

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykobakteriálních látek



Abstrakt: Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykobakteriálních látek

Tuberkulóza patří mezi třetí nejrozšířenější infekční onemocnění ve světě. Jedná se o nemoc, která nepostihuje jen některé státy, ale s tímto problémem se potýkají všechny země světa. Aby došlo ke snížení počtu nemocných, nebo dokonce k vymýcení této nemoci, je potřeba spolupráce více zemí. To je i jedním z mnoha úkolů Světové zdravotnické organizace a cílem programu TAACF zřízeného Southern Research Institute.

Diplomová práce shrnuje poznatky o této nemoci a možnosti její léčby a prevence. Hlavní část je věnována metodice testování potenciálních antituberkuloticky aktivních látek. V praktické části jsou uvedeny látky, které jsem testovala proti čtyřem různým kmenům mykobakterií na tuberkulotickostatickou aktivitu *in vitro*.

Klíčová slova: tuberkulóza, antituberkulotika, benzoxazoly, pyraziny, antimykobakteriální aktivita, MIC

Abstrakt: Potential antimycobacterial compounds activity evaluation

The tuberculosis belongs to three the most extended infectious diseases in the world. It is the illness, which affects not only some states. On the contrary, yast majority of countries face with this problem. It is really important to co-operate with many countries to decrease the number of infected humen beings or even to root out this sickness. To eliminate the tuberculosis is one of priority tasks of the World Health Organization. It is also the aim of programme TAACF, which has been established by the Southern Research Institute.

The diploma work summarizes a lot of information about the tuberculosis and possibilities of treatment and prevention. The main part is devoted to the methodology of *in vitro* testing potential antimycobacterial active substances. In the practical part, there are showed the substances, which were I tested against four different mycobacterial strains on *in vitro* anti-tuberculotic activity.

Keywords: tuberculosis, antimycobacterial drugs, benzoxazoles, pyrazines, antimycobacterial activity, MIC

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechny zdroje, které jsem při vypracování použila nebo z nich čerpala, uvádím v použité literatuře.

Jana Horáková

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Martinu Doležalovi za odborné vedení, poskytnuté rady a materiály ke zpracování diplomové práce. Za odbornou pomoc patří poděkování i MUDr. Michaele Svobodové.

OBSAH

1	ÚVODNÍ ČÁST	6
1.1	Tuberkulóza	6
1.2	Epidemiologie tuberkulózy	8
1.3	Etiologie tuberkulózy	9
1.4	Původce tuberkulózy	9
1.5	Zdroj a přenos nákazy	12
1.6	Patogeneze	13
1.7	Rozvoj tuberkulózy	14
1.8	Diagnostika tuberkulózy	17
1.9	Klasifikace tuberkulózy	17
1.10	Prevence tuberkulózy	18
1.11	Terapie tuberkulózy	20
1.12	Strategie v léčbě tuberkulózy	32
1.13	Cíl diplomové práce	37
2	TEORETICKÁ ČÁST	38
2.1	Testování potenciálních antituberkuloticky aktivních látek v TAACF programu	41
2.2	Stanovení lékové citlivosti mykobakterií podle Národní referenční laboratoře pro mykobakterie Státního zdravotního ústavu v Praze	44
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1	Přístroje a chemikálie	46
3.2	Postup práce	48
4	VÝSLEDKY	52
4.1	Deriváty benzoxazolu	52
4.2	Deriváty PZA	53
5	DISKUZE	60
6	ZÁVĚR	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	62
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
9	SEZNAM TABULEK	65
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66

1 ÚVODNÍ ČÁST

1.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza provází lidstvo od nepaměti, každá epocha měla svou epidemii tuberkulózy. Tuberkulóza se vyskytovala jak ve starém Řecku, tak i v Říši římské. Ve středověku patřila k velmi častým příčinám smrti a tato situace se nezměnila ani v novověku. V 18. a 19. století během průmyslové revoluce byla tuberkulóza v Evropě velmi rozšířena a toto velké rozšíření je patrné i dnes v rozvojových zemích. Celosvětově jsou dle SZO tuberkulózou infikovány 2 miliardy lidí, tj. asi třetina naší planety. Tuberkulózu jako chorobu má 20 milionů osob a každoročně umírá na tuberkulózu asi 3 miliony osob, z toho 250 tisíc dětí. 90 % nemocných je v rozvojových zemích, nejhorší je situace v Africe a jihovýchodní Asii.¹

Termín tuberkulóza zavedl v roce 1834 Schönlein, který tímto termínem chtěl vystihnout charakteristický rys onemocnění – tvorbu uzlíku – granulomu různé velikosti. Etiologii tuberkulózy objasnil Robert Koch (objev Kochova bacila – *Mycobacterium tuberculosis* zveřejněný 24. 3. 1882).¹ Původně se toto onemocnění označovalo jako fthisa a vědní obor o něm fthisologie. Slovo fthisis je řeckého původu a označuje chorobný stav lidského organismu, jehož nejvýraznější charakteristikou jsou úbytek, ubývání těla, schnutí, chřadnutí.²

Tuberkulóza je specifické infekční onemocnění, které bylo vždy vzhledem ke své zvláštnosti a závažnosti sledováno odděleně od ostatních infekčních chorob. Tuberkulóza byla a je sociální chorobou a za špatných podmínek vždy dojde k nárůstu počtu onemocnění. Optimistické předpovědi týkající se eliminace tuberkulózy do roku 2000 se ukázaly být nereálné.^{Chyba! Záložka není definována.}

Česká republika je řazena mezi země s příznivou situací tuberkulózy s její fungující kontrolou. Leží však na pomezí zemí se situací méně příznivou a neefektivní kontrolou. To je jedna z příčin, proč je nadále nutné věnovat této chorobě intenzivní pozornost a nepolevovat v bdělosti nad jejím dohledem.³

V České republice počet nemocných s tuberkulózou od roku 1989 do roku 1999 neklesal. Teprve v letech 2000 až 2001 byl zaznamenán pokles incidence tohoto onemocnění.^{Chyba! Záložka není definována.} V roce 2005 byl počet všech hlášených případů tuberkulózy 967, což představuje 9,4 případů / 100 000 obyvatel (Tabulka 1). Pokles byl

v roce 2005 dosažen u tuberkulózy všech forem a lokalizací, klesl i počet mikroskopicky pozitivních tuberkulóz plic, které jsou považovány za nejsilnější zdroje infekce. Těch bylo v roce 2005 hlášeno 293 případů (2,9 / 100 000 obyvatel).³

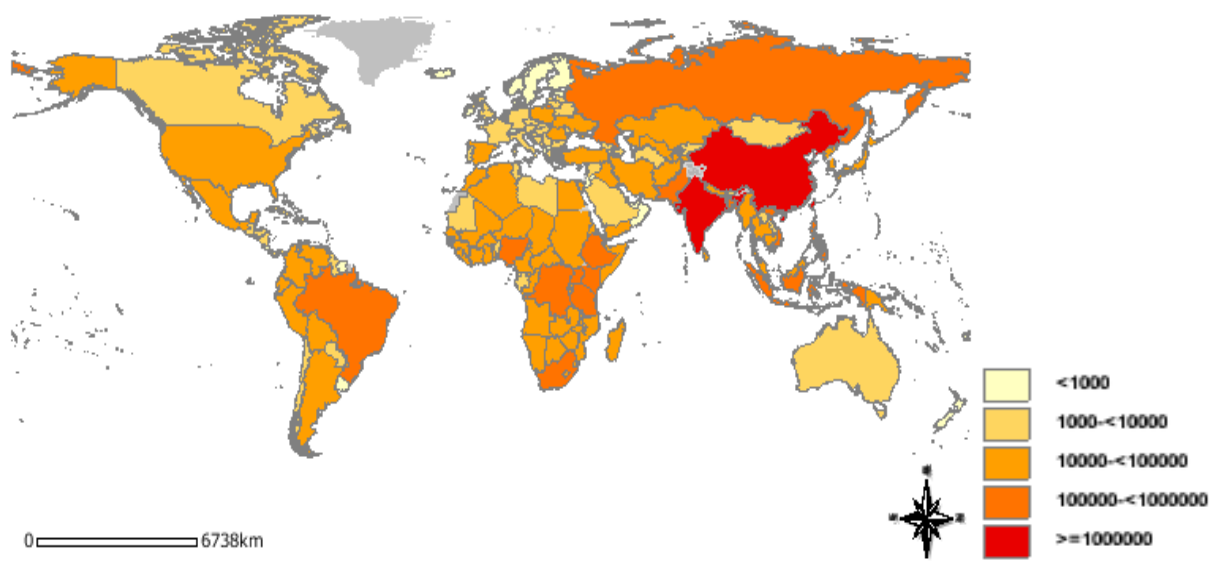
Tabulka 1: Počet hlášených TB onemocnění v ČR v letech 2001-2005 (absolutní počty)

Rok	2001	2002	2003	2004	2005
TB všech forem a lokalizací	1350	1200	1162	1006	967
TB plicní	1102	972	942	818	806
TB plicní bakteriologicky ověřená	740	658	660	556	559
TB plicní mikroskopicky pozitivní	395	338	355	304	293

Nejvyšší relativní počet nově hlášených TB onemocnění v roce 2005 byl v Karlovarském, v Jihomoravském a v Pardubickém regionu (Tabulka 2).³

Tabulka 2: Nové hlášené případy TB v regionech v letech 2000-2005

Region/rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Praha	18,5	15,7	16,1	16,7	11,1	9,8
Středočeský	11,5	13,8	10,3	10,3	9,5	9,8
Jihočeský	8,7	7,7	7,9	6,6	6,5	5,8
Plzeňský	17,5	14,3	14,6	12,4	8,9	10,4
Karlovarský	27,5	22,0	13,9	16,4	14,1	15,1
Ústecký	16,2	16,4	14,9	12,2	12,5	9,1
Liberecký	12,1	11,7	11,0	9,8	7,0	6,1
Královéhradecký	16,9	10,0	9,9	10,2	9,5	9,1
Pardubický	11,8	10,0	10,3	9,5	9,9	11,1
Vysočina	8,6	8,8	7,7	7,7	6,3	5,4
Jihomoravský	11,6	10,7	11,3	11,1	11,4	11,4
Olomoucký	6,0	10,1	8,0	7,9	6,5	6,5
Zlínský	10,1	10,5	6,9	11,0	10,7	9,5
Moravskoslezský	20,0	19,3	15,1	13,3	10,8	11,4



Obrázek 1: Incidence tuberkulózy v roce 2004⁴

1.2 Epidemiologie tuberkulózy

Výskyt tuberkulózy je sledován již 200 až 300 let, tuberkulóza probíhá ve vlnách epidemií s rychlým vzestupem počtu onemocnění za příhodných podmínek a pozvolnějším poklesem. Z epidemiologických ukazatelů byla nejprve sledována mortalita, tj. počet úmrtí na toto onemocnění. Tento ukazatel nemá dnes již epidemiologický význam.⁵

K hlavním epidemiologickým ukazatelům v současnosti patří:

1. Prevalence tuberkulózy

Představuje počet osob evidovaných na oddělení TRN pro tuberkulózu na 100 000 obyvatel k určitému datu v roce.

2. Incidence tuberkulózy (notifikace)

Je to počet nemocných s poprvé zjištěnou aktivní tuberkulózou přepočtený na 100 000 obyvatel k určitému datu v roce.

3. Recidivy tuberkulózy

Recidivou rozumíme opětné vzplanutí tuberkulózy do 3 let od jejího klinického zhojení.

4. Riziko infekce

Informuje o promořenosti populace tuberkulózou, ukazuje procento lidí, kteří se v průběhu roku tuberkulózou infikují. Toto riziko je ovlivňováno mnoha faktory, např. věkem, přidruženými chorobami.⁵

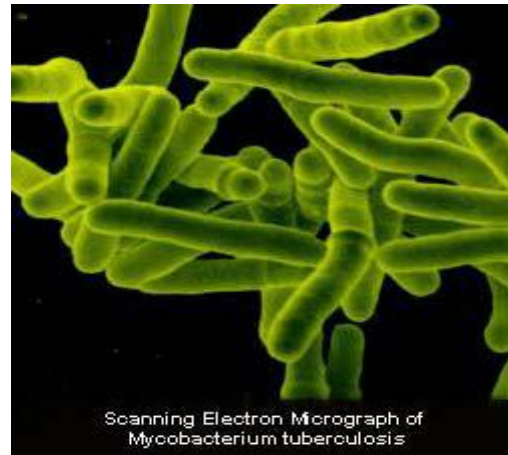
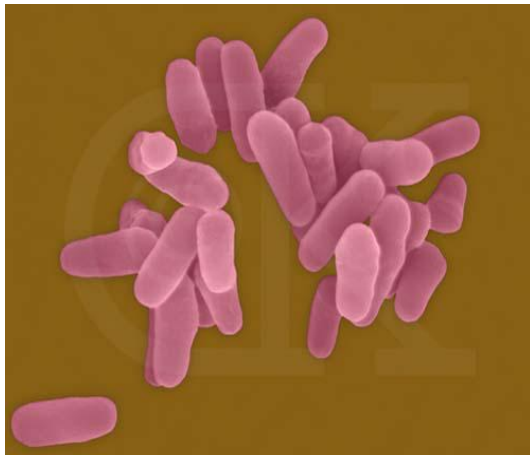
Je nutné si uvědomit, že infekce způsobené *M. tuberculosis*, jsou jednou z nejčastějších infekčních příčin morbidity a mortality v lidské populaci. Mezi bakteriálními původci zaujímá *M. tuberculosis* jasně první místo.⁶ Podle odhadů SZO existuje celosvětově 20 milionů nemocných, kteří každoročně infikují 50 – 100 milionů dalších lidí, hlavně děti. Současnou epidemiologickou situaci zhoršuje pandemie AIDS.⁵

1.3 Etiologie tuberkulózy

Objev původce tuberkulózy patří ke stěžejním objevům medicíny 19. století.⁵ Tuberkulóza představuje všechny chorobné stavy, jejichž příčinou je Kochův bacil.^{Chyba! Záložka není definována.} Patří do rodu *Mycobacterium*, čeledi Mycobacteriaceae a řádu Actinomycetales. V klasifikaci mikroorganismů jsou mykobakteria řazena na rozhraní mezi vyššími organismy, houbami a pravými bakteriemi.^{Chyba! Záložka není definována.}

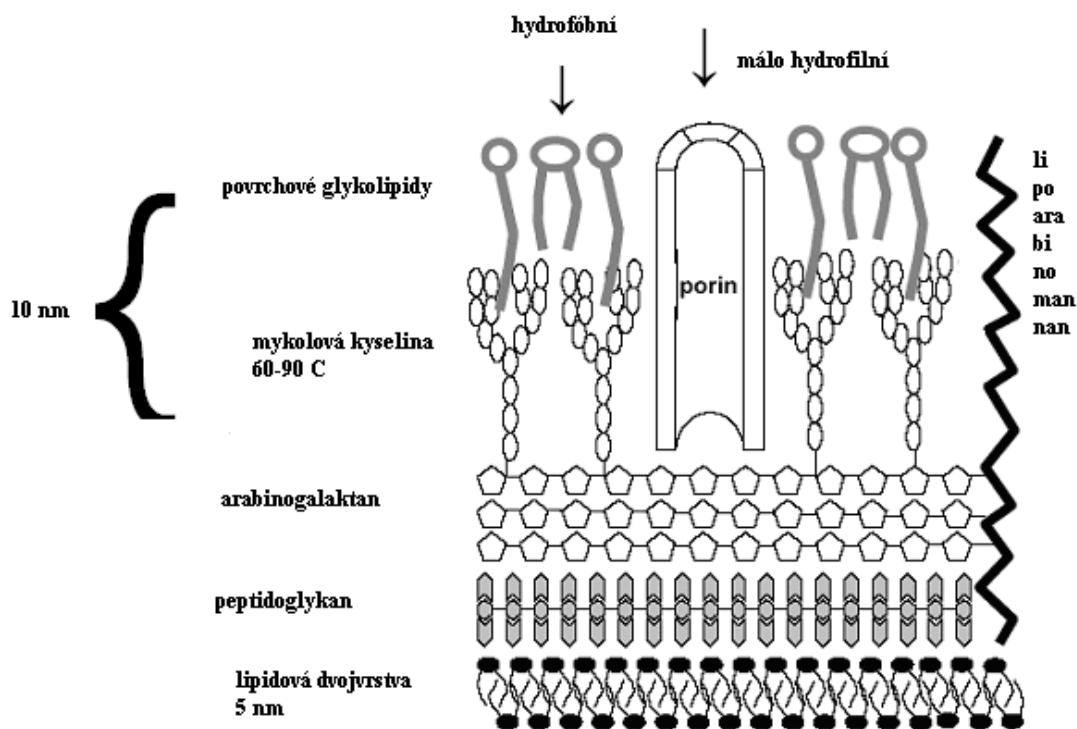
1.4 Původce tuberkulózy

Mycobacterium tuberculosis (MTB) – Kochův bacil je imobilní krátká tyčinka, rovná, nebo lehce zahnutá, velikostí 1,5 – 5 μm (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Nachází se izolovaně anebo častěji ve shlucích. MTB je aerobním mikrobem s optimálním růstem při teplotě 37 až 38°C. Generační doba mykobakteria je dlouhá (20 – 30 hodin) proti jiným mikrobům (20 – 30 minut). Růst mykobakterií na kultivačních půdách a jejich identifikace vyžaduje proto několik týdnů. Izolaci mykobakterií od dalších mikrobů umožňuje jejich acidorezistence, která je dána zejména přítomností lipidů v povrchové membráně mykobakterií. MTB jsou schopny dlouho přežívat intracelulárně (perzistoři), ale i extracelulárně v kazeózním materiálu. Za běžných okolností jsou mykobakteria tuberkulózy životaschopná po dobu 1-2 hodin, sluneční svit a teploty vyšší 60 °C vedou k uhynutí.¹



Obrázek 2: *M. tuberculosis*⁷

Kromě vody (60 %) obsahuje MTB anorganické a organické látky (lipidy, proteiny, polysacharidy). Proteiny jsou rozděleny na 4 skupiny (A, B, C, D), polysacharidy na dvě třídy (I. a II.). Polysacharidy I. třídy jsou složeny z arabinosy, galaktosy a manosy, II. třídu vytváří glukan. Lipidy jsou složeny z kyseliny mykolové, fosfolipidů, vosku D, glykolipidů (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Proteinové složky mykobakterií navozují jak humorální tak celulární imunitu, polysacharidy humorální reakci. Úloha mykobakteriálních lipidů spočívá v jejich toxicitě pro hostitele, snižují mykobaktericidní aktivitu alveolárních makrofágů. **Chyba! Záložka není definována.**



Obrázek 3: Schéma stavby buněčné stěny mykobakterií⁸

Systematika – dělení mykobakterií

I. Pravá mykobakteria – obligatorně patogenní pro člověka:

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium bovis

Mycobacterium africanum

Mycobacterium microti

Tato mykobakteria vytváří tzv. tuberkulózní komplex. Nejdůležitějším a nejčastějším příčinným agens tuberkulózy (95 % případů) je MTB.

II. Mykobakteria jiná než MTB – netuberkulózní mykobakteria

Skupina	Potenciální patogeny	Nepatogenní (zřídka)
I. fotochromogeny pomalu rostoucí (pigmentují jen na světle)	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	
II. skotochromogeny pomalu rostoucí (rostou v barevných koloniích i potmě)	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. flavescens</i>
III. non-fotochromogeny pomalu rostoucí (netvoří výrazně barevné kolonie)	<i>M. avium-intracelulare</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. malmonensae</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimoidei</i>	<i>M. terrae</i>
IV. rychle rostoucí (vyrostou během několika dnů)	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i> <i>M. phlei</i>

Tato skupina zahrnuje řadu neobvyklých agens, která jsou potenciálními patogeny pro člověka nebo jsou pouhými lidskými saprofyty. Identifikace těchto netuberkulózních mykobakterií je možná ve speciálních laboratořích s rozvinutím specifických metod. Hodnotí se u nich způsob a rychlost růstu, tvorba pigmentu, vzhled kolonií včetně citlivosti na světlo, optimální teplota růstu.

V minulosti se vzhledem k odlišným vlastnostem od klasických druhů označovala jako „atypická“ mykobakteria. A s tímto v podstatě nesprávným názvem se setkáváme dodnes. Onemocnění vyvolaná těmito potenciálně patogenními mykobakteriemi se nazývají mykobakteriózy.

V ČR se z uvedených mykobakterií uplatňují ve větší frekvenci, případně jako příčina onemocnění – *M. kansasii* a *M. xenopi*. Komplex *M. avium-intracellulare* se stal nejčastějším a nejzávažnějším původcem oportunních plicních infekcí u nemocných s AIDS.^{1,9}

1.5 Zdroj a přenos nákazy

Zdrojem nákazy v současné době je nemocný člověk, méně domácí a hospodářské zvířectvo vylučující mykobakteria tuberkulózy. Chyba! Záložka není definována.

1. Člověk nakažený tuberkulózou

- a) sputum – nejrozšířenějším zdrojem je kapénková infekce u otevřených, plicních forem
- b) sekret z ulcerací a píštělí – vzácně
- c) stolice, moč, menstruační krev, sekret z mužských pohlavních orgánů u nemocných mimoplicní tuberkulózou

2. Zvíře

Nejčastějším zdrojem byl skot. V roce 1968 byla docílena eradikace, tj. vymýcení tuberkulózy skotu na území bývalého Československa. V roce 1993 byla v ČR infekce *M. bovis* prokázána jako příčina onemocnění u 3 osob. Je možný přenos z člověka na člověka. Zdrojem infekce mohou být i domácí zvířata (pes, kočka) nebo hospodářská zvířata (vepř, drůbež – *M. avium*)

3. Léčebné výkony

Výjimečně při nedostatečné desinfekci a sterilizaci nástrojů.

4. Přírodní zdroje

U netuberkulózních mykobakterií byl zdroj infekce prokázán v důlních vodách, ve vodovodním potrubí, v půdě, prakticky jsou všude přítomná. Chyba! Záložka není definována.

Přenos tuberkulózní nákazy se uskutečňuje nejčastěji cestou:

a) **inhalační** – vdechováním mykobakterií ulpívajících na kapičkách infikovaného bronchiálního sekretu při osobním kontaktu s nemocným (kapénková forma), nebo vdechováním mykobakterií, které se volně vznášejí ve vzduchu bez přítomnosti nemocného. Přerušeni přenosu spočívá v izolaci nemocného a adekvátní terapii.

b) **přímým kontaktem** (ojedinělé případy tzv. inokulační tuberkulózy) obvykle profesionálního původu ^{Chyba! Záložka není definována.}

c) **alimentární cestou** – mlékem a mléčnými výrobky, které jsou kontaminovány *M. bovis* ^{Chyba! Záložka není definována.}

Z toho vyplývá skutečnost, že bránou vstupu, resp. nejčastější orgánovou lokalizací tuberkulózy u člověka jsou plíce (85 – 90 %). ^{Chyba! Záložka není definována.}

1.6 Patogeneze

V rámci nízké prevalence tuberkulózní infekce se do dospělosti infikuje mykobakteriemi pouze část populace, z toho 5 – 10 % onemocní tuberkulózou. Manifestní tuberkulózu dělíme na primární a postprimární.

I. Primární

První kontakt hostitele s mykobakteriální infekcí. Mykobakterium tuberkulózy se za vhodných podmínek dostává obvykle inhalační cestou do plic, kde se množí do rozvoje buněčné imunity. Původní nespecifická alveolitida se pak během 10 dnů mění v tuberkulózní specifický fokus (Ghonův fokus). Během několika hodin se mykobakteria šíří lymfatickými drahami do regionálních uzlin, které se zvětšují a spolu se zánětem v plicích vytváří primární tuberkulózní komplex.

Primární tuberkulóza se odehrává převážně v dětském věku, ojediněle u dospělých osob (pozdní primární tuberkulóza).¹

II. Postprimární

Vzniká u osob již infikovaných řadu let po primoinfekci. Tato sekundární (chronická) forma tuberkulózy vzniká za předpokladu:

- a) další exogenní infekce, tj. inhalací nových mykobakterií
- b) častější je progresse nebo reaktivace primární tuberkulózy, tj. plicní nebo uzlinové

- c) komponenty primárního komplexu případně vznik extrapulmonální tuberkulózy
- d) v orgánech postižených při dřívější, časně hematogenní infekci (endogenní exacerbace).

Podkladem reaktivace je perzistence mykobakterií, případně jejich replikace. Pro perzistenci mykobakterií je nutný enzym izocitrátlyasa, který umožňuje tvorbu mastných kyselin jako zdroje energie pro metabolismus mykobakterií a jejich replikace. Mykobakteria mají tendenci se množit v místech největší kyslíkové tenze, tj. v plicních vrcholech, růstových zónách dlouhých kostí, v ledvinách.

Ke klinicky manifestní tuberkulóze dochází tímto způsobem až po různě dlouhém období latence, které trvá řadu let.

Postprimární tuberkulóza je onemocněním dospělých jedinců.¹

1.7 Rozvoj tuberkulózy

Zda tuberkulózní infekce přejde v manifestní onemocnění záleží jak na hostiteli, tak na vlastním vyvolávajícím agens, tj. mykobakteriu tuberkulózy.

1.7.1 Faktory hostitele zahrnují:

1. Přirozená odolnost (rezistence), vnímavost (dispozice)

Rozdíly ve vnímavosti k tuberkulóze jsou závislé na přítomnosti geneticky determinované rezistenci (přirozená imunita). Z této vyplývají i rozdíly v tzv. individuální nebo rasové dispozici k tuberkulóze. Vedle přirozené selekce v populaci hrají roli i geneticky podmíněné faktory.

Průběh tuberkulózy u různých zvířecích druhů po infekci je během prvních 3 – 4 týdnů obdobný, tzn. neliší se přirozenou rezistencí, ale stupněm získané imunity. Jejím důsledkem je aktivace monocyt / makrofágového systému se zvýšenou schopností je usmrtit, zničit. Pokud tato získaná imunita není dostatečná, pak fagocytovaná mykobakteria v makrofázích perzistují nebo se dokonce mohou replikovat a být nadále rizikem pro hostitele.¹

2. Získaná imunita – alergie

Hlavní manifestací získané imunity vůči tuberkulóze je intracelulární bakteriostáza se schopností omezovat množení a rozsev mykobakterií. Rozdíl proti přirozené imunitě spočívá

v rychlosti a intenzitě účinku. Tento účinek je zprostředkován buněčnou interakcí lymfocyt – mikrofág, přičemž získaná imunita je závislá na funkční aktivitě mikrofágů.¹

3. Rizikové faktory

- a) věk – do pěti let je riziko generalizované tuberkulózy, v pubertě jsou spíše lokální komplikace, ve stáří v rámci deficitní imunity je tuberkulóza častějším onemocněním
- b) pohlaví – do 30 let onemocní spíše ženy, ve středním věku je převaha mužů
- c) expozice – záleží na trvání a intenzitě nákazy. Lze rozlišovat expozici protražovanou, nebo nahodilou (jednorázovou), která je rizikem jen při masivní mykobakteriální infekci. Časová souvislost mezi expozicí tuberkulózy a manifestním onemocněním je různá. Jako minimální inkubační čas se uvádí 4 týdny, maximální inkubační čas se uznává většinou do 2 let po skončení expozice.
- d) iatrogenní vlivy – aplikace léků vedoucích k supresi buněčné imunity (glukokortikoidy, cytostatika), aktinoterapie
- e) přidružené nemoci – obvykle zhoršují průběh a prognózu tuberkulózy, mohou být i příčinou reaktivace. Dispozici k tuberkulóze ovlivňují akutní virové infekce, malnutrice, chronická jaterní a ledvinná onemocnění, hematologické malignity a diabetes mellitus. V současné době je nejzávažnější kombinace tuberkulóza a AIDS. Riziko u symptomatické HIV infekce je 100-200x větší než v normální populaci.

K rizikovým osobám pro vznik tuberkulózy se počítají i jedinci se špatnými socioekonomickými podmínkami u nichž je incidence tuberkulózy vyšší oproti normální populaci (bezdomovci, nezaměstnaní, azylanti, vězni, drogově závislí).¹

1.7.2 Vlastnosti MTB:

1. Obligátně patogenní mykobakterie

Pro člověka je obligátně patogenními mykobakteriemi typus humanus, bovinus, africanus. Potenciálně patogenními se stávají netuberkulózní (atypická) mykobakteria u osob se sníženou odolností celkovou nebo orgánovou. Atypická mykobakteria u takových jedinců mohou vyvolat onemocnění, která se po stránce klinické i rentgenové neliší od klasické tuberkulózy.¹

2. Virulence a patogenita mykobakterií

Většina patogenních bakterií tvoří toxiny, které se charakteristickým způsobem uplatňují v patogeneze onemocnění. To zatím neplatí pro nejvýznamnější mykobakterie MTB a *M. leprae*. Všeobecně se ale předpokládá, že hlavními faktory patogenity jsou u nich složky bakteriální stěny, z nichž dimykolát trehalózy („cord-factor“) byl prvním identifikovaným glykolipidem tuberkulózních mykobakterií s toxickými účinky (je ovšem přítomen jen u některých kmenů).

Nové informace byly získány podrobnou analýzou složení *M. ulcerans*. Použitím moderních metod se z této bakterie poprvé podařilo izolovat komplexní polyketid, nazvaný mykolakton. Polyketidy jsou molekuly podobné lipidům. Ačkoli jsou daleko menší než proteiny, jsou biologicky neobyčejně aktivní. Když byl před časem identifikován genom MTB bylo v něm nalezeno překvapivě mnoho genů pro tvorbu polyketidů.

Pracovníci, kteří izolovali mykolakton, se domnívají, že tím zároveň objevili novou skupinu faktorů virulence bakterií. Kdyby se při tom ukázalo, že jde skutečně o látky, které se významně podílejí na patogenezi tuberkulózy a lepry, otevřely by se nepochybně i zcela nové možnosti terapie, která zatím u obou infekcí zdaleka není ideální.¹⁰

3. Množství mykobakterií

Průběh infekce je ovlivňován množstvím mykobakterií, které stimulují senzibilizované lymfocyty a makrofágy k produkci mediátorů (cytokinů). Cytokiny jsou zodpovědné za to, zda dochází k ochraně nebo poškození hostitele.¹

4. Citlivost na antituberkulotika

Umožňuje identifikaci mykobakterií a stanovení správné terapie. Opačný jev tj. rezistence je geneticky danou vlastností mykobakterií (přirozená rezistence). Primární rezistencí označujeme stav, kdy kmen mykobakteria nereaguje na aplikaci antituberkulotik u nemocného, který nebyl dosud léčen. O sekundární rezistenci mluví tehdy, když kmen mykobakteria původně citlivý se v průběhu léčby stal rezistentním vůči antituberkulotikům. Vznik sekundární rezistence je závažným problémem pro terapii nemocných a je výsledkem nesprávně vedené léčby tuberkulózy ať již ze strany lékaře nebo nemocného.^{Chyba! Záložka není definována.}

1.8 Diagnostika tuberkulózy

1. Anamnestické a epidemiologické údaje

2. Rentgenologické vyšetření plic

3. Tuberkulínová zkouška

- pozitivní tuberkulínová reakce vzniká po intradermální aplikaci tuberkulinu u jedince, u kterého předcházela infekce tuberkulózním bacilem, a to přirozeně nebo očkováním

- výsledným projevem pozitivní tuberkulínové reakce je erytém a kožní indurace.

Vzniká opožděně, za několik hodin po aplikaci tuberkulinu, s maximem za 48 až 72 hodin.

- tuberkulínová zkouška se odečítá za 72 hodin – měří se příčný průměr indurace určené palpačně, erytém se nehodnotí. Výsledek se uvádí v mm.

Hodnocení výsledků tuberkulínové reakce:

a) indurace 0 – 5 mm se považuje za negativní výsledek, organismus se dosud neseťkal s tuberkulózní infekcí

b) indurace 6 mm a více se hodnotí za pozitivní – postvakcinační nebo po styku s mykobakteriální infekcí

c) indurace 15 mm a více se označuje za silně pozitivní nález – důvodné podezření z čerstvé infekce nebo již probíhajícího onemocnění tuberkulózou

4. Bakteriologický průkaz

- má pro diagnózu plicní tuberkulózy největší přínos

5. Pomocná laboratorní vyšetření

- sedimentace erytrocytů, krevní obraz, biochemická vyšetření krve, imunologická vyšetření, vyšetření moče – mají jen podpůrný význam pro diagnózu tuberkulózy¹¹

1.9 Klasifikace tuberkulózy

1. tuberkulóza dýchacího ústrojí

2. tuberkulóza nervové soustavy

3. tuberkulóza jiných orgánů

- kostí a kloubů

- močové a pohlavní soustavy

- střev, pobřišnice a mezenterických uzlin

- kůže a podkožního vaziva

- oka
 - ucha
 - nadledvin
4. miliární tuberkulóza¹¹

1.10 Prevence tuberkulózy

K zabránění vzniku onemocnění tuberkulózy se uplatňují tři základní preventivní opatření: kalmetizace, izolace zdrojů a chemoprofylaxe.

1.10.1 Kalmetizace – očkování proti tuberkulóze

Provádí se BCG vakcínou nesoucí jméno po francouzských badatelích Calmettovi a Guérinovi. BCG vakcinace snižuje riziko onemocnění tuberkulórou, její ochranný mechanismus spočívá v ovlivnění hematogenního rozsevu mykobakterií z místa primoinfekce. Zabraňuje hlavně vzniku generalizovaných forem. Předpokládá se rovněž, že vakcína vyvolává imunitu, která zabraňuje přechodu u následných tuberkulózních infekcí do stádia onemocnění.

Základní očkování, primovakcinace se provádí u novorozenců s hmotností větší než 2500 g, nejdříve 4. den po narození, nejpozději v 6. týdnu věku. Od roku 1994 se provádí revakcinace ve věku 11 let. Po revakcinaci se tvoří za 1-2 týdny včasný infiltrát o průměru 4-10 mm.⁵

Kontraindikace očkování:

a) všeobecné – jsou obdobné jako u jiných očkování – horečnaté stavy, tuberkulóza, ověřený deficit imunity, léčba kortikoidy, imunosupresivy a ostatními léky významně ovlivňující imunitní stav, hemoblastóza

b) zvláštní – osoby s pozitivní tuberkulinovou reakcí, osoby po prodělaných spalničkách nebo černém kašli (nejdříve za 6 týdnů), po infekční hepatitidě (nejdříve za 6 měsíců), těhotné ženy, osoby se sklonek k tvorbě koloidních jizev, osoby s generalizovanými kožními ekzantémy, jedinci s komplikací po BCG vakcinaci se nemají rekalmetizovat⁵

Komplikace po kalmetizaci:

- a) rozsáhlé a hlubší ulcerace
- b) subkutánní abscesy s fluktuací nebo píštělí o průměru 10 mm a více
- c) zvětšené regionální uzliny s průkazem fluktuace nebo píštělí
- d) dermatologické komplikace – lupoidní reakce, podkožní a svalové granulomy
- e) nespecifické vedlejší reakce, především keloidní jizvy
- f) ostatní méně závažné komplikace – ostitidy, oční postižení, meningitidy⁵

1.10.2 Izolace zdrojů

Patří mezi základní preventivní opatření.

V našich podmínkách jsou nemocní s podezřením nebo s již diagnostikovanou aktivní tuberkulózou hospitalizováni ve specializovaných pracovištích, kde jsou provedena příslušná vyšetření k upřesnění diagnózy a zahájena iniciální fáze léčby. Z epidemiologických důvodů by měl být nemocný ústavně léčen po dobu vylučování mykobakterií.

Nedílnou součástí prevence tuberkulózy jsou opatření přijatá k aktivnímu vyhledávání infikovaných jedinců v okolí zdroje nemoci a zamezení dalšímu šíření infekce:

- a) vyšetření osob, které byly v kontaktu s aktivní tuberkulózou
- b) tuberkulínový katastr – hromadné provádění tuberkulínových testů v 5. třídě
- c) hromadná radiofotografie – má dnes již omezený význam⁵

1.10.3 Chemoprophylaxe (chemoprevence)

- a) primární – provádí se k ochraně osob neinfikovaných, ale exponovaných nákazou
- b) sekundární – u osob již infikovaných (s pozitivní tuberkulínovou reakcí postinfekčního typu) k zábraně přechodu infekce v manifestní onemocnění, případně k zábraně vzniku recidiv u zhojené, ale dosud neléčené tuberkulózy

Chemoprevence se provádí aplikací INH v dávce 5 mg/kg/den v jedné dávce, ráno na lačno, po dobu 6 měsíců. Při zjištěné rezistenci na INH lze podat RMP po dobu 6 měsíců nebo RMP a PZA po dobu 3 měsíců.⁵

Indikace k chemoprophylaxi:

- a) při kontaktu s aktivní tuberkulózou v rodině, u dětí a mladistvých, u nemocných cukrovkou, vředovou chorobou, spalničkami, černým kašlem, léčbě cytostatiky nebo při jiném oslabení organismu
- b) zvrát alergie z negativní v pozitivní nebo její vzestup o 10 mm a více
- c) hyperalergenti s tuberkulinovou alergií 20 mm a více
- d) u osob s rozsáhlými fibrózními nebo kalcifikacemi plic, dosud neléčených antituberkulotiky, s pozitivní tuberkulinovou reakcí
- e) při zahájení dlouhodobé aplikace kortikoidů u nemocných s inaktivní tuberkulózní lézí⁵

Kontraindikace chemoprophylaxe:

- a) psychická onemocnění (záchvatovité stavy)
- b) funkční porucha jater
- c) alergie na INH
- d) asociálové
- e) funkční porucha ledvin, s nefritidou a nefrotickým syndromem
- f) aktivní tuberkulóza (pokud ji nelze vyloučit)^{Chyba! Záložka není definována.}

1.11 Terapie tuberkulózy

Hlavní zásadou léčby tuberkulózy je podávání kombinace antituberkulotik po dobu 4-12 měsíců. Délka trvání léčby závisí na rozsahu postižení tuberkulózou, přidružených chorobách nemocného a kombinaci použitých antituberkulotik, která lze aplikovat buď v denním nebo intermitentním režimu (1x až 3x týdně). Dlouhodobé a kombinované podávání antituberkulotik je nutné pro heterogenitu populace mykobakterií a pro vyšší procento primárně rezistentních mutant.^{Chyba! Záložka není definována.}

Populaci mykobakterií lze dělit na 4 podskupiny (dle Mitchisona)¹²

1. rychle se množící mykobakteria, uložená extracelulárně, v alkalickém prostředí. V tomto prostředí působí baktericidně INH, RMP, STM.
2. mykobakteria s nízkou metabolickou aktivitou, uložena intracelulárně v makrofázích nebo okrajových částech kazeifikované tkáně, v kyselém prostředí. V tomto prostředí působí baktericidně PZA, INH, RMP.

3. mykobakteria střídající růstové aktivity a klid („polospící“), spíše v neutrálním prostředí. V tomto prostředí působí baktericidné RMP.

4. „spící bacily“ tj. mykobakteria bez známek metabolické aktivity, na tato nepůsobí žádné antituberkulotikum.

Druhá a třetí skupina je shrnována do skupiny tzv. perzistorů. Tato mykobakteria mohou po rozpadu makrofágů a úpravě pH zvýšit svoji metabolickou aktivitu a dát tím vznik další atace onemocnění. Z tohoto důvodu je nutné dávat léky dlouhodobě, aby mykobakteria byla vystavena působení antituberkulotik, jakmile by přešla do stavu biologické aktivity.

Světová zdravotnická organizace vypracovala program přímé kontroly nad průběhem terapie, tzv. DOTS (Directly Observed Therapy Strategy). Jeho snahou je vyšetřit každého člověka s příznaky, které poukazují na tuberkulózu, zabezpečit pravidelnou a nepřerušovanou dodávku vysoce kvalitních léčiv, zajistit 6-8 měsíční léčbu pod pravidelným dohledem a s kontrolou užívání léčiv včetně sledování průběhu terapie a pravidelného vyšetření sputa. DOTS je určena hlavně pro rozvojové země s vysokým výskytem tuberkulózy. Dnes je do programu zapojeno 180 zemí, ve kterých žije 69 % světové populace. Podstata prevence šíření tuberkulózy spočívá ve vyhledávání a úplném vyléčení (za důsledného sledování terapie) nemocných.⁵

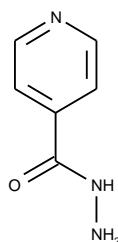
1.11.1 Antituberkulotika

Základem léčby je docílit zničení mykobakterií, a tím sterilizace tuberkulózních lézí. Jednotlivé léky mají různý mykobaktericidní a sterilizační účinek. Nejvyšší mykobaktericidní účinnost mají INH, RMP a STM. Nejvyšší sterilizační účinek má PZA a RMP. ETB je lék převážně mykobakteriostatický.

Tato antituberkulotika jsou dnes označována jako základní antituberkulotika.^{Chyba!}
Záložka není definována.

1.11.1.1 Základní antituberkulotika

- Isoniazid



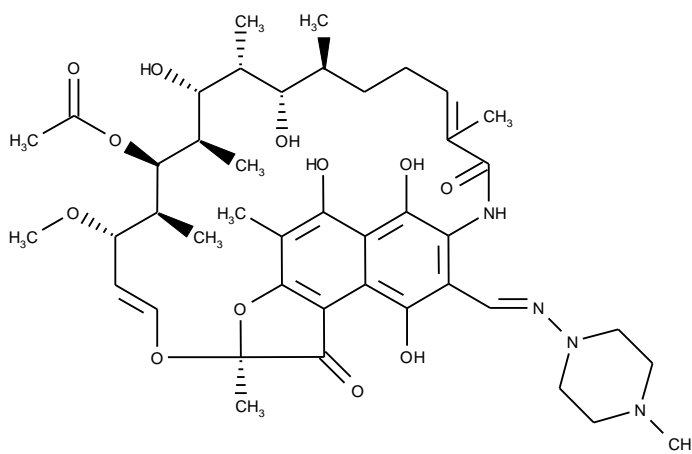
Charakteristika:

Isoniazid je proléčivo, které ke svému účinku potřebuje aktivaci pomocí mykobakteriální katalasy. Tento enzym určuje citlivost MTB k isoniazidu. Je účinný po perorálním podání, působí bakteristaticky i na klidová stadia a ostatní mykobakteriální kmeny (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*). Isoniazid inhibuje biosyntézu mykolových kyselin buněčné stěny tím, že napadá enzym mykolátsyntetasu, specifický pro mykobakterie. Ze sloučenin příbuzných isoniazidu se v terapii používá pyrazinamid a ethionamid.

Použití:

Isoniazid se používá v kombinaci s jinými antituberkulotiky, především s rifampicinem, k léčbě atypických tuberkulóz. Dříve se používal také k léčbě lepry způsobené *M. leprae*. Výjimečně se isoniazid používá i v monoterapii, např. při ošetření osob, které byly v kontaktu s pacienty s otevřenou tuberkulózou.¹³

- Rifampicin



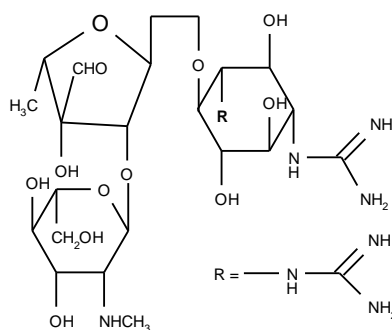
Charakteristika:

Rifampicin je polysyntetické antibiotikum odvozené od rifamycinu B, pocházejícího z kultur *Streptomyces mediterrani*. Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální RNA-polymerasy, je účinný kromě MTB i na atypická mykobakteria, *M. leprae* a další bakterie, např. *Staphylococcus aureus*. Rifampicin působí baktericidně na dělicí se i na klidová stadia choroby. Lipofilní vlastnosti molekuly jsou důležité pro navázání léčiva na polymerasu a navíc také napomáhají transportu přes mykobakteriální buněčnou stěnu.

Použití:

Rifampicin má největší význam ze všech antituberkulotik, je až na výjimky rezervován pro terapii tuberkulózy. Používá se v kombinaci s jinými léčivy, především s isoniazidem nebo ethambutolem, k léčbě všech forem a stadií tuberkulózy. Může být použit i při infekci atypickými kmeny a onemocněním leprou.¹³

• Streptomycin



Charakteristika:

Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované v roce 1944 ze *Streptomyces griseus*, jedná se o první opravdu účinné léčivo proti tuberkulóze. Špatně se vstřebává ze zažívacího traktu, je tedy podáván intramuskulárně a výjimečně i intratekálně.

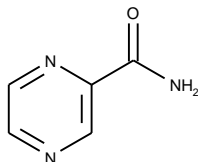
Použití:

Streptomycin měl původně široké spektrum účinku a byl proto v minulosti často používán. Z důvodu rychlého vývoje rezistence je ale dnes většina původců vůči němu rezistentní.

Dnes se používá téměř výhradně jako antituberkulotikum. Lze ho také použít k léčbě bakteriální endokarditidy, brucelózy a tularémie. Streptomycin má úzkou terapeutickou šíři

s řadou toxických projevů, proto musí být dávkován velmi přesně a není příliš často používán.¹³

- **Pyrazinamid**



Charakteristika:

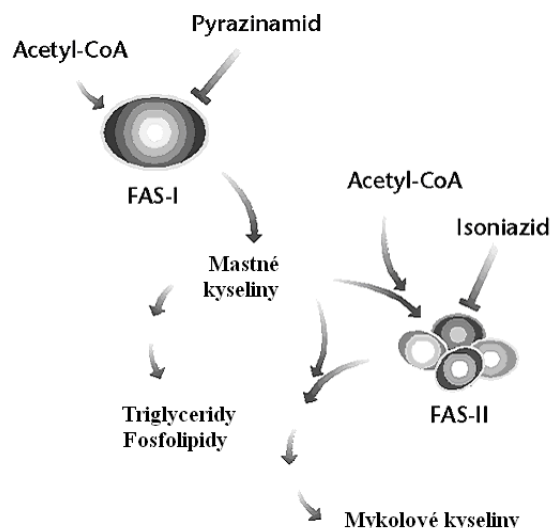
Pyrazinamid (PZA) je strukturním analogem nikotinamidu, působí jako jeho antimetabolit. Je velmi účinný na mykobakteria v intracelulárním prostoru makrofágů, kam neproniká isoniazid ani rifampicin, s těmito léčivými se vhodně doplňuje a umožňuje zkrátit dobu terapie na 6 měsíců. Aktivita PZA je závislá na přítomnosti bakteriální amidasy, která přeměňuje PZA na pyrazinkarboxylovou kyselinu (POA), vlastní antituberkuloticky aktivní sloučeninu. Tato přeměna je vysoce specifická pro MTB, PZA nepůsobí na atypická mykobakteria.¹³

Mechanismus účinku nebyl dlouho známý. Ještě dodnes není zcela vyjasněn, ale ví se, že PZA zasahuje do biosyntézy mastných kyselin – inhibuje enzym syntasu mastných kyselin I (FAS I).

Jedná se o velký multifunkční enzym, který katalyzuje syntézu dvouuhlíkatých prekurzorů (acetyl-CoA) na delší mastné kyseliny o 16-24 C. Kromě FAS I má mykobakteriální buňka ještě jeden mechanismus k syntéze mastných kyselin – FAS II. FAS II je na rozdíl od FAS I komplex nekovalentně vázaných podjednotek. FAS II prodlužuje uhlíkatý řetězec až na 50 C, které kondenzací s 24-26 C deriváty tvoří mykolovou kyselinu (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Mykolová kyselina je součástí mykobakteriální stěny a spolu s lipidy vytváří bakteriální dvojvrstvu.

Mykobakteria jsou mezi prokaryoty výjimkou. FAS I se obvykle nachází jen v eukaryotech nerostlinného původu a FAS II se vyskytuje obvykle v prokaryotech.

PZA jako proléčivo se v mykobakteriální buňce mění působením pyrazinamidasy na POA, která odpovídá za vlastní účinek PZA. Uvolněním POA dochází k vtoku protonů do mykobakteriální buňky, což vede ke kompletní dysfunkci pH rovnováhy. MTB chybí efluxní pumpy, které jsou schopné vrátit pH na původní hodnotu. Tato smrt „okyselením“ také vysvětluje, proč je PZA i účinný na spící bacili. PZA totiž kromě pyrazinamidasy také nevyžaduje žádné další metabolické pochody.^{14,15,16}

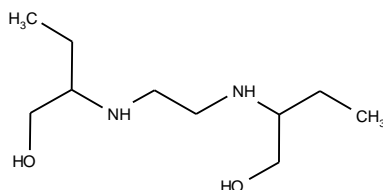


Obrázek 4: Syntéza mastných kyselin v mykobakteriích

Použití:

PZA se zpravidla používá v prvních dvou měsících léčby tuberkulózy, tedy v iniciální fázi.¹³ Vzhledem k příznivé farmakokinetice se přednostně používá při postižení CNS.¹⁷

- **Ethambutol**



Charakteristika:

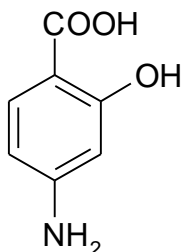
Ethambutol je syntetický aminoalkohol, účinný po perorálním podání. Působí bakteristaticky na řadu kmenů množících se mykobakterií. Aktivita léčiva je stereospecifická, pravotočivý stereoizomer je neaktivnější (*S,S*-izomer je 600krát účinnější než *R,R*). Mechanismus účinku není ještě přesně znám, ale pravděpodobně ethambutol vystupuje jako antimetabolit při syntéze bílkovin a nukleových kyselin. Nedávné studie dokázaly jako primární cíl biosyntézu arabinanů, ve formě arabinogalaktanů nutných k syntéze buněčné stěny mykobakterií. Účinek na atypická mykobakteria je proměnlivý, proto musí být před začátkem terapie otestován.

Použití:

Ethambutol se při terapii tuberkulózy kombinuje s jinými antituberkulotiky, při kombinaci s isoniazidem a rifampicinem dochází k obzvláště příznivému doplnění účinku. Pro léčbu těhotných žen může být ethambutol nahrazen rifampicinem.¹³

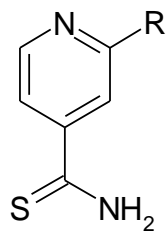
1.11.1.2 Náhradní antituberkulotika

- **Kyselina para-aminosalicylová**



Jedno z nejstarších bakteriostaticky působících antituberkulotik. Bývalo aplikováno v kombinaci k zabránění vzniku rezistence na isoniazid a streptomycin. Dnes by mohlo přicházet opět v úvahu při léčbě polyrezistentních nemocných. Mechanismus účinku pravděpodobně spočívá v chelataci kationtů železa, tj. v zabránění jejich přenosu prostřednictvím ionoforu mykobaktinu. Výhodou PAS je její nízká cena, nevýhodou nutnost vysokých terapeutických dávek (10 g denně) a vysoké riziko vzniku rezistence. Ve vyspělých zemích se již nepoužívá.^{Chyba! Záložka není definována., 18}

- **Ethionamid, protionamid**

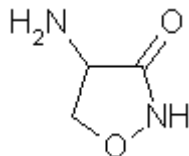


R = ethyl (ethionamid), propyl (protionamid)

Relativně toxická bakteriostatická antituberkulotikum, od jejichž používání se ustoupilo v 70. a 80. letech dvacátého století. Jejich použití v monoterapii je nevhodné vzhledem k rychlému vzniku rezistence a významné toxicitě (skupina CSNH₂ poškozuje játra). Mají omezený význam při léčbě plicní a mimoplicní tuberkulózy, u níž se podávají v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Používají se v případě rezistence na antituberkulotika

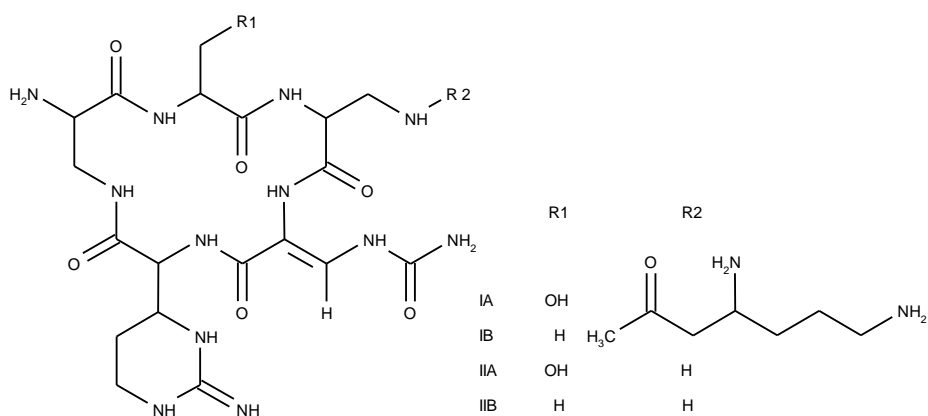
první řady, a rovněž v terapii proti *M. avium* komplexu u pacientů se syndromem získané imunodeficiency v případě rezistence na léčiva první volby.¹⁸

- **Cykloserin**



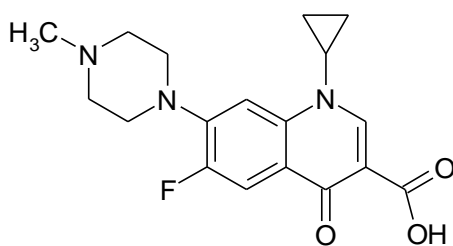
Širokospektré antibiotikum produkované plísní *Streptomyces orchidaceus* má bakteriostatický účinek na MTB, jako jeden z mála preparátů působí i na *M. avium intracellulare*. Inhibuje syntézu buněčné stěny. Po perorálním podání se velmi dobře vstřebává. Má časté projevy neurotoxicity a je často popisována řada nežádoucích účinků ze strany nervového systému a již se také nepoužívá^{Chyba! Záložka není definována., 19}

- **Kapreomycin**



Je polypeptidové antibiotikum působící na intracelulárně uložená mykobakteria. Má často zkříženou rezistenci s viomycinem. Po perorálním podání se nevstřebává z trávicího ústrojí, a proto musí být podáván parenterálně. Jde o nefrotoxické antibiotikum. Z nežádoucích účinků je uváděna i ototoxicita, dále změny v krevním obraze, alergické kožní projevy a poruchy CNS. Klinicky se používá výhradně k léčbě tuberkulózy v kombinaci s jinými antituberkulotiky.¹⁹

- **Fluorochinolony**



ciprofloxacin

Fluorované chinolony mají vedle širokého antibakteriálního účinku i účinek antimykobakteriální. Ciprofloxacin a ofloxacin jsou aktivní proti širokému spektru mykobakterií, používají se jako součást kombinovaných režimů při léčbě pacientů infikovaných MTB a *M. avium*.

Mají baktericidní účinek, mechanismem je inhibice DNA-gyrasy (antigyasika) a DNA-topoizomerasy IV.¹³

1.11.2 Vývoj nových antituberkulotik

Chemoterapie tuberkulózy nadále zůstává jedním ze stěžejních problémů světového zdravotnictví, zvláště s ohledem na zvyšující se frekvenci výskytu multirezistentních kmenů. Tento nepříznivý trend představuje výzvu pro farmaceutický výzkum a vývoj nových látek s antituberkulózním účinkem.²⁰

Na počátku 21. století je racionální vývoj nových antituberkulotik založen na definici jednotlivých kroků biosyntézy mykobateriální buněčné stěny, na důkladném zmapování genomu MTB či v detekci genů ovlivňujících latenci a virulenci. Mechanismus účinku nově vyvíjených antituberkulotik spočívá v jejich interkalaci a vazbě na DNA MTB (diarylfurany, riminofenaziny), zásahu do replikace DNA MTB (nové chinolony), dále ve vývoji UV mimetik či použití antisense strategie.¹⁸

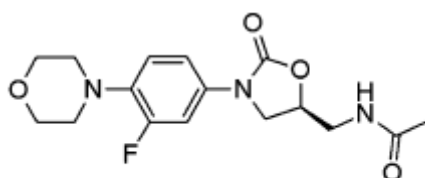
Cíle výzkumu a vývoje nových látek lze shrnout do tří následujících bodů:

1. Nové léčivo použitelné i u rezistentních kmenů (MDR-TB) s novým mechanismem účinku.
2. Nové léčivo silnější, selektivní a rychle působící nejlépe s baktericidním účinkem, čímž by bylo možné snížit délku léčby a množství podávaných léků.
3. Nové léčivo s výhodnými vlastnostmi v lékovém „mixu“.²⁰

1.11.2.1 Nové antituberkuloticky účinné látky ve stádiu klinického zkoušení

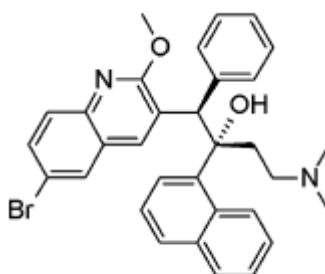
Paster Institut ve Francii se již 10 let zabývá výzkumem nových antituberkulotik, které by zkracovaly léčebné režimy, působily i na rezistentní kmeny MTB. Své poznatky shrnuje v review Antituberculosis drugs: Ten years of research.¹⁶

K léčbě proti rezistentním kmenům doporučují fluorochinolony, které spolu s derivátem oxazolidinonu – linezolidem, vykazovaly dobrou aktivitu vůči rezistentním kmenům. Jako vedlejší účinek se ale objevila periferní neuropatie, která je nyní dále zkoumána z hlediska její reverzibility. Navíc některé fluorochinolony mohou vést ke zkrácení léčebných režimů.



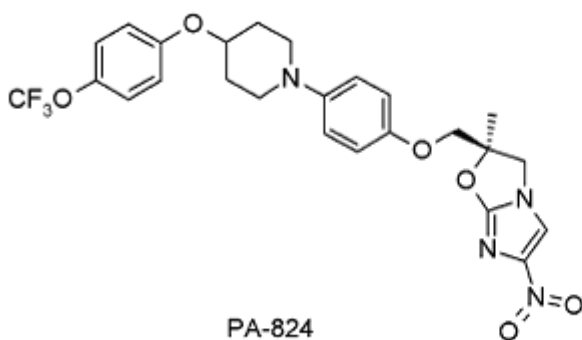
linezolid

S velmi dobrou *in vitro* aktivitou je v první fázi zkoušení na lidech derivát diarylchinolonu – TMC 207.

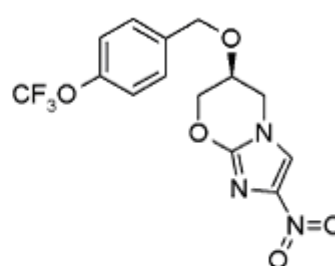


TMC 207

Další řada účinných derivátů vychází z nitroimidazolu – PA 824 a OPC 67683, který je již v klinickém zkoušení od roku 2004.

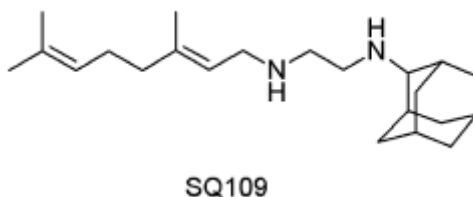


PA-824



OPC-67683

Od roku 2006 je v klinické studii SQ 109 vycházející ze struktury ethambutolu. Tato látka má příznivé farmakologické vlastnosti a zároveň i synergicky působí na ostatní antituberkulotika.¹⁶



1.11.3 Léčebné režimy tuberkulózy

Hlavními zásadami terapie jsou léčba prováděná kombinací antituberkulotik a léčba dostatečně dlouhá a kontinuální. Každý režim má fázi iniciální zahájenou během hospitalizace na oddělení tuberkulózy a fázi pokračovací, prováděnou ambulantně. Celková délka léčby závisí na rozsahu postižení tuberkulózu, průkazu mykobakterií a přidružených chorobách nemocného.¹

Krátkodobé režimy (obsahující čtyřkombinaci s PZA první dva měsíce)¹

Iniciální fáze		Pokračovací fáze		Celkem
SHRZ denně	2 měsíce	HR denně	4 měsíce	6 měsíců
EHRZ denně		HR 2x týdně		
SHRZ 3x týdně				
EHRZ 3x týdně				

Zkrácené režimy (obsahující RMP)¹

Iniciální fáze		Pokračovací fáze		Celkem
SHRZ denně	2 měsíce	SHZ 2x týdně	6 měsíců	8 měsíců
EHRZ denně		EH denně		
SHR denně		HR denně	7 měsíců	9 měsíců
		HR 2x týdně		

Standardní režimy (neobsahující RMP)¹

Iniciální fáze		Pokračovací fáze		Celkem
SHE denně	2 měsíce	HE denně	10 měsíců	12 měsíců
SHZ denně		SH 2x týdně		
EHZ denně				

RMP – rifampicin, E – ethambutol, H – isoniazid, R – rifampicin, S – streptomycin, Z – pyrazinamid

1.11.4 Chirurgická léčba

Díky účinné chemoterapii tuberkulózy je chirurgická léčba indikována jen v ojedinělých případech. Správnou antimikrobiální léčbou lze trvale debacilizovat prakticky všechny formy tuberkulózy, pokud byla na antituberkulotika zachována citlivost.

Ještě dnes je indikací k resekci tuberkulom nebo přítomnost multirezistentních forem mykobakterií. V minulosti byla indikací k resekci i chronická fibrokavernózní tuberkulóza, se kterou se dnes již prakticky nesetkáváme. Každý chirurgický zákrok při tuberkulóze musí proběhnout pod clonou účinných léků, což je v případě multirezistentních forem někdy velmi obtížné docílit. Chyba! Záložka není definována., Chyba! Záložka není definována.

1.11.5 Selhávání terapie

Vývoj streptomycinu v roce 1944 nastartoval „zlatý věk“ ve vývoji nových antituberkulotik. Po streptomycinu následovala p-aminosalicylová kyselina, isoniazid, PZA, cykloserin, kanamycin, rifampicin. Dalším krokem kupředu bylo zavedení doporučení léčby (podávání kombinace léčiv, zkrácené léčebné režimy) Světovou zdravotnickou organizací na základě klinických zkoušek vedených Britech Medical Research Council.

I přes zkrácení doby léčby u mnoho pacientů dochází k selhání terapie z důvodů nevytrvání v léčbě. Když ustoupí příznaky nemoci, nebo vedlejší účinky jsou nesnesitelné, přestávají brát léky a léčba se stává neefektivní. To vede nejen k selhání, ale i ke vzniku multirezistence.²¹ Nemocní s multirezistentní tuberkulózou (tzv. MDR kmeny) jsou většinou neléčitelní dvěma základními antituberkulotiky – rifampicinem a isoniazidem a je nutno je léčit kombinací základních a vedlejších antituberkulotik. Tyto léky jsou nejen méně účinné než základní antituberkulotika, ale i více toxické a cenově nákladné. Chyba! Záložka není definována.

V posledních letech se objevily – první případy v Jižní Africe – tzv. XDR kmeny, které jsou navíc rezistentní k fluorochinolonům, aminoglykosidům a kapreomycinu.

Ke vzniku multirezistentních kmenů dochází i při tzv. lékařských chybách. Kdy pacienti při selhání terapie, jsou léčeni přidáním dalšího léčiva, aniž by si lékař nechal provést kultivaci, nebo kombinací léků neodpovídající doporučením American Thoracic Society.²²

Další komplikací léčby je současný výskyt onemocnění AIDS. HIV pozitivní osoby mají vyšší vnímavost vůči tuberkulóze, podmíněnou sníženou schopností zachovat si buněčnou imunitu. HIV pozitivní jedinec má při kontaktu s infekcí pravděpodobnost onemocnění tuberkulózou proti zbývajícím zdravé populaci až 80x a nemocní s AIDS až 170x vyšší.^{Chyba! Záložka není definována.} U osob infikovaných HIV virem, nebo nemocných s AIDS se uvádí náhlý a neúprosný průběh onemocnění s mortalitou 72-89 %. Přičemž k úmrtí dochází u pacientů s AIDS a nakažených multirezistentním kmenem do 4 měsíců a do 14 měsíců u pacientů infikovaných citlivým kmenem mykobakteria.²³ Terapie tuberkulózy u nemocných s HIV pozitivitou se řídí všeobecnými zásadami léčby. Výsledky jsou dobré, léčebný efekt nastupuje pomaleji. Nesnášenlivost léků se uvádí až v 26 %. Důsledkem špatné spolupráce při léčbě je vysoká četnost polyrezistentních nemocných. Při onemocnění vyvolaném polyrezistentními mykobakteriemi je tuberkulóza převážně onemocněním smrtícím.^{Chyba! Záložka není definována.}

1.12 Strategie v léčbě tuberkulózy

1.12.1 Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

V roce 1945 na Konferenci OSN o mezinárodní organizaci její účastníci jednohlasně schválili návrh Brazílie a Číny na vytvoření nezávislé mezinárodní zdravotnické organizace v rámci OSN. O rok později v roce 1946 v New Yorku podepsalo 61 států z celého světa včetně Československa (které vystupuje po rozdělení státu v r. 1993 jako samostatný členský stát) Zakládací smlouvu Světové zdravotnické organizace.

Od svého vzniku v roce 1948 podporuje Světová zdravotnická organizace mezinárodní technickou spolupráci v oblasti zdravotnictví, realizuje programy na potírání a úplné odstranění některých nemocí a usiluje o celkové zlepšení kvality lidského života. Cílem činnosti organizace je dosažení co nejlepšího zdraví pro všechny.

Hlavními směry činnosti WHO je vypracování zdravotní politiky a konzultační činnost dle potřeb členských států, odborná pomoc při vypracování národních zdravotnických strategií, sledování indikátorů zdravotního stavu populace a ukazatelů hodnotících zdravotnické systémy jednotlivých států, rozvoj a testování nových technologií a postupů pro kontrolu nemocí a řízení zdravotní péče.

Také tuberkulóza patří mezi zdravotnická témata, kterými se WHO zabývá. WHO shromažďuje statistiky týkající se tohoto onemocnění, navrhuje a doporučuje společné postupy v boji proti MTB, které by vedly k postupné eradikaci tuberkulózy.²⁴

1.12.1.1 Zdraví 21

Jedná se o program Světové zdravotnické organizace v rámci programu Zdraví pro všechny (European health for All), který představuje osnovu pro společnou práci v oblasti zdravotní péče. Je to obecný model, který umožňuje jednotlivým státům naplnit jeho strukturu vlastní problematikou.

Závažným problémem, který je nezbytné řešit, je opětovný růst výskytu a závažnosti tuberkulózy v Evropském regionu. Situaci zhoršuje šířící se MTB, které je odolné vůči chemoterapii. Výraznou roli v návratu tuberkulózy hraje infekce HIV, bída, špatné bydlení, nedostatečná strava a zneužívání drog. K tomu navíc přistupuje ještě opožděné rozpoznání choroby, nedostatečné diagnostické schopnosti a nedostatek léků. Další komplikací je i to, že mnoho zemí se stále ještě neřídí směrnicemi WHO pro diagnostikování a léčbu tuberkulózy, hlavně pro léčbu pod přímým dozorem v rámci krátkodobé strategie (DOTS).

WHO má snahu, aby do roku 2015 všechny země vykazovaly trvalé a pokračující snižování výskytu, úmrtnosti a negativních dopadů tuberkulózy.

Navrhovaný postup proti tuberkulóze:

- celostátní programy kontroly tuberkulózy podle směrnic WHO vycházejících ze strategie DOTS
- rozpoznání případů pomocí mikroskopických vyšetření vzorků hlenu u osob podezřelých z nákazy tuberkulózou
- standardizovaná krátkodobá chemoterapie, alespoň u všech pozitivních případů tuberkulózy, za dodržení vhodných podmínek
- pravidelné a trvalé dodávky všech základních léků proti tuberkulóze
- monitorovací informační systém umožňující průběžnou kontrolu a hodnocení

- speciální služby v terénu pro skupiny přestěhovalců a lidí bez domova, pro chudě, osoby s infekcí HIV a další vysoce rizikové skupiny²⁵

1.12.1.2 Světový den tuberkulózy

Světová zdravotnická organizace vyhláší dne 24. března každoročně Světový den boje proti tuberkulóze. Tento den v roce 1882 oficiálně informoval Dr. Robert Koch vědeckou společnost o objevu bacilu tuberkulózy.

Cílem Světového dne tuberkulózy je proto upozornit na přetrvávající celosvětovou závažnost problému tuberkulózy. Tuberkulóza je stále nebezpečím pro lidstvo, postihující všechny země a kontinenty bez výjimky. Až dosud se nepodařilo ani v jedné zemi na světě tuberkulózu vymýtit. Nadále platí, že jedna třetina všeho lidstva je infikována tuberkulózními bacily, ročně je na světě zjišťováno 6-8 milionů nových tuberkulózních onemocnění a 3 miliony lidí ročně na toto onemocnění umírá.²⁶

Hlavním tématem letošního dne byl slogan „TB anywhere is TB everywhere“, což znamená, že výskyt tuberkulózy kdekoliv představuje její výskyt všude. Má zdůraznit, že přes všechny úspěchy globálního boje proti tuberkulóze zůstává tuberkulóza celosvětově rozšířeným infekčním onemocněním, které nerozeznává hranice jednotlivých států a vyskytuje se ve všech zemích této planety.²⁷

V tento den se také zároveň hodnotí, co se v boji proti tuberkulóze v dané zemi za uplynulý rok podařilo nebo naopak nepodařilo.²⁸

Předběžné údaje za rok 2006 ukazují, že v České republice nedošlo k vzestupu v počtu nově zjištěných a hlášených aktivních tuberkulózních onemocnění a že jako v roce 2005 jde o počet nižší než 10 na 100 000 obyvatel. Proto je nadále Česká republika řazena mezi země s příznivou situací tuberkulózy, která je pod kontrolou.

Z přibližně 900 nových onemocnění připadalo v roce 2006 12 % na cizince a většina zbývajících na osoby, které žijí v nevhodných hygienických podmínkách. Vyznačují se nízkou péčí o své zdraví a obecně sklonem k migraci. Jsou potenciálními zdroji přenosu tuberkulózy na ostatní obyvatelstvo.²⁵

V roce 2005 se podařilo zahájit systematický boj proti tuberkulóze u rizikových skupin. Lze předpokládat, že jeho provádění by mohlo dále snížit počet nově zjištěných onemocnění v České republice a tím i dále vylepšit kontrolu tuberkulózy u nás.²⁶

1.12.2 TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility)

V roce 1994 americká instituce NIAID (National Institute of Allergy and Infectious – Diseases) ustanovila TAACF program, který je určen k intenzifikaci skrínungu (kvantity i kvality) *in vitro* a *in vivo* testů s cílem otestovat co největší počet strukturních typů potenciálních antituberkulotik. Tato služba je bezplatná a případná komercializace výsledků je ponechána poskytovateli sloučenin. Tento program je řízen Southern Research Institute.

TAACF se skládá ze tří úzce propojených oblastí:

1. příjem a uchování nových sloučenin (Southern Research Institute)
2. *in vitro* screening (Hansen's Disease Center)
3. *in vivo* screening (Colorado State University)²⁹

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv je také zapojena do mezinárodního vyhledávacího programu nových antituberkulotik TAACF. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové podepsala v roce 1996 smlouvu s americkou institucí Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), jež je součástí National Institute of Health (NIH). Vývoj potenciálních antimykobakteriálních látek se na katedře ubírá cestou tvorby analogů již existujících léčiv, tzn. s širším terapeutickým indexem, s aktivitou proti senzitivním kmenům a se zlepšenou biologickou dostupností.²⁰

1.12.2.1 Strategie TAACF ve vývoji nových látek

1. Analogy existujících látek

- zlepšení terapeutického indexu
- účinnost proti kmenům citlivým k látkám
- zlepšení biodostupnosti

2. obsáhlé prověřování

- nové mechanismy účinku
- účinnost vůči rezistentním kmenům

3. zaměření se na
- specifika mykobakterií – lipoarabinomanosa, lipoarabinogalaktosa, mykolová kyselina³⁰

1.12.2.2 Cíle programu TAACF

1. Nová antituberkulotika účinná proti multirezistentním kmenům
 - nové mechanismy účinku
2. Nová antituberkulotika, která by byla účinnější, selektivnější a rychleji působící
 - snížení celkové doby léčby
 - omezení podávaného množství léků
 - baktericidní účinek
3. Nová antituberkulotika, která by byla užívána efektivně v kombinaci
4. Podpora v počátečním stádiu vývoje
5. Podněcování vývoje výzkumných projektů vztahujících se k vývoji antimykobakteriálních látek
 - nová léčiva
 - mechanismus účinku
 - molekulární biologie
6. Poskytnutí podkladů pro farmaceutické firmy účastnící se vývoje antimykobakteriálních látek³⁰

1.13 Cíl diplomové práce

Tuberkulóza je onemocnění, které provází člověka již staletí. Ačkoliv je znám původce tuberkulózy – MTB a k dispozici je jak ochranné očkování, tak účinná léčba, zachovala si tuberkulóza do současnosti všechny znaky nebezpečné a občas i obtížně léčitelné nemoci.

Je celosvětově rozšířenou chorobou, která je příčinou smrti přibližně 3 milionů lidí ročně.

Podle předpokladů WHO vzroste mezi rokem 2002 a 2020 počet infikovaných na 100 milionů, 150 milionů lidí bude trpět daným onemocněním a pro 36 milionů bude mít nemoc fatální následky.³¹

Objev prvních vysoce účinných léků společně se zavedením očkování a zvýšením životního standardu po druhé světové válce zvrátil dřívější beznadějně vyhlídky na zvládnutí tuberkulózy v lidské společnosti a tato dříve neléčitelná choroba se stala u nás i v dalších ekonomicky rozvinutých státech vzácností. Avšak ani nejúčinnější protituberkulózní léčba a očkování ohrožených jedinců nedokázaly vymýtit tuberkulózu beze zbytku.³²

V dnešní době můžeme opět sledovat pozvolný vzestup tohoto onemocnění. A proč? Rozvíjí se rezistence kmenů k dosud používaným léčivům, s šířením HIV viru se stěžuje léčba tuberkulózy, nedostatečná compliance pacientů pro výskyt nežádoucích účinků, zdlouhavé léčby. A proto je potřeba vyvíjet nová léčiva, s novými a vylepšenými vlastnostmi, která by zkrátila dobu léčby, minimalizovala nežádoucí účinky a vyloučila recidivu onemocnění.

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zaměřuje na přípravu nových potenciálních léčiv a na studium vztahů mezi jejich chemickou strukturou a biologickou aktivitou. Hlavní pozornost se soustřeďuje na deriváty pyrazinu a pyridinu s předpokládaným antituberkulotickým účinkem. Tato práce se snaží být dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry.

Cílem diplomové práce je:

- rešerše zaměřená na význam tuberkulózy ve světě, její léčba a strategie vedoucí k vymizení tuberkulózy
- metodiky testování antimykobakteriální aktivity, rozdělení metod, problematika testování, faktory ovlivňující výsledky testů

- vývoj a ověření metodiky testování antimykobakteriální aktivity derivátů pyrazinu a benzoxazolu
- vyhodnocení aktivity a metodiky testování antimykobakteriální aktivity

2 TEORETICKÁ ČÁST

Testování antimykobakteriální aktivity *in vitro* je nedílnou součástí výzkumu a vývoje nových antituberkulotik a po jejich uvedení do klinické praxe i nástrojem k získávání informací o stupni citlivosti resp. rezistence k antituberkulotikům.

Laboratorní skřínink nově syntetizovaných, modifikovaných nebo izolovaných látek představuje primární síto, kterým procházejí látky s potenciální antituberkulotickou aktivitou. V případě relevantního účinku jsou následně v rámci studia farmakologického profilu vybrané látky podrobeny zevrubnějšímu šetření tak, aby mohlo být stanoveno spektrum jejich aktivity *in vitro*, včetně možných vlivů, které mohou výsledky testování ovlivnit či zkreslit. *In vitro* testy by měly poskytovat reprodukovatelné výsledky, tj. dostatečně citlivé a spolehlivé, na základě jejich standardního provedení.

V praxi by měly skříninkové testy být natolik citlivé, aby žádná potenciálně využitelná látka s antituberkulotickým účinkem nebyla přehlédnuta. V případě evaluačních testů jde především o co nejpřesnější vymezení spektra aktivity *in vitro* s ohledem na předpokládaný účinek *in vivo*.

K prvotnímu skříninku se využívají diluční bujónové testy, které umožňují stanovení hodnoty MIC.

Praktické provedení bujónových dilučních testů spočívá v naředění (obvykle geometrickou řadou – tzv. dvojkové ředění) testované látky ve vhodném tekutém médiu. Naředěná koncentrace se rozplňuje buď do zkumavek – makrodiluční bujónový test – nebo do jamek mikrotitrační destičky – mikrodiluční bujónový test. Zkumavky nebo destičky se naočkují a nechají inkubovat. První jamka, v které není viditelný růst, udává MIC.

Pro objektivnější vyhodnocení lze automatizovat odečítání výsledků. Přístroje mohou zaznamenávat údaje o nárůstu biomasy mikrobiálního kmene ve vztahu k testované koncentraci látky. Výhodné je to u mikrodilučního testu využívající mikrotitrační destičky, u které lze spektrofotometricky odečítat ve stanovených intervalech nárůst testovaného mikroba. Měření je založeno na srovnání růstu mikroba v jamce s testovanou koncentrací látky s jeho růstem v kontrolní jamce bez testované látky.³³

Porovnání zkumavkové a destičkové metody:

1. Metoda zkumavková

- Výhody:
 - lze ji využít pro přesnější, kvantitativní (MIC, MBC) testování, včetně kombinací antibiotik (stanovení FIC indexu)
 - vyšší stupeň standardnosti a reprodukovatelnosti v porovnání s mikrodilučním formátem v destičkách
 - je vhodná pro studium kinetiky antimikrobního působení, na základě hodnocení změny optické denzity nebo zákalu
- Nevýhody:
 - není možno rutinně testovat větší počet kmenů pro velkou pracnost
 - relativně vysoká spotřeba materiálu, včetně antibiotik
 - vizuální odečet může výsledky zatížit subjektivní chybou

2. Metoda destičková

- Výhody:
 - metodu lze používat pro testování rozsáhlejších souborů kmenů
 - způsob přípravy zaručuje vysokou standardnost provedení, včetně možnosti automatického odečtu a hodnocení
 - jednoduchá inokulace destiček (možnost využití multipipet nebo tzv. „ježků“)
 - rozplněné testovací destičky lze používat při vhodném skladování 4-6 týdnů
 - finanční náklady na antimikrobní látky a kultivační půdy jsou nižší než u zkumavkové metody i difuzního diskového testu
- Nevýhody:
 - při chybě v přípravě jednotlivých testovacích pūd a ředění antibiotika se znehodnotí celá vyrobená série, obecně vyšší relativní chyba³³
 - potenciální problém vysychání při delší (> 2 dny) inkubaci³³

Faktory ovlivňující testování látek

Každá metoda, aby mohla být použita v kterékoli laboratoři, aby poskytovala reprodukovatelné výsledky a zajistila srovnatelnost dosažených výsledků, musí mít vypracovaný standardizovaný postup.

Výsledky testování antimykobakteriální citlivosti mohou být ovlivněny řadou faktorů, které lze rozdělit do čtyř skupin:

1) metodologické faktory

Technická náročnost dané metody je obvykle nepřímo úměrná možnosti standardizace jejího laboratorního postupu. Výsledky testování mohou být ovlivněny výběrem testu nebo parametru hodnotících antimikrobní aktivitu.

2) podmínky testovacího systému

Tyto faktory ovlivňují výsledky testování přímo nebo nepřímo tím, že interferují se samotnou testovací látkou, nebo vytvářejí více či méně vhodné prostředí pro růst daného mikroba. Uplatňuje se především složení testovací půdy a její pH, u nestabilních látek také teplota a délka inkubace. Na růst a životaschopnost testovaného mikroba mají vliv podobné faktory, včetně složení kultivační atmosféry vyjádřené hlavně stupněm aerace.

3) faktory podmíněné testovanou látkou

Zejména záleží na rozpustnosti a stabilitě testované látky. Látka ve vyšší koncentraci se může vysrážet a snížit tak množství látky v účinné formě.

Jiným aspektem jsou vlastnosti látky (protonizace molekuly) anebo jeho lékové formy, které mohou ovlivňovat jeho interakci s mikroben a v konečném důsledku korelaci výsledků *in vitro* a *in vivo*.

4) faktory podmíněné testovaným mikroorganismem

Jedná se v první řadě o velikost inokula, která je nepřímo úměrná antimikrobní aktivitě, tj. čím větší je inokulum, tím větší je MIC.

Vliv na výsledky testování může mít i stádium růstové fáze testovaného mikroba. Buňky v exponenciální fázi růstu budou citlivější k zásahu látky na úrovni různých metabolických procesů než klidová stádia.³³

Perspektivní možností v testování citlivosti představují automatizované systémy typu Bactec 460 TB (Becton Dickinson), Bactec MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) 960 (Becton Dickinson), které umožňují zkrátit dobu testu na 4-5 dnů.³⁴

Bactec 460 TB hodnotí kinetiku růstu podle množství $^{14}\text{CO}_2$ akumulovaného v plynné fázi kultivačního systému. Radioizotop ^{14}C se nachází v Middlebrookově půdě obohacené tímto substrátem.

Bactec MGIT 960 je už neradiometrický systém, který využívá selektivní Middlebrookovo médium ve speciální kultivační lahvičce, na jejímž dně je zabudován oxygenový senzor. Spotřeba kyslíku, která je výsledkem mykobakteriálního metabolismu, je přímo úměrná intenzitě jasně oranžové fluorescence hodnocené při 365 nm na UV transluminátoru.^{35,36}

2.1 Testování potenciálních antituberkuloticky aktivních látek v TAACF programu

Primary Assay Data (Level 1)

Všechny sloučeniny jsou testovány proti *M. tuberculosis* H₃₇Rv v koncentraci 6,25 mg·l⁻¹. Výsledky jsou udávány v % inhibice. Sloučenina je považována za aktivní, jestliže vyvolá inhibici 90 %.

MIC Assay Data (Level 2)

Sloučeniny s inhibicí 90 % jsou dále testovány při nižších koncentracích pro stanovení přesné minimální inhibiční koncentrace (MIC), vyvolávající 99 % inhibici růstu bakterií.

Cytotoxicity Assay Data (Level 2)

Sloučeniny jsou testovány na zjištění toxicity. Index selektivity (SI) je definován jako poměr změřené IC₅₀ v systému VERO buněk k zjištěné hodnotě MIC.

Macrophage Assay Data (Level 3)

Vybrané sloučeniny jsou testovány *in vitro* v modelu TB-infikovaného makrofágu. Je sledována redukce růstu residuálních mykobakterií po dobu 7 dnů ve srovnání s kontrolou (bez sloučeniny). EC₉₀ a EC₉₉ pak vyjadřují koncentrace způsobující 90 % a 99 % redukci růstu residuálních mykobakterií.

SDRMIC Assay Data (Level 3)

Test je určen pro zjištění zkřížené resistance vůči mykobakteriu.

***M. avium* MIC Assay Data (Level 3)**

Zjištění aktivity vůči uvedenému kmenu.

MBC Assay Data (Level 3)

Určování minimální baktericidní koncentrace.

Tuberculosis Animal Model (*in vivo*) Assay Data

V současnosti se používají 2 modely: GKO [IFN gamma KO mice on a C57BL/6 background (Jackson)] model a standardní (C57BL/6 mouse) TB model.³⁷

1. *In vitro* vyhodnocení antimykobakteriální aktivity

- Prvotní screening je prováděn mikrodiluční metodou na živném bujónu v BACTEC 12B (Microplate Alamar Blue Essay – MABA). Všechny vzorky jsou v jednotné koncentraci 6,25 mg·l⁻¹. Jako očkovací kmen se používá *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Sloučeniny vystavené fluorescenci jsou testovány v BACTEC 460 radiometrickým systémem. Sloučeniny s MIC > 6,25 mg·l⁻¹ jsou hodnoceny dále.

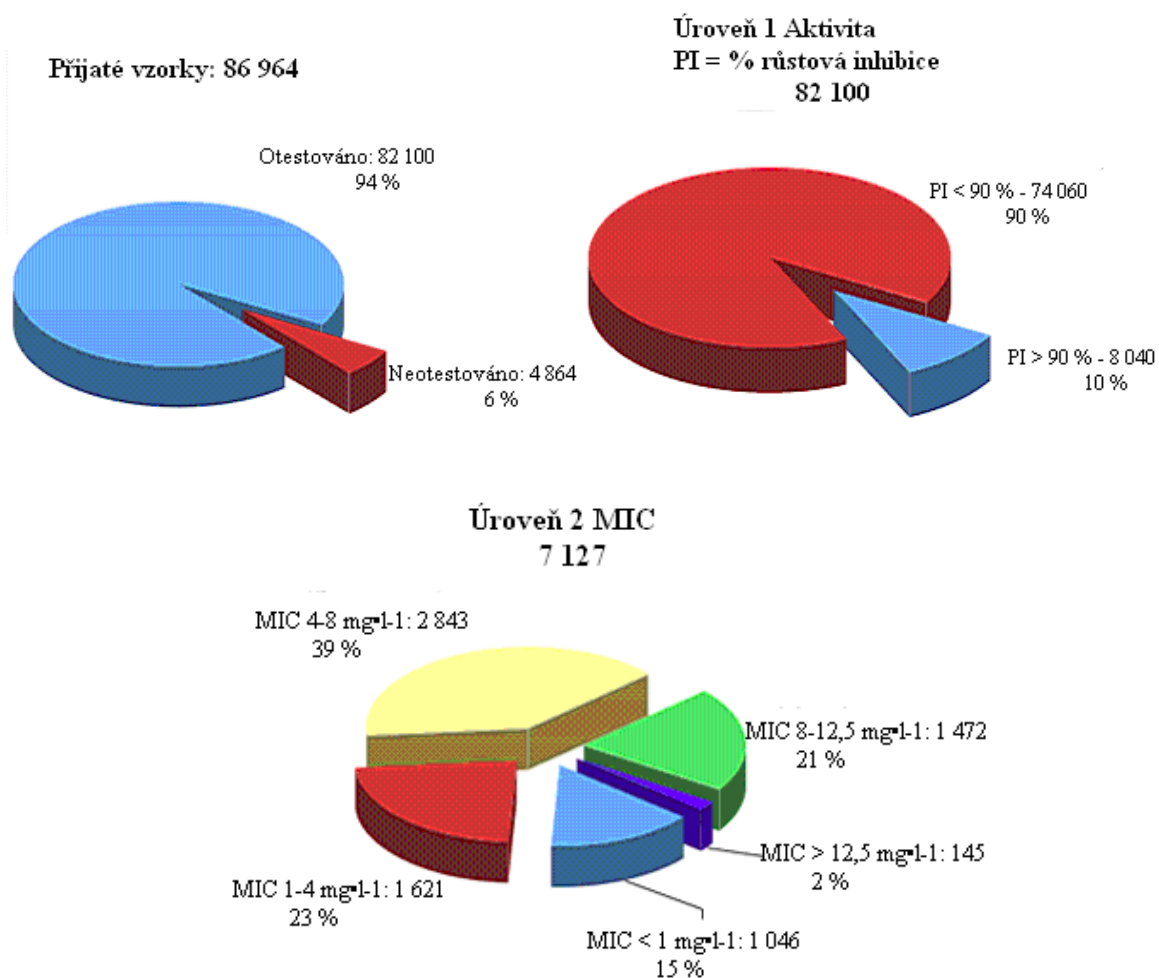
- U sloučenin, které vyhověly základním požadavkům, se určuje aktuální MIC za použití MABA. Současně se zjišťuje cytotoxicita (IC₅₀).

- U sloučenin s SI > 10 (SI = IC₅₀/MIC) je potvrzena *in vitro* aktivita v BACTEC 460 s koncentrací vzorku 6,25 mg·l⁻¹. Látky jsou testovány na vrstvě makrofágů z myší kostní dřevě kmenem MTB při čtyřech koncentracích: 0,25, 1, 4 a 16 x MIC vzorku.

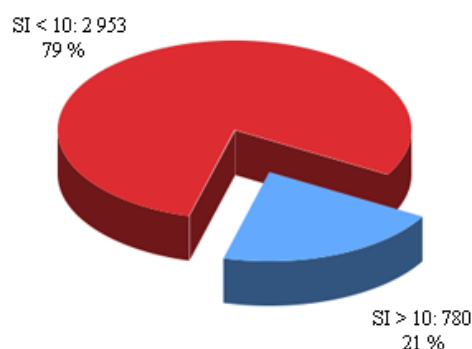
- Současně s testováním na makrofázích se zjišťuje MIC pro kmen *M. avium* a tři kmeny MTB rezistentní k jednomu antituberkulotiku – k isoniazidu, rifampicinu a jednomu dalšímu antituberkulotiku vybranému podle typu sloučeniny.³⁷

2. Testování na zvířecím modelu *in vivo*

- Testování mykobakteriální aktivity *in vivo* podmínkách na modelu experimentální tuberkulózy u myši.
- Před zahájením zkoušky se musí určit vhodné dávkování zkoušených látek.
- Sloučeniny se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, podají se třem živočichům a sledují se nejdříve po čtyřech, šesti hodinách a potom po dvou dnech jeden týden. Pokusná zvířata jsou po týdnu zabita a pozorována na důkaz toxicity.³⁷



Selektivita aktivity
 $SI = \text{index selektivity} = IC_{50}/MIC$
 3 733



Obrázek 5: Testování nových látek v programu TAACF v číslech³⁸

2.2 Stanovení lékové citlivosti mykobakterií podle Národní referenční laboratoře pro mykobakterie Státního zdravotního ústavu v Praze

Stanovení lékové citlivosti se provádí nejen při vývoji nových antituberkulotik, ale i v praxi u každého nově izolovaného kmene MTB a po dohodě s lékařem u kmenů, které jsou prokazatelně původci lidských onemocnění.

a) Makrometodou

- příprava roztoků a půd s antituberkulotiky

Antituberkulotika – je možné použít substance, práškové nebo lyofilizované formy léků

Rozpouštědla – většina látek se rozpouští ve sterilní destilované vodě, DMSO, ethanolu nebo ethylenglykolu. Navážením příslušného množství látky a jejím rozpouštěním získáme základní roztok, který se dále ředí sterilní destilovanou vodou.

Příprava základního roztoku o koncentraci $10\,000\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$:

$$\frac{10\,000}{\text{účinná složka (mg)}} \cdot 10 = \text{navážka (mg)}$$

- příprava půd s antituberkulotiky

Pro testy citlivosti se používá Löwenstein-Jensenova půda bez škrobu. Při použití PZA je třeba upravit pH půdy na 4,8 - 4,9. Na okyselení se používá 1M HCl.

Je možné též použít Ogawovu půdu, nebo Šulovu půdu zpevněnou 1,5 % agarem.

– příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se nabere kultura mykobakterií do vhodné nádoby a přidají se skleněné kuličky a destilovaná voda. Nádobka se uzavře a homogenizuje na třepačce. Po homogenizaci se upraví zákal inokula přidáním sterilní destilované vody. Ze základní suspenze se připraví ředění 10^{-1} až 10^{-5} .

Na půdy se očkuje 0,1 ml suspenze na 1 zkumavku.

Naočkované inokulum – rovnoměrně rozprostřené na povrchu media, necháme dobře zaschnout a necháme inkubovat při teplotě 37°C.

– odčítání a hodnocení výsledků

Inkubace trvá obvykle 3-4 týdny. Nejnižší testovaná koncentrace, u které se nezaznamená růst, je brána jako minimální inhibiční koncentrace.

– nevýhody makrometody: vyšší finanční náklady: větší spotřeba půdy, testovaných látek, delší doba inkubace³⁵

b) Mikrometodou

popsána v experimentální části

– výhody mikrometody: možnost testování termolabilních látek, daleko nižší spotřeba půdy, látek, možnost většího rozsahu koncentrací s menším množstvím vzorku, zkrácení doby inkubace³⁵

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a chemikálie

Testované kmeny:

1. *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* ATCC 27294

Tyčinky rovné nebo mírně zahnuté, silně acidorezistentní. Růst na všech půdách je pomalý a lze ho zaznamenat obvykle za dva nebo více týdnů. Kolonie v tekutých půdách jsou granulované, bílé, neroztřepatelné. Optimální teplota je 37°C.

2. *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478

Středně dlouhé až dlouhé tyčinky, často výrazně granulované, jednotlivé i seřazené v provazcích. V tekutých půdách vytváří vatovitý šedobílý sediment s řasnatou povrchovou blankou. Po vystavení kultur světlu s následnou inkubací se barva kolonií mění na žlutou až oranžovou (pozitivní fotochromogenita). Růst zaznamenáme za dva až tři týdny. Optimální teplota je 30 -37°C.

3. *Mycobacterium avium*

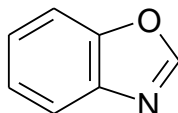
Většinou krátké tyčinky jednotlivé i ve shlucích. Na tekutých půdách vytváří jemný sediment a mléčný zákal. Růst můžeme zaznamenat za dva až čtyři týdny. Optimální teplota je 32 – 42°C.

a) *M. avium* 80

b) *Mycobacterium avium* 152³⁵

Testované látky:

1. Deriváty benzoxazolu



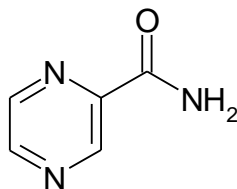
Benzoxazoly patří mezi biologicky velmi aktivní struktury. Různé benzoxazoly jsou studovány pro svou antibakteriální, antifungální a protinádorovou aktivitu.

Benzoxazoly jsou považovány za strukturální bioisomery nukleotidů podobných adeninu a guaninu. Vykazují nízkou toxicitu pro teplokrevné živočichy.

Slibnou aktivitu vůči MTB ukazují deriváty 5,7-di-*tert*-butylbenzoxazolu substituovaného na C₍₂₎ aromatickým substituentem.

Důležitou vlastností antituberkuloticky účinných látek je jejich lipofilita, aby se dostaly skrz buněčnou stěnu mykobakterií.³⁹

2. Deriváty PZA



Při testování antituberkulotické aktivity PZA je důležité vědět, že PZA je v *in vitro* podmínkách neúčinný, i když vykazuje pozoruhodnou *in vivo* aktivitu. PZA potřebuje ke svému účinku kyselé pH.

Proč kyselé pH je základem pro aktivitu PZA, není zcela známo. Předpokládá se, že kyselé pH zvyšuje aktivitu pyrazinamidasy, a tím dochází k akumulaci POA v intracelulárním prostoru buňky. Na rozdíl od neutrálního nebo alkalického pH, kdy se většina POA hromadí vně buňky. Tato vlastnost je specifická jen pro kmeny MTB, které nejsou rezistentní. Rezistentní kmeny MTB nekonvertují PZA na POA. A kmeny, které jsou přirozeně rezistentní k PZA, mají vysoce aktivní efluxní mechanismy, které neumožňují hromadění POA uvnitř buňky.⁴⁰

Přístroje, pomůcky a použitý materiál:

Rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO)

Destilovaná voda

Šulova půda s pH upraveným na hodnotu 5,6

Mikropipety – 100 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml

Osmikanálová mikropipeta – 100 µl

Mikrotitrační destičky s víčky

Laminární box

Čtecí zařízení – stolek se zvětšovací zrcátkem

Třepačka

3.2 Postup práce

Pro bezpečnost a ochranu zdraví se všechny kroky testování provádějí v laminárním boxu v rukavicích a s rouškou. Pracuje se se sterilním nádobím i pomůckami, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků a mikrotitrační destičky.

Při jednom pracovním postupu se testovalo šest látek: pět derivátů pyrazinu pro všechny čtyři testované kmeny a PZA, jako kontrolní vzorek.

3.2.1 Příprava vzorků

6,4 mg vzorku jsem rozpustila v 0,25 ml rozpouštědla – DMSO a tím jsem získala základní vzorek o koncentraci $25,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Ze základního vzorku jsem odebrala mikropipetou 0,125 ml a přidala ke stejnému množství DMSO. Takto jsem postupovala, až jsem získala šest koncentrací v rozmezí $0,4 - 25,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabulka 3).

Tabulka 3: Koncentrace vzorků

Ředění	po naředění vzorku $c \text{ [mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$	2,475 ml Šulovy půdy + 0,025 ml vzorku $c \text{ [mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$	Výsledná c testované látky po naočkování $c \text{ [mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$
Základní vzorek (6,4 mg vzorku v 0,25 ml DMSO)	25,6	0,256	0,128 [128 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
1 (0,125 ml základního vzorku + 0,125 ml DMSO)	12,8	0,128	0,064 [64 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
2 (0,125 ml ředění 1 + 0,125 ml DMSO)	6,4	0,064	0,032 [32 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
3	3,2	0,032	0,016 [16 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
4	1,6	0,016	0,008 [8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
5	0,8	0,008	0,004 [4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
6	0,4	0,004	0,002 [2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]

3.2.2 Příprava Šulovy půdy

Šulova půda se nechávala připravovat před testováním ve varně půd v Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Základní roztok:

- Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,25 g
- KH ₂ PO ₄	0,75 g
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
- Citronan sodný	1,25 g
- L-alanin	0,075 g
- Citronan železito-amonný	0,025 g
- Kaseinový hydrolyzát 10 %	25,00 ml
- Glycerin	15,00 ml
- Malachitová zeleň oxalát 0,2%	1,00 ml
- H ₂ O	ad 1000,00 ml

Po rozpuštění solí se základní roztok autoklávoval 30 min. při 120 °C a po vychladnutí se přidalo hovězí sérum o obsahu 4 % bílkovin.

K úpravě pH na 5,6 se použila 1M HCl a výsledné pH se zkontrolovalo pH-metrem.

Nyní se Šulova půda v Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové nepřipravuje a je nakupována u firmy Trios, spol. s r. o., Praha (Šulova tekutá půda (5 ml) s NaNO₃).

Do připravených zkumavek bylo napipetováno 2,475 ml Šulovy půdy o pH 5,6 a přidáno 25 µl testovaných látek. Vše bylo protřepáno.

3.2.3 Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou jsem odebrala kulturu mykobakteria do sterilní zkumavky s uzávěrem. Přidala jsem skleněné kuličky a destilovanou vodu. Poté jsem suspenzi homogenizovala na laboratorní třepačce. Po zhomogenizování jsem upravila zákal dle zákalové stupnice McFarlanda v rozmezí 0,5-1.

Ze základní suspenze jsem připravila ředění 10⁻¹, 10⁻² a 10⁻³.

3.2.4 Mikrodiluční metoda

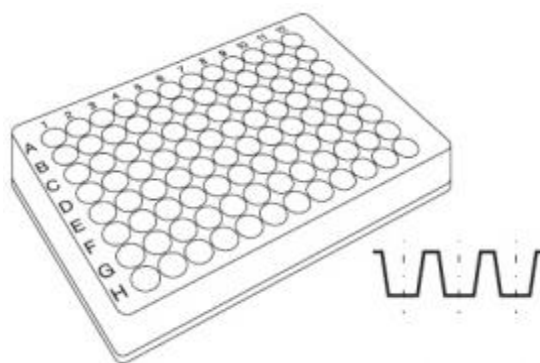
Pro mikrodiluční metodu se používají mikrotitrační destičky z plastů s 96 jamkami s plochým dnem (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Na destičce jsem vyznačila fixem 6 dvousloupců, kontrolní řádek (A) a dole jsem poznačila testované látky. V prvním dvousloupci jsem vždy testovala PZA (pro kontrolu). Osmikanálovou pipetou jsem naplnila jamky Šulovou půdou s testovanými látkami řaděnými geometrickou řadou. Přičemž řada A vždy sloužila pro kontrolu – Šulova půda bez testované látky naočkovaná příslušným kmenem. Takto jsem nachystala čtyři destičky – pro každý testovaný kmen jednu. A všechny destičky jsem naočkovala inokulem po 0,1 ml, liché sloupce kulturou v ředění 10^{-1} a sudé kulturou v ředění 10^{-3} .

Po naočkování všech jamek jsem destičky uzavřela víčky, vložila do PVC sáčků s navlhčenou buničitou vatou proti vysychání a přenesla do inkubátoru s teplotou 37 °C. Po dvoutýdenní inkubaci jsme společně s MUDr. Svobodovou odečetly výsledky.

Výsledky jsme odečítaly pomocí čtecího zařízení (stolek se zvětšovací zrcátkem). Alespoň v jednom z obou ředění byly narosteny dobře viditelné mikrokolonie v kontrolních jamkách (řada A). A jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) se označuje nejnižší koncentrace testované látky, v níž došlo k inhibici růstu.

Výhodou mikrodiluční metody je především to, že tímto způsobem lze testovat i termolabilní látky, spotřeba půdy i substancí je minimální, ale rozsah koncentrací léků naopak značný.³⁵



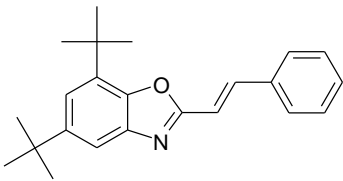
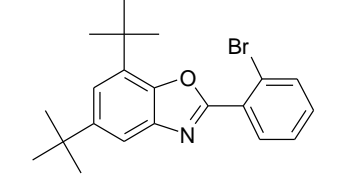
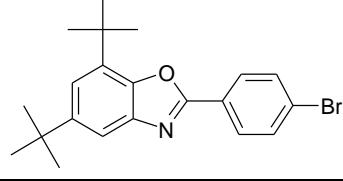
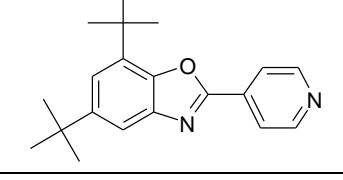
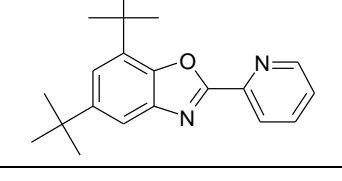
Obrázek 6: Mikrotitrační destička⁴¹

Tabulka 4: Příklad destičky pro testování lékové citlivosti mikrodiluční metodou

		10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
kontrola $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 4 8 16 32 64 128	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
	G												
	H												
		PZA	Vzorek 1		2	3		4		5			

4 VÝSLEDKY

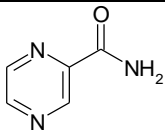
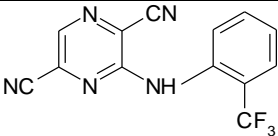
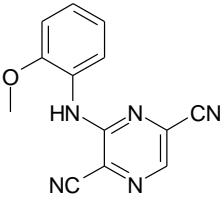
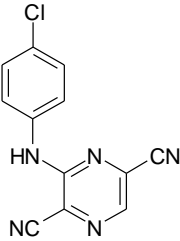
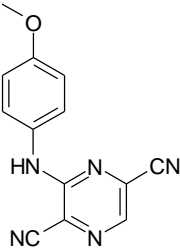
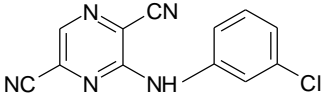
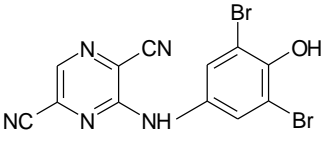
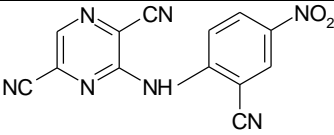
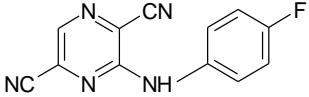
4.1 Deriváty benzoxazolu

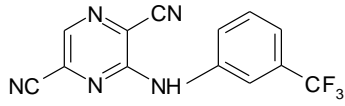
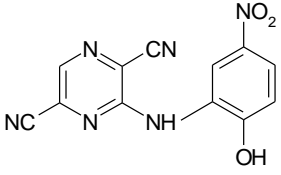
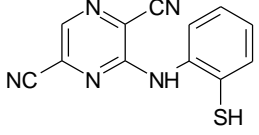
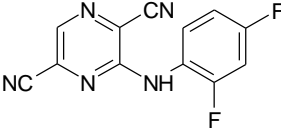
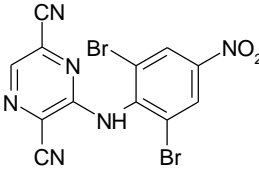
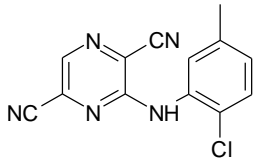
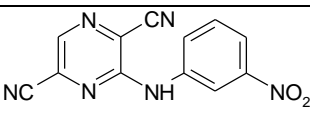
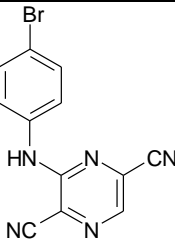
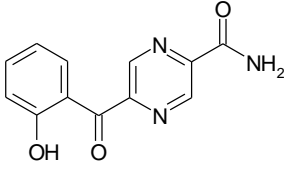
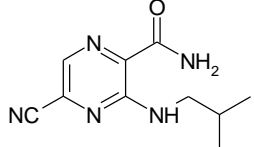
Sloučenina	M. h.	Vzorec	Název
VST 454	333,5		5,7-di- <i>tert</i> -butyl-2-styrylbenzoxazol
VST 456	386,3		5,7-di- <i>tert</i> -butyl-2-(2-bromfenyl)-benzoxazol
VST 459	386,3		5,7-di- <i>tert</i> -butyl-2-(4-bromfenyl)-benzoxazol
VST 476	308,4		5,7-di- <i>tert</i> -butyl-2-pyridin-4-ylbenzoxazol
VST 477	308,4		5,7-di- <i>tert</i> -butyl-2-pyridin-2-ylbenzoxazol

Antituberkulotická aktivita derivátů benzoxazolů v hmotnostní koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] a v molární koncentraci [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$].

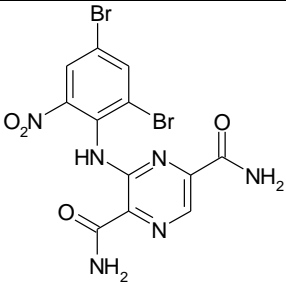
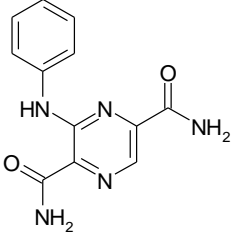
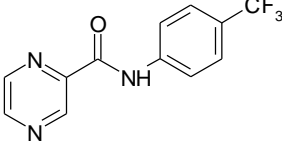
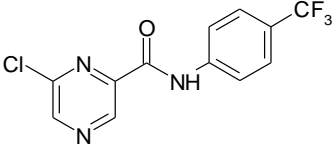
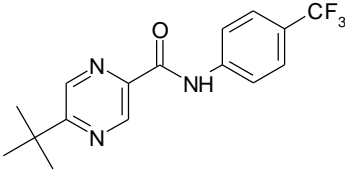
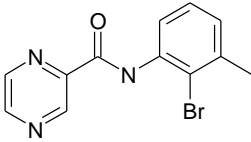
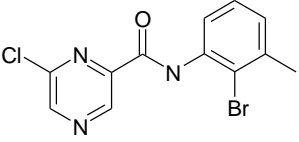
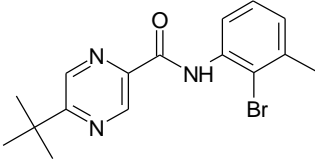
Sloučenina	MIC [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] ($[\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$)			
	<i>M. tuberculosis</i> <i>H37 Rv</i>	<i>M. avium</i> 80	<i>M. avium</i> 152	<i>M. kansasii</i>
VST 454	128 (384)	> 128	> 128	> 128
VST 456	> 128	> 128	> 128	> 128
VST 459	> 128	> 128	> 128	> 128
VST 476	16 (52)	32 (104)	32 (104)	32 (104)
VST 477	16 (52)	64 (208)	64 (208)	32 (104)

4.2 Deriváty PZA

Sloučenina	M. h.	Vzorec	Název
PZA	123,12		pyrazinkarboxamid
CN 1	289,17		3-(2-trifluormethylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
D 3	251,25		3-(2-methoxyfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
D 8	255,67		3-(4-chlorofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
JD 7	251,25		3-(4-methoxyfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 8	255,67		3-(2-chlorofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 9	395,01		3-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 10	291,23		3-(2-kyan-4-nitrofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 23	239,20		3-(4-fluorofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril

LP 25	289,17		3-(3-trifluormethylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 29	282,20		3-(2-hydroxy-5-nitrofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 38	253,28		3-(2-merkaptofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 43	257,20		3-(2,4-difluorfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 44	424,01		3-(2,6-dibrom-4-nitrofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 45	269,69		3-(2-chlor-5-methylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 52	266,06		3-(3-nitrofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
LP 55	300,12		3-(4-bromfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
MD 21	243,22		5-(2-hydroxybenzoyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 25	219,25		5-kyan-3-(isobutylamino)pyrazin-2-karboxamid

MD 45	287,35		3-(2-methylfenylamino)-5-thiokarbamoylpyrazin-2-karboxamid
MD 60	273,32		3-methylfenylamino-5-thiokarbamoylpyrazin-2-karboxamid
MD 76	232,71		3-chloropyrazin-2,5-bis(karbothioamid)
MD 86	299,25		4-(3-karbamoyl-6-kyanpyrazin-2-ylamino)-2-hydroxybenzoová kyselina
MD 101	255,24		3-(2-hydroxyfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid
MD 392	271,28		3-(3-methylfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karboxamid)
MD 393	325,25		3-(3-trifluormethylfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karboxamid)

MD 394	460,04		3-(2,4-dibrom-6-nitro-fenylamino)pyrazin-2,5-bis(karboxamid)
MD 395	257,25		3-fenylaminopyrazin-2,5-bis(karboxamid)
MD 409	267,21		<i>N</i> -(4-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 410	301,66		6-chlor- <i>N</i> -(4-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 411	323,32		5- <i>tert</i> -butyl- <i>N</i> -(4-(trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 413	292,14		<i>N</i> -(2-brom-3-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 414	326,58		6-chlor- <i>N</i> -(2-brom-3-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 415	348,25		5- <i>tert</i> -butyl- <i>N</i> -(2-brom-3-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid

MD 416	382,69		5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -(2-brom-3-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 417	339,14		<i>N</i> -(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 419	395,25		5- <i>tert</i> -butyl- <i>N</i> -(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 420	429,69		5- <i>tert</i> -butyl-6-chlor- <i>N</i> -(3-jod-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid
MD 439	379,16		3-(3-jod-4-methylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid
MD 440	413,24		3-(3-jod-4-methylfenylamino)-5-thiokarbamoylpyrazin-2-karboxamid
MD 441	361,15		3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril

MD 442	429,31		3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karbothioamid)
MD 445	368,28		3-(4-bromofenylamino)pyrazin-2,5-bis(karbothioamid)

Antituberkulotická aktivita derivátů PZA v hmotnostní koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] a v molární koncentraci [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$].

Sloučenina	MIC [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] ($[\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}]$)			
	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv	<i>M. avium</i> 80	<i>M. avium</i> 152	<i>M. kansasii</i>
PZA	8 (65)	> 128	> 128	> 128
CN 1	8 (28)	> 128	> 128	128 (443)
D 3	2 (8)	> 128	> 128	> 128
D 8	2 (8)	> 128	> 128	32 (125)
JD 7	8 (32)	> 128	> 128	32 (127)
LP 8	4 (16)	> 128	> 128	32 (125)
LP 9	16 (41)	64 (162)	128 (324)	64 (162)
LP 10	16 (55)	128 (440)	128 (440)	16 (55)
LP 23	8 (33)	> 128	> 128	> 128
LP 25	16 (55)	> 128	> 128	128 (443)
LP 29	8 (28)	64 (227)	128 (454)	32 (113)
LP 38	kontaminace	kontaminace	kontaminace	kontaminace
LP 43	kontaminace	kontaminace	kontaminace	kontaminace
LP 44	kontaminace	kontaminace	kontaminace	kontaminace
LP 45	kontaminace	kontaminace	kontaminace	kontaminace
LP 52	kontaminace	kontaminace	kontaminace	kontaminace

LP 55	8 (27)	> 128	> 128	64 (213)
MD 21	32 (132)	> 128	64 (263)	> 128
MD 25	32 (146)	128 (584)	128 (584)	> 128
MD 45	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 60	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 76	4 (17)	16 (69)	16 (69)	32 (138)
MD 86	8 (27)	> 128	64 (214)	> 128
MD 101	16 (63)	> 128	> 128	> 128
MD 392	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 393	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 394	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 395	kontaminace	> 128	> 128	kontaminace
MD 409	2 (7)	> 128	> 128	128 (479)
MD 410	8 (27)	64 (212)	64 (212)	32 (106)
MD 411	8 (25)	> 128	> 128	> 128
MD 413	2 (7)	> 128	> 128	> 128
MD 414	> 128	> 128	> 128	> 128
MD 415	32 (92)	> 128	> 128	> 128
MD 416	> 128	> 128	> 128	> 128
MD 417	2 (6)	> 128	> 128	> 128
MD 419	8 (20)	> 128	> 128	> 128
MD 420	4 (9)	> 128	> 128	> 128
MD 439	> 128	> 128	> 128	> 128
MD 440	16 (39)	> 128	> 128	> 128
MD 441	4 (11)	> 128	> 128	> 128
MD 442	> 128	> 128	> 128	> 128
MD 445	64 (174)	> 128	> 128	> 128

5 DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na vyhodnocení aktivity potenciálně antimykobakteriálních látek, tedy mikrobiologické hodnocení a stanovení minimální inhibiční koncentrace. Stanovovala jsem deriváty benzoxazolů a PZA. Tyto deriváty byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením doc. M. Doležala.

Stanovení minimální inhibiční koncentrace látek proti mykobakteriím se považuje stále za problematické a náročné. Aktivita PZA se liší *in vitro* v závislosti na kyselosti půdy, na jejím složení i velikosti inokula. Minimální inhibiční koncentrace PZA při pH 6,8-7,2 se pohybuje od 100 do 500 mg·l⁻¹, při pH 5,5 se ustaluje na 25-40 mg·l⁻¹. Při použití Löwenstein-Jensonovy půdy je MIC 400 mg·l⁻¹, při testování na Šulově půdě 16 mg·l⁻¹.

Při práci je důležité dodržovat zásady správné laboratorní praxe. To znamená pracovat se sterilním nádobím, vydezinfikovanými pomůckami a veškeré kroky provádět v laminárním boxu.

Ze začátku jsem měla problém s přerůstáním destiček plísněmi nebo jinými kmeny bakterií. Protože mykobakterie rostou delší dobu než ostatní bakterie, vzorky se nedaly odečíst a musely se vyhodit. Proto jsem začala všechny kroky, i rozpouštění vzorků, dělat v latexových rukavicích a rovnou v laminárním boxu. I špičky od mikropipet se nechávaly sterilizovat. A postupně se podařilo kontaminaci předejít.

Dalším problémem se stalo rozpouštění vzorků. Vzorky jsem původně rozpouštěla v destilované vodě, kterou jsem používala i k dalšímu ředění základního roztoku. Ale některé vzorky se začaly po naředění vodou srážet a nešly již ani roztřepat. Po otestování vlivu DMSO na inhibiční aktivitu vůči kmenům mykobakterií jsem začala všechny vzorky rozpouštět v DMSO. DMSO inhibuje růst mykobakterií jen v koncentrovaném stavu. V konečné koncentraci v médiu je nejvyšší koncentrace DMSO 0,5 %. A výsledek MIC by neměl být proto zkreslován aktivitou DMSO.

6 ZÁVĚR

Látky byly testovány *in vitro* v tekuté Šulově půdě obohacené kaseinovým hydrolyzátem a hovězím sérem jako zdrojem dusíku. pH půdy bylo upraveno na 5,6. Aktivita byla sledována v porovnání s PZA proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* 80/72 a *Mycobacterium avium* 152. Konečné koncentrace sloučenin v médiu byly 128, 64, 32, 16, 8, 4 a 2 mg·l⁻¹. Výsledky byly odečteny po třech až čtyřech týdnech inkubace při teplotě 37 °C.

Odečtené hodnoty jsem přepočítala z hmotnostní koncentrace na molární koncentraci, která zohledňuje v konečné aktivitě i molekulovou hmotnost testovaného vzorku a víc vypovídá o celkovém účinku sloučeniny.

Hodnoty MIC PZA používaného jako standard se pohybovaly v rozmezí 4-16 (32-130 μmol·l⁻¹). Naměřené MIC jsou v souladu s údaji uváděnými světovými zdroji. TAACF uvádí MIC pro PZA v rozmezí od 6-60 mg·l⁻¹.⁴² Hodnoty se od sebe mohou lišit v závislosti na použité metodice, médiu a pH.

Z výsledků hodnocení vyplývá, že některé testované látky vykazují větší aktivitu vůči kmenům mykobakterií než PZA. Vzorky D 3 (8 μmol·l⁻¹), D 8 (8 μmol·l⁻¹), MD 409 (7 μmol·l⁻¹), MD 413 (7 μmol·l⁻¹), MD 417 (6 μmol·l⁻¹), MD 420 (9 μmol·l⁻¹) a MD 441 (11 μmol·l⁻¹) byly velmi účinné proti kmenu MTB, ale na ostatní kmeny neměly žádný vliv. Ale vzorky LP 29, MD 410 a především MD 76 projevily aktivitu jak proti kmenu MTB, ale i ostatním používaným kmenům. Sloučenina MD 76 vykazuje dobrou účinnost proti kmenu *M. avium* 80/72 a *M. avium* 152 – 69 μmol·l⁻¹ a proti kmenu *M. kansasii* – 138 μmol·l⁻¹.

Podářilo se optimalizovat a standardizovat metodiku *in vitro* antimykobakteriálního hodnocení nově syntetizovaných potenciálních antituberkulotik.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CNS	centrální nervový systém
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTS	Directly Observed Therapy Strategy
EC	efektivní koncentrace
EH	ethambutol, isoniazid
EHRZ	ethambutol, isoniazid, rifampicin, pyrazinamid
EHZ	ethambutol, isoniazid, pyrazinamid
EMB	ethambutol
FAS	syntasa mastných kyselin
FIC	fractional inhibitory concentration
HE	isoniazid, ethambutol
HR	isoniazid, rifampicin
INH	isoniazid
MBC	Minimal Bactericidal Concentration
MDR-TB	Multi-drug resistant- tuberculosis
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious - Diseases
NIH	National Institute of Health
OSN	Organizace spojených národů
POA	pyrazinkarboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
RMP	rifampicin
SHE	streptomycin, isoniazid, ethambutol
SHR	streptomycin, isoniazid, rifampicin
SHRZ	streptomycin, isoniazid, rifampicin, pyrazinamid
SHZ	streptomycin, isoniazid, pyrazinamid
SI	index selektivity
STM	streptomycin

SZO	Světová zdravotnická organizace
TAACF	Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility
TB	tuberkulóza
TRN	oddělení tuberkulózy a respiračních nemocí
WHO	World Health Organization
XDR-TB	Extensive Drug Resistant TB, also referred to as Extreme Drug Resistance

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Počet hlášených TB onemocnění v ČR v letech 2001-2005 (absolutní počty)

Tabulka 2: Nové hlášené případy TB v regionech v letech 2000-2005

Tabulka 3: Koncentrace vzorků

Tabulka 4: Příklad destičky pro testování lékové citlivosti mikrodiluční metodou

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ HOMOLKA, J.; VOTAVA, V. Tuberkulóza. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2003. 79 s.
- ² JIREŠ, J. Albertinum: Boj proti tuberkulóze a jiným nemocem. 1. vyd. Hradec Králové: ECC Servis s.r.o. Žamberk: Odborný léčebný ústav Albertinum, 2005. 111 s.
- ³ KREJBICH, Fr. Tuberkulóza v České republice v roce 2005 [online]. c2006 [cit. 8.3.2007]. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně: Česká pneumologická a ftizeologická společnost. Dostupný z WWW: <<http://www.pneumologie.cz/odborne/index.html>>
- ⁴ <<http://www.who.int/globalatlas/interactiveMapping/MainFrame2.asp>> [online]. c2004 [cit. 8.3.2007]
- ⁵ POKORNÝ, Ant.; MERTA Zd.; SALAJKA Fr. Tuberkulóza. 1. vyd. Brno: MU, 1998. 54 s.
- ⁶ KREJSEK, J.; KOPECKÝ, O.; JANKOVIČOVÁ, K. Aktivní imunizace BCG vakcínou a imunita proti *M. tuberculosis*. Alergie. 2001, vol. 3, no. 2
- ⁷ <<http://biomikro.vscht.cz/documents/hygklinmik/klinika4.pdf>> [online]. c2004 [cit. 8.3.2007]
- ⁸ <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/roese-lars-2004-06-09/HTML/Roese_html_m7f300b77.png> [online]. c2004 [cit. 31.3.2007]
- ⁹ VOTAVA, M. a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s.
- ¹⁰ GEORGE, K. M. et al. Mykolakton – toxin mykobakterií. Medicína. 1999, vol. 6, no. 4, s. 6
- ¹¹ Tuberkulóza [online]. c2004 [cit. 8.3.2007]. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. Dostupný z WWW: <<http://lf1.cz/upload/tbc.doc>>
- ¹² MITCHISON, D. A. The chemotherapy of tuberculosis. Cas Lek Cesk. 1984, vol. 123, no. 6, s. 145-152

-
- ¹³ ČMEDLOVÁ, P.; Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK, 2005
- ¹⁴ DRAPER, P. Lipid biochemistry takes a stand against tuberculosis. *Nature Medicine*. 2000, vol. 6, no. 9, s. 977-978.
- ¹⁵ ZIMHONY, O.; COX, J. S.; WELCH, J. T.; VILCHÈZE, C.; JACOBS, W. R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FAS I) of *M. tuberculosis*. *Nature medicine*. 2000, vol. 6, no. 8, s. 1043-1047
- ¹⁶ JANIN, Y. L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, vol. 15, no. 7, s. 2479-2513
- ¹⁷ BUCHTA, VI.; JÍLEK, P.; HORAČEK, J.; HORÁK, VI. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 192 s.
- ¹⁸ HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.; ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 166 s.
- ¹⁹ LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 601 s.
- ²⁰ Konference o mikrobiologii a epidemiologii tuberkulózy a nespecifických plicních infekcí: 16.-18.10. 2002, Hradec Králové, Nové Adalbertinum: [sborník přednášek]., Hradec Králové, Nové Adalbertinum: [sborník přednášek]. 1. vyd. Hradec Králové: HK CREDIT spol. s.r.o., 2002. 39 s.
- ²¹ DUNCAN, K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* [online]. 2003, no. 1-3 [cit. 5.3.2007]. Dostupný z www: <<http://www.sciencedirect.com>>
- ²² MEYER, R. Tuberkulose: Multiresistenzen gefährden den Therapieerfolg. *PZ*. 1995, vol. 140, no. 1, s. 9-20

²³ TOMIOKA, H. Prospects for development of new antimycobacterial drugs. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2000, vol. 6, no. 1, s. 8-20

²⁴ Světová zdravotnická organizace – základní informace [online]. c2007 [31.3.2007]. Světová zdravotnická organizace. Dostupný z WWW: <<http://www.who.cz>>

²⁵ HOLČÍK, J. Zdraví 21. European health for all. [online]. c2000 [5.3.2007]. Světová zdravotnická organizace. Dostupný z WWW: <<http://www.who.cz/PDF/Zdraví21.pdf>>

²⁶ Světový den tuberkulózy. [online]. c2007 [5.3.2007]. Světová zdravotnická organizace. Dostupný z WWW: <http://www.who.cz/media_tbc.htm>

²⁷ ŠTEFLOVÁ, A.; TRNKA, L. Tisková zpráva: Světový den boje proti tuberkulóze 2007 [online]. c2007 [21.3.2007]. Světová zdravotnická organizace. Dostupný z WWW: <<http://www.who.cz/PDF/TiskovazpravaWTBDay2007.pdf>>

²⁸ ŠTEFLOVÁ, A.; TRNKA, L. Tisková zpráva: Světový den boje proti tuberkulóze 2006 [online]. c2006 [cit. 8.2.2007]. Světová zdravotnická organizace. Dostupný z WWW: <<http://www.who.cz/PDF/Tiskova%20zprava%20Svetovy%20den%20boje%20proti%20tuberkuloze%202006.pdf>>

²⁹ TAACF. [online]. c2004. TAACF, Alabama. [cit. 12.3.2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.taacf.org>>

³⁰ Tackling the TB Epidemic. [online]. c2004. TAACF, Alabama. [cit. 12.3.2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.taacf.org/about-TB-epidemic.htm#strategies>>

³¹ HAVELKOVÁ, M. Tuberkulóza [online]. c2004 [cit. 12.3.2007]. Státní zdravotní ústav: Národní referenční laboratoře. Dostupný z WWW: <<http://www.szu.cz/Menu1/verejnost/tuberkuloza.html>>

³² KUBÍN, M. Tuberkulóza – prevence a léčba [online]. c2003 [cit. 12.3.2007]. Zdraví a zdravotnictví: Zdravotní rádce. Dostupný z WWW: <<http://www.zdrav.cz/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=2255>>

³³ JÍLEK, P.; BUCHTA, VĚ.; KUBANOVÁ, P.; FÖRSTL, M. Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. s.

³⁴ HAVELKOVÁ, M.; MEZENSKÝ, L. Testování citlivosti *M. tuberculosis* na základní antituberkulotika. [online]. Státní zdravotní ústav: Centrum epidemiologie a mikrobiologie. 2003, no. 9 [cit. 24.3.2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.szu.cz/cem/zpravy/default.htm>>

³⁵ Kolektiv autorů. Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. Praha: Národní referenční laboratoř pro mykobakterie SZÚ, 1998. s.

³⁶ Mycobacteria Testing. [online]. c2007. Becton Dickinson, New Jersey. [cit. 24.3.2007]. Dostupný z WWW: <http://www.trios.cz/_sgg/m9m4_1.htm>

³⁷ Screening Assays: Submission and Screening Process Details. [online]. c2003. TAACF, Alabama. [cit. 12.3.2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.taacf.org/Process-text.htm#assays>>

³⁸ Project Progress. [online]. c2003. TAACF, Alabama. [cit. 12.3.2007]. Dostupný z WWW: <<http://www.taacf.org/project-progress.htm>>

³⁹ VINSOVA, J.; CERMAKOVA, K.; TOMECKOVA, A.; CECKOVA, M.; JAMPILEK, J.; CERMAK, P.; KUNES, J.; DOLEZAL, M.; STAUD, F. Synthesis and antimicrobial evaluation of new 2-substituted 5,7-di-tert-butylbenzoxazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006, vol. 14, no. 17, s. 5850-5865

⁴⁰ ZHANG, Y.; SCORPIO, A.; NIKAIDO, H.; ZHONGHE, S. Role of acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *M. tuberculosis* to Pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*. 1992, vol. 181, no. 7, s. 2044-2049

⁴¹ Gama katalog. [online]. c2007. Gama Group a. s., České Budějovice. [cit. 19.3.2007].
Dostupný z WWW: <<http://www.gama.cz/katalog/goods/mikrotitracni-desticka-p/>>

⁴² Current TB Drugs. [online]. c2003. TAACF, Alabama. [cit. 3.4.2007]. Dostupný z WWW:
<<http://www.taacf.org/about-TB-current-drugs.htm>>