteráz. [online] Hradec Králové, **2019**. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova. Vedoucí práce: PharmDr. Martin Krátký, Ph.D. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/195540/>.
73. KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. **2015**. ISBN 9788070809273.
74. RAISOVÁ, Lucie. *Enzymy a enzymová kinetika*. [online] Hradec Králové, **2020**. [cit. 2021-04-14] Studijní materiály k předmětu Obecná biochemie. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova. Dostupné z: file:///C:/Users/q-anh/Downloads/02-04-Enzymy-ZBI-2020.pdf