UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.

Hradec Králové, 2007 **Petra Klusoňová**

Klíčová slova

Tuberkulóza TBC, *Mycobacterium tuberculosis*, Directly Observed Treatment Short-course DOTS, Multi Drug Resistance Tuberculosis MDR TB, pyrazinkarboxylová kyselina, Pyrazinamid, Rifampicin, Streptomycin, Isoniazid, Ethambutol, antituberkulotická aktivita

Keywords

Tuberculosis TBC, *Mycobacterium tuberculosis*, Directly Observed Treatment Short-course DOTS, Multi Drug Resistance Tuberculosis MDR TB, pyrazionic acid, Pyrazinamide, Rifampicin, Streptomycin, Isoniazid, Ethambutol, antituberculosis activity

Abstrakt

Název diplomové práce: **Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.**

V rámci diplomové práce byla provedena rešerše zaměřená na současný význam tuberkulózy ve světě a na nejnovější trendy v terapii. V chemické literatuře byly zjištěny metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Bylo syntetizováno, v chemické literatuře dvanáct dosud nepopsaných látek charakteru substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Všechny produkty byly charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ, ^{1}H, popř. ^{13}C NMR spektry. Série látek byla podrobena *in vitro* biologickému hodnocení. Práce přináší nové údaje o antimykobakteriální, antifungální aktivitě a výsledky testů herbicidní aktivity (testy inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu a testy redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*). Tyto výsledky jsou uvedeny v tabelární i grafické podobě. Jsou uvedeny i vypočtené hodnoty log *P* nově připravených látek. Autorka se pokusila zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek.

Abstract

Title of diploma thesis: **Pyrazine derivatives as potential drugs I.**

Review of actual worldwide problem of tuberculosis and trends in the tuberculosis treatment and chemical recherché were the parts of this work. Novel pyrazine derivatives connected via -CONH- bridge with substituted anilines were synthesized. The synthetic approach, analytical, spectroscopic, lipophilicity and biological data of twelve newly synthesized compounds were presented. All products were characterized and tested against *Mycobacterium tuberculosis* strain $H_{37}Rv$ and against eight fungal pathogen strains. Additionally, the study of inhibition of oxygen evolution rate in spinach chloroplasts and reduction of chlorophyll content in the green algae *Chlorella vulgaris* in the series of prepared compounds were drawn. Structure-activity relationships among the chemical structure, lipophilicity (log *P*), and their biological activity of the evaluated compounds were discussed as well.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce **doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.** za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Hradci Králové dne 14.5.2007 .....

Petra Klusoňová

Obsah

Cíl diplomové práce ..... **- 1 -**
1 Úvodní část ..... **- 2 -**
1.1 Tuberkulóza a její výskyt ..... - 2 -
1.2 Tuberkulóza ..... - 4 -
1.3 Terapie tuberkulózy ..... - 6 -
1.3.1 Vakcinace ..... - 7 -
1.3.2 Chemoterapie ..... - 8 -
1.4 Antituberkulotika ..... - 11 -
1.4.1 Antituberkulotika první linie ..... - 11 -
1.4.2 Další v terapii používaná antituberkulotika ..... - 16 -
1.4.3 Potenciální léčiva ..... - 23 -
2 Teoretická část ..... **- 30 -**
2.1 Vlastnosti pyrazinového jádra ..... - 30 -
2.2 Příprava *N*-oxidů pyrazinu ..... - 31 -
2.3 Halogenace pyrazinového jádra ..... - 32 -
2.4 Příprava acylhalogenidů ..... - 33 -
2.5 Příprava anilidů karboxylových kyselin ..... - 33 -
3 Experimentální část ..... **- 36 -**
3.1 Přístroje a chemikálie ..... - 36 -
3.2 Schéma prováděných reakcí ..... - 37 -
3.2.1 Výchozí struktury ..... - 37 -
3.2.2 Příprava vlastních anilidů ..... - 37 -
3.3 Příprava pyrazinkarboxylové kyseliny ..... - 38 -
3.4 Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 38 -
3.5 Příprava 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 39 -
3.6 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 39 -
3.6.1 Příprava chloridů pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 39 -
3.6.2 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 40 -
3.7 Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky ..... - 40 -
3.7.1 (3-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 40 -
3.7.2 (4-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 41 -
3.7.3 (2-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 42 -
3.7.4 (3-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 42 -
3.7.5 (4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 43 -
3.7.6 (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny - 44 -
3.7.7 (3,4-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 44 -
3.7.8 (3-hydroxy-6-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 45 -
3.7.9 anilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 46 -
3.7.10 (2-fluorfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 46 -
3.7.11 (3-fluorfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 47 -
3.7.12 (3-bromfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny ..... - 47 -
4 Biologické hodnocení ..... **- 49 -**
4.1 Antituberkulotická aktivita ..... - 49 -
4.2 Antimykotická aktivita ..... - 49 -
4.3 Herbicidní aktivita ..... - 51 -
4.3.1 Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastu špenátu ..... - 51 -
4.3.2 Testování redukce obsahu chlorofylu v Chlorella vulgaris ..... - 51 -

5 Diskuze ..... **- 52 -**
6 Závěr ..... **- 55 -**
Literatura ..... **- 56 -**

Cíl diplomové práce

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem. Doplňkově je u nově připravených látek zjišťována jejich schopnost inhibovat fotosyntézu. Tato diplomová práce je dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry.

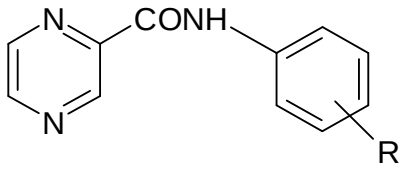
Cílem diplomové práce je pokusit se připravit biologicky (tj. antifungálně a především antimykobakteriálně) aktivní deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny.

Konkrétními úkoly bylo:

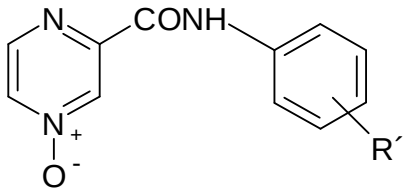
1. Provést rešerši zaměřenou především na současný význam tuberkulózy ve světě, trendy v terapii a potenciální antituberkulotika.
2. V dostupné chemické literatuře zjistit metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravit substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny, ve kterých je připojený aromatický kruh v různých polohách substituován různými substituenty.
4. Vypočítat log *P* nově připravených derivátů.
5. Zjistit vliv substituce připojeného benzenového jádra na log *P*.
6. Zjistit vztah mezi strukturou, biologickým účinkem (antituberkulózní, antimykotická, herbicidní aktivita) a lipofilitou v sérii připravených látek.

Obecné vzorce připravovaných látek:

R = H
3-F, 4-F
3,4-Cl, 3-OH-6-Cl
2-Br, 3-Br, 4-Br



R´ =2-F, 3-F
3-Br

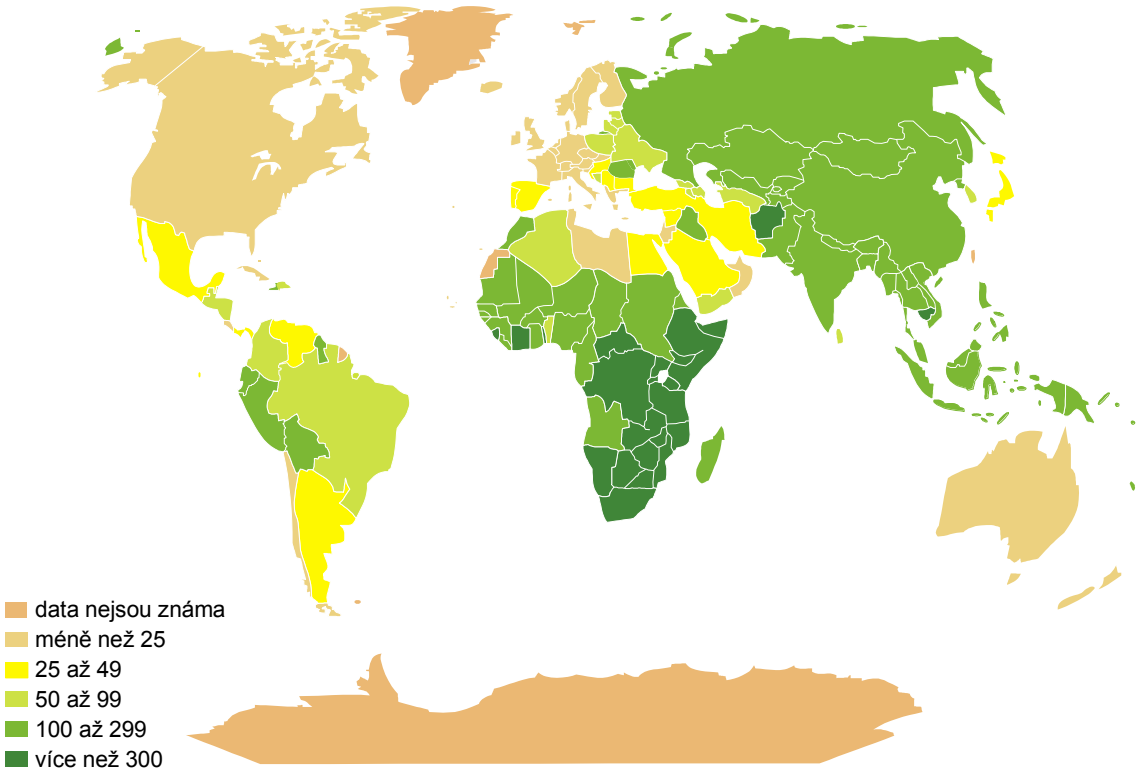


1 Úvodní část

1.1 Tuberkulóza a její výskyt

Tuberkulóza (TBC) je chronické infekční onemocnění, které nejčastěji postihuje dýchací systém. Etiologickým vyvolavatelem je ***Mycobacterium tuberculosis***. Světová zdravotnická organizace (***World Health Organization*** **WHO**) považuje tuberkulózu za „globální ohrožení“ [1], a patří mezi nejrozšířenější infekční onemocnění, kterým je nakažena přibližně třetina světové populace. Na základě výzkumu WHO celosvětově touto chorobou ročně onemocní přibližně 8 miliónů osob, u nichž se vyvine aktivní otevřená forma tuberkulózy, přičemž více než 2 milióny lidí zemřou na následky tohoto onemocnění [1], [2].

Hlavním problémem z hlediska šíření TBC jsou špatné sociální podmínky lidí žijící v rozvojových zemích, odkud pochází přibližně 95 % nových případů této infekce. Mezi nejvíce postižené oblasti patří především jihovýchodní Asie, subsaharská Afrika, oblast bývalého Sovětského svazu a také jižní Amerika. Mapa na obr. 1.1 poukazuje na

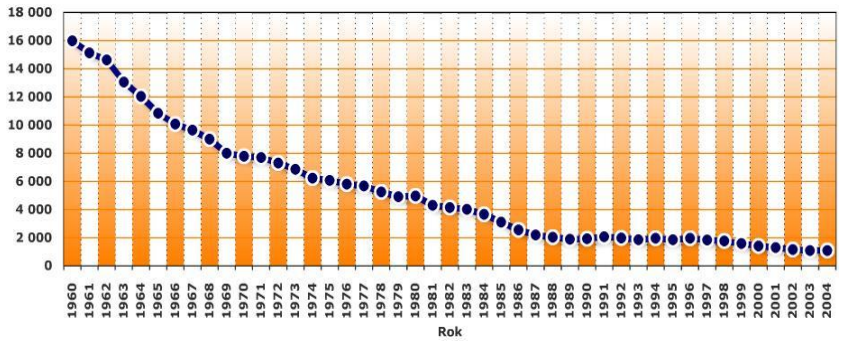


Obr. 1.1 Incidence TBC ve světě vztažená na 100 tisíc obyvatel

incidenci TBC ve světě. Právě v oblastech, které jsou znázorněny tmavě zelenou barvou je vysoký výskyt (incidence) onemocnění TBC z důvodů vysoké hustoty obyvatel, špatné stravy, nedostatku léků, nízké sociální úrovně a oslabeného imunitního systému. Zjistilo se, že ve všech oblastech světa existují nemalé skupiny obyvatel s oslabenou buněčnou imunitou, u nichž je vyšší pravděpodobnost vzniku onemocnění. Mezi tyto rizikové skupiny zahrnujeme osoby se sníženou imunitou buněčného typu pro vysoký věk, pro závažná onemocnění typu AIDS, pro léčbu imunosupresivy a cytostatiky, zářením, ale také sociální skupiny narkomanů, alkoholiků, bezdomovců a přistěhovalců ze zemí třetího světa a nezaměstnaní [2].

Právě šíření TBC společně s HIV infekcí představuje hlavně na africkém kontinentě smrtící kombinaci. Počet pacientů současně infikovaných tuberkulózou a virem lidské imunodeficience (***H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus* **HIV**) je odhadován WHO na 4,5 miliónu [1]. TBC je jeden z hlavních problémů vysoké úmrtnosti HIV pacientů, kdy jedna nemoc urychluje progresi druhé. Podle WHO 90 % takto nakažených lidí umírá do několika měsíců po projevení prvních klinických příznaků TBC [3].

V České republice je situace v počtu nově hlášených případů tuberkulózy v posledních pěti letech příznivá a má pozvolna klesající tendenci (obr. 1.2) [4]. V roce 2005 bylo nahlášeno 1007 nových případů TBC, incidence je 10/100 000 obyvatel. Z tohoto počtu u 83 % nemocných byla zjištěna tuberkulóza dýchacího ústrojí, mimoplicní TBC tvořila 17 % [1].

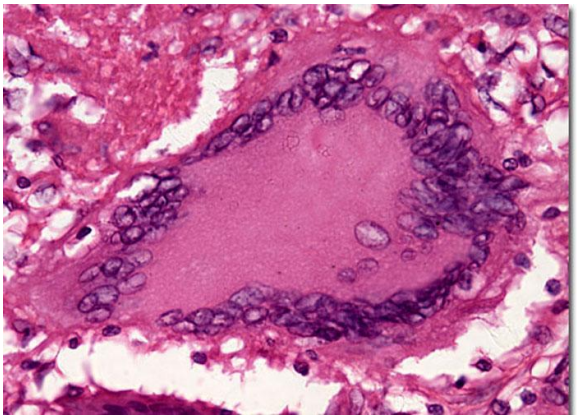


Obr. 1.2 Incidence: TBC v České republice
(absolutní kumulativní nemocnost)

1.2 Tuberkulóza

Hlavního původce onemocnění *Mycobacterium tuberculosis* popsal v roce 1882 Robert Koch (1842-1910), odtud název Kochův bacil. Název onemocnění je odvozen od latinského slova *tuberculosum* (uzlíček). *M. tuberculosis* (obr. 1.3) je patogenní, aerobní, nesporolující, nepohyblivá, grampozitivní, acidorezistentní tyčka o velikosti 0,3-1,5 μm. [5].

Vedle hlavního původce onemocnění – *M. tuberculosis,* jsou známa také tzv. „atypická“ mykobakteria jako je *M. kansasii, M. avium intracellulare, M. ulcerans,* která mohou být oportunními patogeny. Mykobakterie se odlišují od ostatních mikroorganismů především silnou buněčnou stěnou, která obsahuje vysoký podíl lipidních látek (tuků a vosků) a díky tomu mají hydrofóbní charakter. Mykobakterie mají dlouhou generační dobu (48 h), jedná se o fakultativně intracelulární parazity a jsou schopny perzistence [2]. Kromě obvyklých složek buněčné stěny, jako jsou lipidová dvojvrstva, peptidoglykan, obsahuje jejich buněčná stěna navíc vrstvu tvořenou dalšími polysacharidy, acyllipidy a mykolovými kyselinami, které jsou kovalentní vazbou spojeny do arabinogalaktanů a tvoří mykobakteriální silnostěnný komplex. Ty znesnadňují průnik léčiva do mykobakterií. Právě díky vyjímečné stavbě této buněčné stěny, je léčba TBC velmi obtížná [2], [6], [7].



Obr. 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulóza se šíří především kapénkovým přenosem z člověka vylučujícího tuberkulózní bacily. Do prostředí se mykobakterie dostanou kýcháním, kašláním, křikem a zpěvem pacienta s aktivní otevřenou formou TBC. Po inhalaci bacilů dojde k jejich usazení v plicní tkáni, především v bronších, alveolech a obvykle i v hrotu plíce. Po namnožení inhalovaných bacilů tělo reaguje aktivací imunitního systému tím, že dojde k imunitní reakci zprostředkované buňkami a vede ke tvorbě specifických T-lymfocytů. Následky tuberkulózní infekce pro organismus závisí na množství

a virulenci mykobakterií, na opakovaní styku s infekčním zdrojem, na stavu imunitního systému infikovaného jedince [6].

Podle lokalizace se TBC rozděluje na TBC dýchacího systému, která představuje zhruba 80 % případů a TBC mimoplicní okolo 20 %, kde jsou zasaženy hlavně mízní uzliny, kosti, klouby atd.

Po styku s infekcí může organismus reagovat trojím způsobem:

1/ organismus není infikován;
2/ organismus je infikován,ale nedochází k manifestnímu onemocnění;
3/ propukne manifestní onemocnění. Příčinou může být velké množství a vysoká virulence bakterií, nebo nedostatečný stupeň imunity.

Manifestní onemocnění dělíme na primární a postprimární.

Primární tuberkulóza, tzv. primoinfekce, která vzniká při prvním kontaktu člověka s tuberkulózní infekcí. Základním znakem je postižení regionálních uzlin, hlavně plicní tkáně, které odpovídají místu průniku mykobakterií do organismu. Mykobakterie se kumulují v makrofázích a mohou vytvářet tzv. tuberkulózní uzlíky. Primoinfekční tuberkulóza zpravidla probíhá pod nespecifickými příznaky (např. zvýšenou teplotou, nechutenstvím, snížením celkové aktivity) a ve většině případů dojde ke spontánnímu vyhojení. Tento typ je nejčastější v dětském věku v případě dospělých mluvíme o „pozdní primoinfekci“.

Postprimární tuberkulóza vzniká u osob, které prodělaly primární TBC. Může vznikat přímým přechodem z primární formy. Další možností, která je nejčastější je *endogenní reaktivací* mykobakterií, které mají dlouhou generační dobu a jsou schopny v dormantním - spícím stavu, přežívat řadu let. Jedná se o zbytková ložiska (odumřelé části tkáně), která se opouzdří a dochází zde k ukládání vápenatých solí (tzv. kalcifikace). Při nepříznivém vývoji tato nekróza zkapalní (kolikvuje) a může vzniknout chorobná dutina, tzv. kaverna, s možností dalšího šíření infekce a zánětu. Postupné šíření TBC v plících s četnými rozpady může vést ke krvácení a vykašlávání krve. Ke vzplanutí onemocnění může dojít díky nepříznivým podmínkám, kterými mohou být vysoký věk, alkoholismus, oslabení imunitního systému léčbou, zářením či jinými chorobami nebo v důsledku špatných sociálních a životních podmínek, kdy dojde k uvolnění mykobakterií ze starého kalcifikovaného ložiska [1]. Mykobaterie uvolněné z tuberkulózních ložisek či z makrofágů cirkulují lymfatickým a krevním systémem do

různých částí těla a infikují především retikuloendoteliární systém (slezinu, játra, lymfatické uzliny) a serózní bohatě prokrvené orgány (plíce, epifýzy rostoucích kostí, ledviny). Tím v celém organismu vznikají malé tuberkulózní uzlíčky. Tomuto typu infekce říkáme akutní miliární tuberkulóza [6]. Méně častým způsobem vzniku postprimární TBC je tzv. *exogenní superinfekce*, kdy dojde k masivní expozici mykobakterií s následným vyvoláním onemocnění u člověka, který již TBC prodělal. Z tohoto hlediska jsou v největším riziku osoby v blízkém a dlouhodobém kontaktu s nemocnou osobou. Mezi primární a postprimární TBC existuje určitý časový odstup a podle toho rozlišujeme časnou a pozdní postprimární formu.

A/ Časná postprimární forma vzniká do 1 roku. Patří mezi ně např. tuberkulózní meningitida, meningoencefalitida, exsudativní pleuritida a akutní miliární tuberkulóza.

B/ Pozdní postprimární forma postihuje hlavně kosti a klouby do 1-2 let po primoinfekci, za 3 roky od primoinfekce dochází k postižení močových cest a genitálního systému a za 10 a více let jsou zasaženy i ledviny [2].

Základním krokem pro stanovení diagnózy tuberkulózy je bakteriologický průkaz vyvolávajícího mykobakteria ve sputu pacienta. Dále rentgenové vyšetření plic. Mezi pomocné diagnostické metody patří tuberkulinový test. Tuberkulin je očištěná bílkovina z bakteriích způsobující TBC. Tuberkulin se vstřikuje do kůže a následně se posuzuje reakce (tuberkulinová zkouška, zkouška dle Mantouxa), která umožňuje zjistit zda se nemocný setkal s TBC a to včetně očkování, popřípadě umožňuje zjistit buněčnou imunitu. Tato metoda je pouze orientační. Další pomocné vyšetřovací metody bronchoskopie, bronchografie, hrudní punkce a pomocná laboratorní vyšetření PCR (polymerázová řetězová reakce), genetické sondy, vyšetření moči, krve, imunologické vyšetření jsou metody, které mohou napomoci k určení TBC.

1.3 Terapie tuberkulózy

Po stanovení diagnózy musí být každý pacient léčen po dobu několika týdnů na lůžkovém oddělení plicní kliniky nebo v léčebně specializované na plicní onemocnění a terapii TBC (v ČR např. v Jevíčku). Toto období je pro pacienta velmi náročné a zdlouhavé, protože TBC je sice onemocnění léčitelné, ale vyžaduje trpělivost pacienta a jeho spolupráci s ošetřujícím personálem [8]. Bohužel v dnešní době se zvyšuje počet pacientů, u kterých došlo ke vzniku rezistence na dosud používaná antituberkulotika.

Od objevení TBC se postupně začaly používat tři základní přístupy získání kontroly nad TBC:

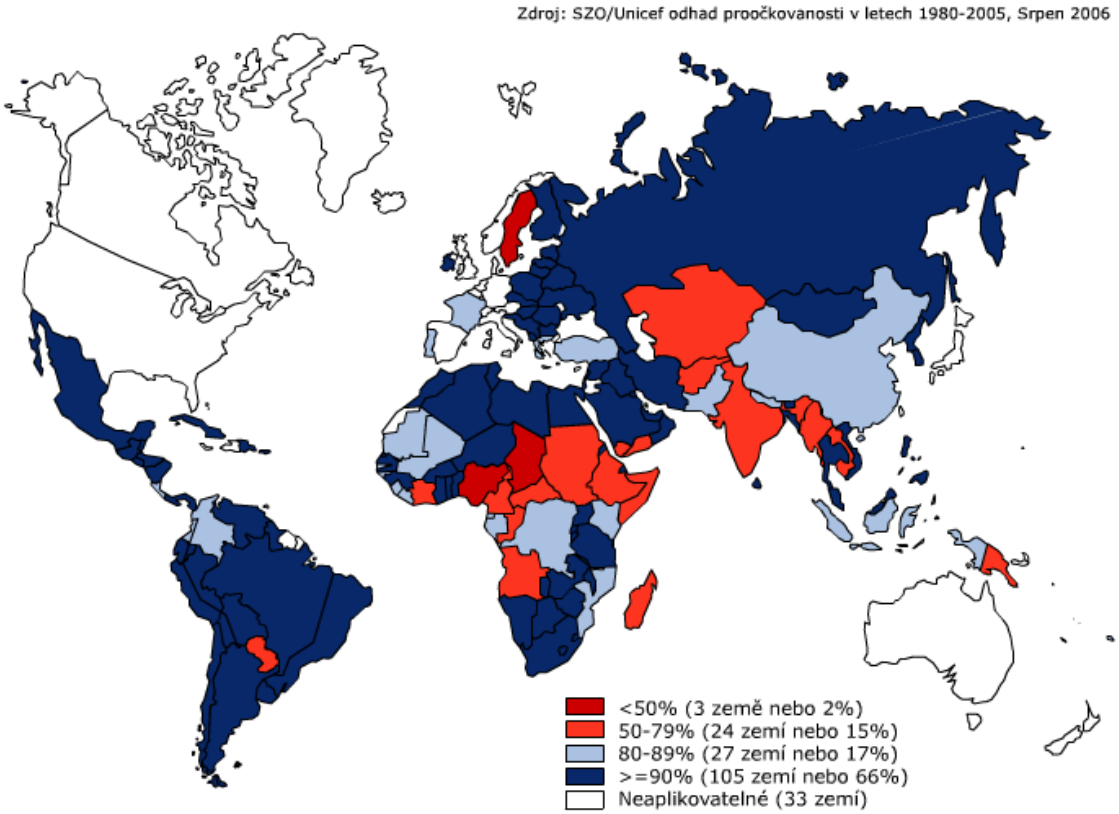
- sanatorium s čerstvým vzduchem, výživnou stravou a vysokou čistotou prostředí, klid na lůžku;
- vakcinace;
- chemoterapie.

1.3.1 Vakcinace

Očkování proti TBC se provádí výhradně monovakcínou, přičemž jich existuje několik typů. Nejčastější používanou vakcínou je BCG (*Bacillus-Calmette-Guerin*). BCG vakcína pochází z roku 1921, kdy byla připravena francouzskými bakteriology Calmettem a Guérinem, jednalo se o první vakcínu obsahující oslabený kmen *Mycobacterium. bovis*. Tento kmen byl nazván jako bacil Calmettův - Guérinův (BCG) a očkování proti TBC kalmetizací [2].

Očkovací látku tvoří avirulentní lyofilizát bakteriálních zárodků kmene *M. bovis,* které se získávají pomnožením vhodného atenuovaného (oslabeného) kmene (např. Copenhagen) na umělém kultivačním médiu. V České republice se používá tzv. silný kmen Dánský 1331 (Copenhagen) a Francouzský 1773 P2 (Pasteur). Primární imunizace je prováděna podáním jedné vakcinační dávky BCG nejdříve mezi čtvrtým dnem po narození až do šesti týdnů u novorozenců a pro imunizaci všech osob, které jsou tuberkulin-negativní a mohou být vystaveny zvýšenému výskytu této nákazy [4]. Všichni novorozenci se očkují bez provádění tuberkulínové zkoušky. Boosterující (posilující) imunizace se provádí tehdy, byl-li zjištěn **negativní výsledek tuberkulínové zkoušky**. Tato zkouška se povinně provádí zpravidla ve 2. až 3. roce po dokončení ostatních základních očkování a případně v 11. roce u těch dětí, u nichž nebyla prokazatelně vytvořena jizvička po očkování v novorozeneckém věku, se provede revakcinace [8]. V České republice je očkování proti TBC od roku 1994 povinné a je řízeno příslušnými vyhláškami.

BCG vakcína nesnižuje riziko onemocnění TBC, ale její ochranný mechanismus spočívá ve snížení rozsevu mykobakterií z místa primoinfekce, takže má zabránit hlavně vzniku generalizovaných forem TBC (postižení více orgánů současně). Dále se předpokládá, že vakcína vyvolá imunitu, která zabrání příchodu následných infekcí [2].



Obr. 1.4 Proočkovanost proti TBC ve světě

U dětí je hlavně velmi účinná proti meningitivní formě TBC, ale neochrání je před plicní TBC [6]. Proočkovanost světové populace je zobrazena na obr. 1.4.

Ve světě je BCG-vakcinace doporučována následujícím rizikovým skupinám:

- kojenci, děti, které žijí v oblastech s vysokým rizikem nákazy TBC;
- děti s cíleně vyřazeným imunitním systémem, např. leukémie;
- sourozenci a rodiče uvedených osob;
- osoby pracující ve zdravotnictví a v zařízeních pečující o děti.

Dalšími možnostmi vakcinace je použití oslabených virů *M. tuberculosis*, které vznikají buď genomovými obměnami, tzv. manipulací s chromozomy mykobakterií nebo vakcíny tvořené podjednotkami mykobakteriálních proteinů či pouze „obnaženou nukleovou kyselinou DNA“, která se ukazuje jako vysoce účinná, ale zatím pouze v laboratorních experimentech TBC [6].

1.3.2 Chemoterapie

Po objevení původce onemocnění bylo cílem objevit účinné léčebné prostředky. Do této doby používané podávání vitamínů, klimatická léčba a klid na lůžku nebyly

dostačujícími. Léčba sice zpomalovala průběh onemocnění, ale i přes veškerou snahu mnohdy končila smrtelně. Velký zvrat nastal až ke konci 2. světové války, kdy došlo k objevení tří antituberkulotik v krátkém časovém sledu (1944 streptomycin, 1946 kyselina paraaminosalicylová, 1952 využití antimikrobiálního účinku kyseliny isonikotinové). Počátek účinné antituberkulotické léčby se datuje od padesátých let 20. století. Postupně byly formulovány principy používání těchto látek (podávání v kombinaci, rozlišení fáze léčby) včetně principů vyhledávání nově nakažených pacientů [2].

Nedostatečná znalost biochemických pochodů mykobakterií a mechanismu účinku léčiv, vedla k rozsáhlému screeningu celých knihoven sloučenin, které budou potřebné proti tak závažnému onemocnění jakým je právě TBC. Cílem antituberkuloticky účinných léčiv jsou biochemické pochody, kterými jsou syntetizovány makromolekuly - bílkoviny (streptomycin), nukleové kyseliny (PAS) a nebo biopolymery buněčné stěny. DNA-topoizomeráza a nebo isocitrátlyáza jsou důležité enzymy mykobakterií, které představují další důležité místo zásahu nových antituberkulotik [6].

WHO v devadesátých letech vypracovala moderní strategii léčby TBC, která je celosvětově zaváděna do praxe. Spočívá ve standardizovaných krátkodobých chemoterapeutických režimech aplikovaných za individuální péče o každého nemocného tzv. (***D**irectly **O**bserved **T**reatment **S**hort-course* **DOTS**). Jedná se o účinný TBC program, kterým je možné snížit nemocnost a má vyléčit alespoň 85 % nemocných [2]. DOTS je hlavně určena pro rozvojové státy s vysokým výskytem TBC (obr. 1.1). V dnešní době je do tohoto programu zapojeno přes 180 zemí. Snahou DOTS je vyšetřit každého člověka s příznaky, které poukazují na TBC, zabezpečit pravidelnou a nepřerušovanou léčbu vysoce kvalitními léčivy, zajistit 6-8 měsíční léčbu pod pravidelným dohledem a s kontrolou užívaných léčiv, včetně sledování dodržování compliance, a pravidelného vyšetřování sputa pacienta [6]. Základem léčby zůstávají po léta používaná léčiva s baktericidními (usmrcují dělící se bakterie) a sterilizačními vlastnostmi (zabíjejí persistory), se schopností zabránit vzniku rezistence mykobakterií [2].

Léčba TBC se řídí doporučením WHO a pacienti jsou zařazeni do jedné ze čtyř kategorií dle charakteru a rozsahu onemocnění. Mezi antituberkulotika tzv. první linie

patří pět základních léčiv. Jedná se o rifampicin (RMP), isoniazid (INH), ethambutol (EMP), pyrazinamid (PZA) a streptomycin (STM). Léčba je rozdělena na :

- **iniciální** - zpravidla dvouměsíční fáze s aplikací 4 až 5 antituberkulotik, která probíhá za hospitalizace pacienta (např. isoniazid + rifampicin + pyrazinamid + streptomycin popř. ještě kombinace s ethambutolem). Jejím cílem je rychlá eliminace aktivně se množících mykobakterií v zánětlivých ložiscích, ale i ty, které se vyskytují mimo makrofágy v orgánech postižených touto chorobou [1]. V této fázi je vždy nutné léčiva kombinovat, aby se přešlo riziku vzniku rezistence [6].
- **pokračovací** - ambulantní fáze, kdy nemocný užívá 2 až 3 léky z první linie nejčastěji po dobu 4 měsíců s cílem mykobakterie neutralizovat, podle závažnosti onemocnění denně nebo intermitentně (isoniazid a rifampicin). Léčiva pomalu eliminují mykobakterie přežívající v uzavřených kaseózních kavernách nebo uvnitř makrofágů [2], [6].

Aby se předešlo riziku vzniku lékové rezistence nesprávným podáváním antituberkulotik, je léčba přímo kontrolována v jednorázové aplikaci, tím se také sníží dávky jednotlivých léčiv a riziko výskytu nežádoucích či toxických účinků. Po zjištění TBC a jeho bakteriálního ověření se provádí tzv. identifikace vyvolávajícího kmene s následným testem citlivosti na podávaná antituberkulotika první linie. Pokud se zjistí rezistence kmene na jedno ze základních antituberkulotik, hovoří se o monorezistenci. Při rezistenci na více léčiv kromě isoniazidu a rifampicinu, se jedná o polyrezistenci. V těchto případech je léčba převedena na antituberkulotika první linie se zachovalou citlivostí a případně rozšířena o citlivé antibiotikum (ze skupiny makrolidových ATB, aminoglykosidových ATB) [1]. Multirezistentní tuberkulóza (***M**ulti **D**rug **R**esistance **Tu**berculosis* **MDR TB**) je nejzávažnější formou TBC. Je charakterizována rezistencí vyvolavatele onemocnění *M. tuberculosis* minimálně na dva nejúčinnější léky isoniazid a rifampicin. Léčba takto nakažených pacientů je náročná hlavně v tom, že počet antituberkulotik, která lze v tomto případě použít, je velmi malý a každý pacient je léčen v tzv. individuálním léčebném režimu za použití několika přípravků, které bohužel nejsou v České republice registrované (klofazimin, cykloserin, kapreomycin). Ve většině případů se jedná o rozsáhlé nálezy při aktivní formě onemocnění s masivním vylučováním bacilů detekovatelných již při mikroskopickém vyšetření. Tím se pacient

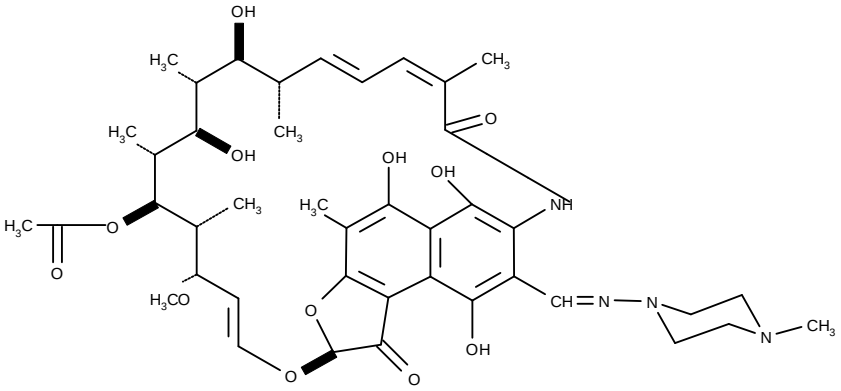
stává závažným infekčním rizikem pro sebe, ale zároveň i pro své okolí a zdravotnický personál. Tato onemocnění vyžadují dokonalou a několik měsíců trvající, ale zároveň přijatelnou formu izolace s adekvátním sociálním zázemím [1]. Právě WHO se snaží DOTS programy snížit šíření TBC, kdy je hlavní důraz kladen právě na vyhledávání a hlavně na úplné vyléčení (za důsledného sledování terapie) nemocných.

1.4 Antituberkulotika

1.4.1 Antituberkulotika první linie

Níže popsané účinné látky představují hlavní antituberkulotika, která se dnes standardně používají k léčbě TBC. Skupinu antituberkulotik tvoří jednak skupina antibiotik, kam zahrnujeme rifampicin (RMP), streptomycin (STM), kapreomycin a cykloserin. A dále skupina chemoterapeutik, k nimž se řadí isoniazid (INH), ethambutol (EMP), pyrazimamid (PZA) a kyselina para-aminosalicylová (PAS) [9].

Rifampicin



Charakteristika:

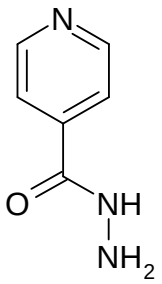
Rifampicin (RMP) je polosyntetické ansamycinové antibiotikum (ATB) úzkého terapeutického spektra s bakteriostatickým, ve vyšších dávkách baktericidním účinkem [9]. Je odvozené od rifamycinu B, pocházejícího z kultur *Streptomyces mediterrani*. Indikován je nejen v léčbě TBC, ale působí velmi dobře i na atypická mykobakteria, např. *M. leprae* ale i v dalších, především stafylokokových infekcí jejichž hlavním původcem je např. *Staphylococcus aureus*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální RNA-polymerazy a tím se inhibuje syntéza RNA v bakteriích [10]. Patří

mezi nejúčinnější ATB s účinkem na rychle i pomalu se množící mykobakteria (včetně *M. leprae*). Rifampicin působí baktericidně na dělící se i na klidová stádia onemocnění. Lipofilní vlastnosti molekuly jsou důležité pro navázání léčiva na RNA-polymerazu, ale napomáhají i transportu léčiv přes mykobakteriální buněčnou stěnu [6]. Rezistence, zkřížená s ostatními rifampiciny vzniká bohužel rychle (streptomycinový typ). Rifampicin se po perorálním podání dobře absorbuje, lépe nalačno. Pacienta je třeba upozornit na nežádoucí účinky při léčbě, jako je hepatitita, trombocytopenie, GIT obtíže a oranžové zbarvení slin, moče, potu a slz [10].

Použití:

Rifampicin patří mezi nejvýznamnější antituberkulotika, je rezervován prioritně na terapii TBC, v další řadě pak na atypická mykobakteria (lepra) a stafylokokové infekce. Používá se v kombinaci s jinými léčivy, aby se předešlo vysokému riziku rezistence, a to především s isoniazidem (INH), ethambutolem (EMB) k léčbě všech forem a stádií TBC [6], [9].

Isoniazid



Charakteristika:

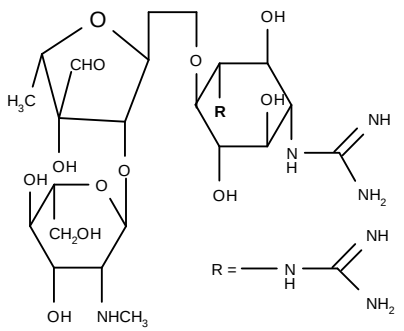
Isoniazid (INH), hydrazid kyseliny isonikotinové, působí selektivně a baktericidně na extra - a intracelulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*. Na klidová stádia působí bakteriostaticky [9]. Jedná se o proléčivo, které ke své aktivaci a tím získání antituberkulotického účinku potřebuje aktivovanou mykobakteriální katalazu. Tento enzym určuje citlivost *M. tuberculosis* k isoniazidu [6]. Po perorálním podání nalačno se isoniazid rychle a skoro úplně vstřebává. Dobře proniká i do mozkomíšního moku [10]. Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy mykolových kyselin buněčné stěny, tak, že napadá enzym mykolátsyntetazu, který je specifický pro mykobakterie a důležitý pro biosyntézu mastných kyselin mykobakterií [6], [7]. Pacienta je nutné

upozornit na nežádoucí účinky, které jsou především alergického charakteru, dále neurotoxicita, která je vysvětlována tím, že isoniazid vede k deficitu pyridoxinu (vit. B_6) a proto je pyridoxin při léčbě isoniazidem preventivně podáván. Dále hepatotoxicita a vyjímečně poruchy krvetvorby (anémie, trombocytopenie, leukopenie) [9], [10].

Použití:

Isoniazid je indikován k léčbě TBC způsobené *M. tuberculosis*, ale je účinný i na klidová stádia *M. bovis, M. africanum, M. microti*. Používá se především v kombinaci s jinými antituberkulotiky, v prvé řadě s rifampicinem, etambutolem hlavně kvůli vzniku rezistence, pouze při profylaxi se vystačí s monoterapií [9].

Streptomycin



Charakteristika:

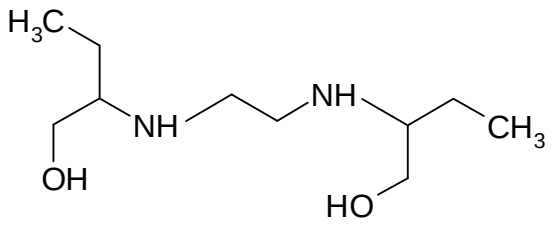
Streptomycin (STM) je aminoglykosidové baktericidní antibiotikum izolované ze *Streptomyces griseus*, které se skládá ze tří komponent – streptidinu, streptózy a N-methyl-L-glukosaminu [9]. Jedná se o první léčivo, které se v boji proti TBC začalo vůbec kdy používat a dnes je indikován pouze v terapii TBC. Působí baktericidně na extracelulárně uložená mykobakteria. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30S. Aplikace je dnes pouze parenterálně-intramuskulárně (i.m.) a vyjímečně i intrathekálně (lumbální punkce v bederní oblasti páteře [11]). Mezi hlavní nežádoucí účinky patří poškození VIII. hlavového nervu, nefrotoxicita, agranulocytóza, trombocytopenie a neutropenie [10].

Použití:

Streptomycin měl původně široké spektrum účinků a byl v minulosti hojně používán. Dnes pouze výhradně jako antituberkulotikum. Díky velmi rychlému rozvoji rezistence

původců onemocnění, je používán převážně v kombinaci s dalšími antituberkulotiky. Streptomycin má úzkou terapeutickou šíři, proto musí být dávkován velmi přesně a v dnešní době obzvláště pro své nežádoucí účinky není příliš často používán [9].

Ethambutol



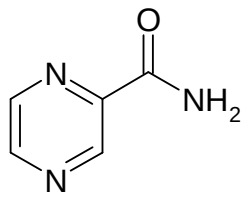
Charakteristika:

Ethambutol (EMP) je chemoterapeutikum působící bakteriostaticky na aktivně rostoucí různé kmeny mykobakterií. Chemicky se jedná o syntetický aminoalkohol (ethylendiamino-di-1-butanol) účinný po perorálním podání, který se velmi dobře vstřebává. Mechanismus účinku pravděpodobně spočívá v inhibici syntézy bílkovin a nukleových kyselin proto je označován jako antimetabolit a tím poškozuje metabolismus mykobakterií. Aktivita léčiva je stereospecifická, pravotočivý stereoizomer je nejaktivnější (*S*,*S*-izomer je 600krát účinnější než *R*,*R*). Hlavní součástí buněčné stěny mykobakterií je polysacharid, který je tvořený arabinózou a galaktózou, které se chovají jako intermediátní vazby, vytvářející lešení mezi mnoha typy mykolových kyselin a vnitřku peptidoglykanu [7]. Nedávné studie ukázaly, že arabinosyltransferaza III. je zodpovědná za polymeraci arabinózy na arabinany a dále pak na arabinogalaktany, které jsou nutné k syntéze buněčné stěny mykobakterií. Tento objev je považován za primární cíl léčby TBC [6], [9]. Z nežádoucích účinků je nejzávažnější retrobulbární neuritida s poruchou vnímání zelené barvy (vyžaduje oftalmologické kontroly během léčby). Zhoršení zrakové ostrosti a další oční komplikace mohou být i ireverzibilní a jejich výskyt je závislý na podané dávce [9].

Použití:

Ethambutol je používán v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Při použití rifampicinu a isoniazidu dochází k příznivému doplnění účinku. Indikací ethambutolu je kombinační léčba plicní tuberkulózy, zejména s isoniazidem, streptomycinem při intoleranci antituberkulotik první linie či rezistenci nebo hypersenzitivitě k těmto přípravkům [9].

Pyrazinamid



Charakteristika:

Pyrazinamid (PZA - amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny), chemoterapeutikum používané od roku 1985, je považováno za třetí nejdůležitější antituberkulotikum s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem na *M. tuberculosis* v závislosti na koncentraci v místě infekce. Je aktivní v kyselém pH kaseózních ložisek [11]. Pouze v kyselém pH dochází k hromadění pyrazinkarboxylové kyseliny, aktivní formy pyrazinamidu. Je velmi účinný na spící a stará nerostoucí mykobakteria v intracelulárním prostoru makrofágů, kam nepronikne rifampicin a ani isoniazid. Pro zvýšení efektu a snížení doby trvání léčby na 6 měsíců je vhodná právě kombinace isoniazidu, rifampicinu s pyrazinamidem.

Mechanismus účinku je na rozdíl od ostatních antituberkulotik méně znám. Pyrazinamid je proléčivo, které je bakteriální nikotinamidasou/pyrazinamidasou přeměněn na aktivní pyrazinkarboxylovou kyselinu. Přirozeně rezistentní *M. smegmatis* má vysokou schopnost rychle vylučovat pyrazinkarboxylovou kyselinu z buňky ven. Naproti tomu *M. tuberculosis* se vyznačuje vysokou vnímavostí vůči pyrazinamidu, neboť postrádá eflux pyrazinkarboxylové kyseliny. Za přítomnosti pyrazinkarboxylové kyseliny je v kyselém prostředí významně redukován uptake uracilu a methioninu, čímž dochází ke snížení syntézy RNA a proteinů. Inhibicí syntézy RNA, proteinů a uptake serinu dochází k narušení membránového potenciálu, který je nezbytný pro membránový transport. Cílovým místem působení pyrazinamidu a pyrazinkarboxylové kyseliny je tedy buněčná membrána, ve které dojde k narušení její funkce a membránového transportu. Kyselé pH je nezbytné pro aktivitu pyrazinamidu, jelikož usnadňuje vytváření protonizované pyrazinkarboxylové kyseliny a její průnik skrz membránu a následnou kumulaci aniontů a kationtů kyseliny uvnitř buňky. Ve vědeckém časopise „*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*“ [12] byla uvedena studie popisující další význam kyselého pH, které potencuje účinek pyrazinamidu a jeho schopnost snižovat membránový potenciál v jiných bakteriích. Tento fakt nebyl v kontextu

s pyrazinamidem dříve pozorován, až do té doby než bylo poukázáno na schopnost pyrazinamidu snižovat membránový potenciál. Pyrazinamid zkracuje dobu terapie TBC tím, že je schopen zabíjet nereplikující „polospící“ mykobakterie v kyselém prostředí. Staré nebo „polospící“ mykobakterie nemají aktivní metabolismus a ztrácejí zásoby energie, tím dochází ke snižování membránového potenciálu. Nízký membránový potenciál ve starých a nereplikujících mykobakterií spolu s deficitem mechanismu efluxu pyrazinkarboxylové kyseliny a dále s relativně nízkou schopností udržovat membránový potenciál vytváří slabinu pro atak pyrazinkarboxylovou kyselinou v kyselém prostředí. Mykobakteria pak zanikají na základě poškození membránového potenciálu, nikoliv na pH gradient. Membránový potenciál je nutný pro syntézu ATP F_1F_0ATPasou. Výsledkem je pokles syntézy ATP ve starých a spících mykobakteriích, které mají samotné již nízkou zásobu energie [6], [12], [13].

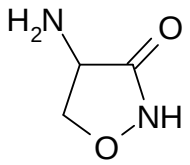
Pyrazinamid je po perorálním podání velmi dobře absorbován z trávícího ústrojí. Proniká do různých tkání a tělních tekutin, včetně plic, jater a mozkomíšního moku. Mezi nežádoucí účinky patří především hepatotoxicita, výskyt dny, porfyrie, léková horečka. Dále může způsobit nauzeu, zvracení, bolesti hlavy a žaludku, nespavost, závratě a kožní alergické projevy [9].

Použití:

Pyrazinamid se používá v kombinaci s jinými antituberkulotiky v iniciální fázi léčby TBC, která je zpravidla dvouměsíční (RMP, STM, INH, EMP), u nichž selhala iniciální léčba jinými antituberkulotiky .Jeho podání zkracuje celkovou dobu léčby [7], [9].

1.4.2 Další v terapii používaná antituberkulotika

Cykloserin



Charakteristika:

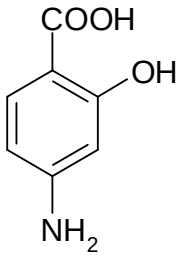
Cykloserin je širokospektré antibiotikum, derivát isoxazolidonu. Jedná se o strukturní analog aminokyseliny D-alaninu, který je antimikrobiálně aktivní na řadu bakterií a také

na *M. tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymů D-alaninracemaza a D-alaninsyntetaza a tím brání biosyntéze peptidoglykanu. Po perorálním podání se velmi dobře vstřebává z trávícího ústrojí. Cykloserin má vážné nežádoucí účinky ze strany nervového systému (konvulze, somnolence, bolesti hlavy, tremor, parézy, křeče až riziko epileptického záchvatu) [6], [9], [11].

Použití:

Cykloserin se uplatňuje v léčbě aktivní plicní a mimoplicní TBC (včetně renální TBC) vyvolané kmeny s prokázanou citlivostí k cykloserinu v případech, kdy selhala léčba antituberkulotiky první linie (streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamid). Jako všechna antituberkulotika by neměl být cykloserin podáván samostatně, ale v kombinaci s jinými účinnými léky. Bohužel pro jeho nežádoucí účinky je jeho indikace značně omezena [9].

Paraaminosalicylová kyselina



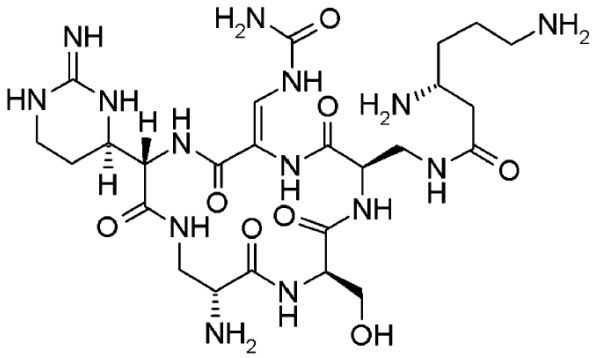
Charakteristika:

Paraaminosalicylová kyselina (PAS) je strukturní analog kys. para-aminobenzoové. Antituberkulotická aktivita je známá již od roku 1946. PAS je velice účinná na *M. tuberculosis*, na které působí bakteriostaticky. Její mechanismus účinku není ještě zcela objasněn, ale předpokládá se zásah do metabolismu železa, který je závislý na metabolismu salicylové kyseliny [6], [7]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří především GIT obtíže (nechutenství, průjmy), alergické kožní projevy, hypokalémie, hepatální dysfunkce [10].

Použití:

PAS je dnes už antituberkulotikum obsolentního charakteru při léčbě TBC. Používá se díky DOTS programu k terapii TBC způsobené multirezistentními kmeny mykobakterií [6], [9].

Kapreomycin



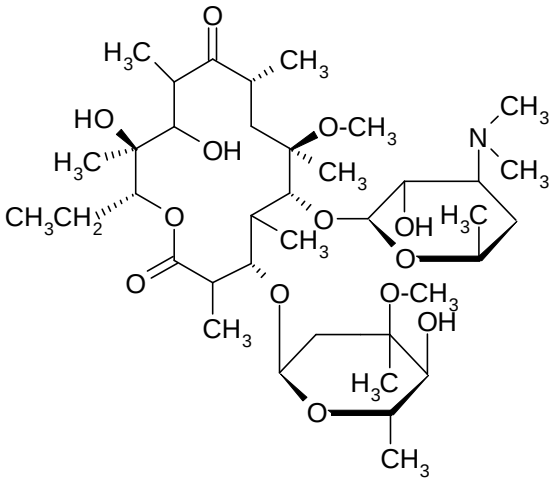
Charakteristika:

Kapreomycin je polypeptidové ATB s bakteriostatickým účinkem působící na intracelulárně uložená mykobakteria především na *M. tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin, kdy se kapreomycin váže na 30S podjednotku ribozomu a blokuje vazbu aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na komplexu mRNA s ribosomem. Má často zkříženou rezistenci s neomycinem, a kanamycinem (aminoglykosidové ATB) [11]. Po perorálním podání se nevstřebává z trávícího traktu, a proto musí být aplikován parenterálně [9]. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří nefrotoxicita, ototoxicita, změny v krevním obraze, alergické kožní projevy a poruchy CNS (bolesti hlavy, psychotické reakce) [9], [10].

Použití:

Kapreomycin se používá výhradně v kombinaci s jinými antituberkulotiky, aby bylo možné podat co nejmenší dávku a tím došlo ke snížení nežádoucích účinků [9].

Makrolidy



klaritromycin

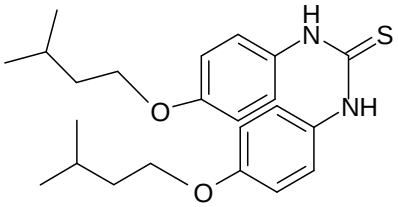
Charakteristika:

Makrolidy jsou bakteriostatická ATB středně širokého antimikrobního spektra. Jsou odvozená od erytromycinu (1952), jehož struktura je tvořena 14-členným makrocyklickým laktonovým kruhem k němuž jsou připojené dva cukerné zbytky. Novější deriváty se od erytromycinu liší velikostí a substitucí laktonového kruhu. Do této skupiny patří kromě erytromycinu, spiramycin, josamycin, roxitromycin, diritromycin, klaritromycin, azitromycin, který patří mezi azalidy. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin. Makrolidy se váží reverzibilně na receptor umístěný na 50S podjednotce ribosomu a tím dojde k inhibici bakteriální syntézy proteinů [9]. Společné nežádoucí účinky zahrnují špatnou gastrointestinální toleranci.

Použití:

Většina makrolidových ATB sice inhibuje růst mykobakterií, ale nemají dostatečně vysokou antituberkulotickou aktivitu. Pouze azitromycin vykazuje účinnost na atypická mykobakteria (*M. avium, M. chelonei, M. fortuitum*).

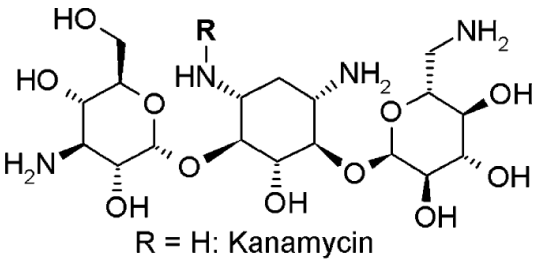
Isoxyl



Charakteristika

Isoxyl (thiokarlid), patří podle chemické struktury do skupiny diacylderivátů thiomočoviny. Isoxyl (4,4´-diisoamyloxyfenylthiomočovina) vykazuje anti-tuberkulotickou aktivitu a ukázala se být klinicky významná při léčbě TBC. Mechanismus účinku je vázán na mykolové kyseliny, kdy dochází k jejich inhibici u zkoumaného kmene *M. bovis* [6]. V nedávné době byly připraveny analogy isoxylu s lepší antimykobakteriální aktivitou. U analogů isoxylu bylo naznačeno na základě studia vztahu mezi strukturou a účinkem, že mají sklon k více než jednomu biochemickému cíli [7].

Kanamycin



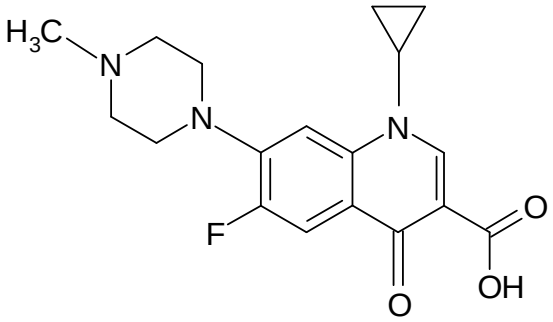
Charakteristika:

Kanamycin je aminoglykosidové ATB s baktericidním účinkem na *M. tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin, která vzniká zásahem na různých místech ribosomu. Kanamycin se ireverzibilně váže na receptor umístěný na 30S podjednotce ribosomu a blokuje vazbu aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na komplexu mRNA s ribosomem. Podává se výhradně parenterálně, hlavně pro své nežádoucí účinky, kterými jsou především nefrotoxicita, ototoxicita, neurotoxicita [9].

Použití:

V dnešní době se kanamycin používá pouze v terapii TBC, právě díky svým nežádoucím účinkům [10].

Fluorochinolony



ciprofloxacin

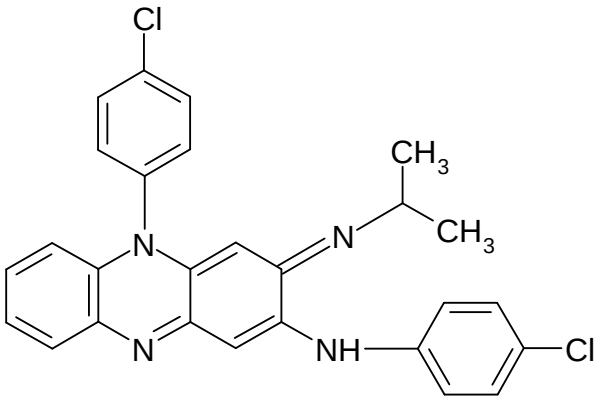
Charakteristika:

Fluorochinolony jsou chemicky odvozeny od 4-oxo-chinolin-3-karboxylové kyseliny s četnými substitucemi, které různě vylepšují antimikrobní účinky i farmakokinetické vlastnosti. Mezi hlavní antituberkuloticky aktivní fluorochinolony patří ciprofloxacin a ofloxacin, které vykazují aktivitu proti širokému spektru mykobakterií. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin - jedná se o inhibitory topoizomerazy II. (ATP-dependentní DNA gyraza) a DNA-topoizomerazy IV [6], [7], [9]. Tyto látky vykazují nízkou baktericidní aktivitu na mykobakteria [10]. Ciprofloxacin a ofloxacin se podávají buď perorálně a nebo i parenterálně (pokud není možné per os podání). Mezi hlavní nežádoucí účinky patří GIT obtíže typu nauzea, bolesti břicha, zvracení, nechuť k jídlu, ale i bolesti hlavy a závratě [9].

Použití:

Ciprofloxacin a ofloxacin jsou součástí kombinovaných režimů při léčbě pacientů infikovaných *M. tuberculosis* a *M. .avium* [6].

Klofazimin



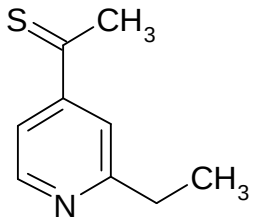
Charakteristika:

Klofazimin a další deriváty jsou sloučeniny odvozené od iminofenazinového kruhu komplexní struktury. Mechanismus účinku spočívá pravděpodobně v přímém ovlivnění DNA mykobakterií. Podává se perorálně a kumuluje se v organismu, zejména v makrogázích. K nežádoucím účinkům patří červenavé zbarvení kůže, moči a GIT potíže [11].

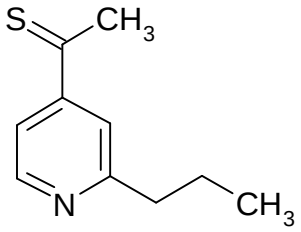
Použití:

Klofazimin se používá hlavně při léčbě lepry, způsobené *M. leprae* a v terapii mykobakterióz jejichž vyvolavatelem je *M. intracellulare* [6].

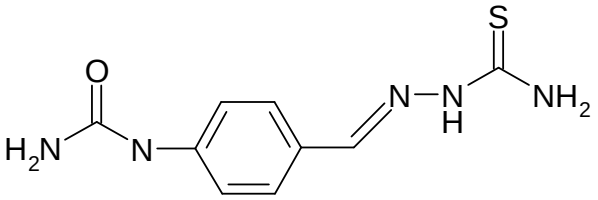
Ethionamid, Prothioamid a thioacetazon



ethionamid



prothioamid



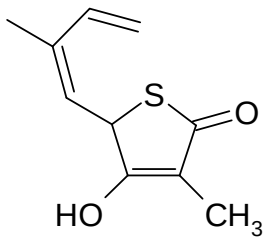
thioacetazon

Charakteristika:

Ethionamid je antituberkulotikum s baktericidním účinkem, které se už dnes v terapii TBC nepoužívá [9]. Ale společně s prothioamidem a thioacetazonem se jedná o klinicky zkříženou rezistenci, která by mohla být významná pro pacienty, kteří jsou infikováni *M .leprae* nebo *M. tuberculosis*. V současné době se tento originální přístup snaží potlačit expresi flavoprotein monooxygenazy, která je zdrojem resistence mykobakterií. V posledních šesti letech bylo zjištěno, že tyto sloučeniny jsou proléčiva a jsou oxidovány pomocí enzymu EthA (flavoprotein monooxygenaza), který může být zmutovaný v některých rezistentních kmenech mykobakterií [7].

1.4.3 Potenciální léčiva

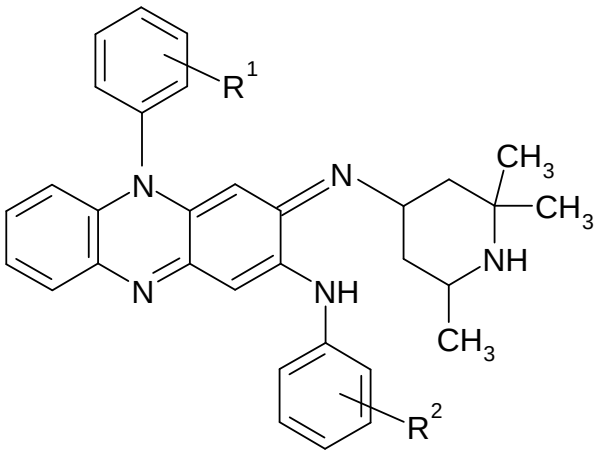
Thiolaktomycin



Charakteristika:

Thiolaktomycin (TLM) [(5*R*)-4-hydroxy-3-methyl-5-(1*E*,3*E*-2-methylbuta-1,3-dienyl)-5*H*-thiofen-2-on] je přírodní produkt izolovaný z *Nocardia* spp [7]. Patří do skupiny thiolaktonů, jejichž antituberkulotická aktivita závisí na stupni inhibice biosyntézy mykolových kyselin. Bylo zjištěno, že již malá koncentrace (minimální inhibiční koncentrace MIC 5 μg/ml) tohoto potenciálního léčiva je schopná inhibice. Zatím ale nejsou známy výsledky z *in vivo* toxikologické a *in vitro* cytotoxické studie, a proto je těžké odhadnout nakolik je tato účinná koncentrace vzdálená koncentraci toxické [6].

Analogy klofaziminu



B4121, R^1, R^2 = 3,5-dichlor

B4125, R^1, R^2 = 2-chlor

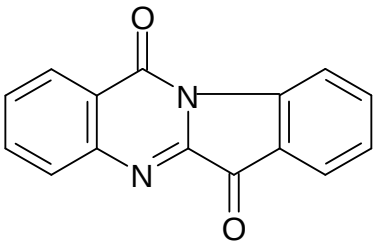
B4128, R^1, R^2 = 2,4-dichlor

B4169, R^1, R^2 = 3,4,5-trichlor

Charakteristika:

Některé z trimethylpiperidylových derivátů fenazinu (jedná se o fenazinové barvivo komplexní struktury) vykazují vyšší antituberkulotickou aktivitu proti *M. tuberculosis* včetně multirezistentních kmenů nashromážděných v makrogázích a také působí protizánětlivě. Rezistence na ně vzniká pomalu, mají dlouhý biologický poločas a jsou účinné i v testech *in vivo*, což činí analogy klofaziminu velmi atraktivními kandidáty v léčbě proti TBC [6].

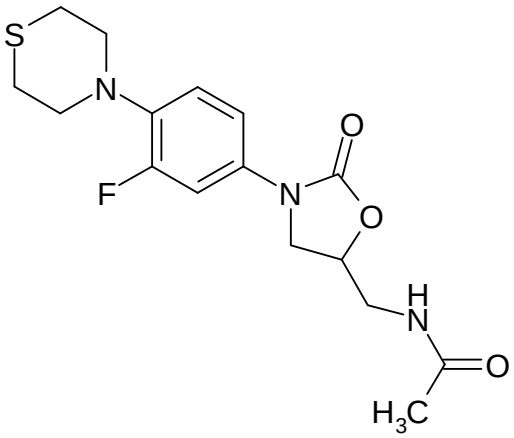
Tryptanthrin



Charakteristika:

Tryptanthrin je odvozen od struktury indolylchinazolinových alkaloidů. Vykazuje aktivitu na multirezistentní mykobakterie (MDR TBC) s MIC 0,5-1,0 µg/ml. Pokud by byl tento lék v budoucnosti užíván je nutné nejprve zjistit jeho toxicitu jak *in vitro*, tak také *in vivo* [6].

Oxazolidinony

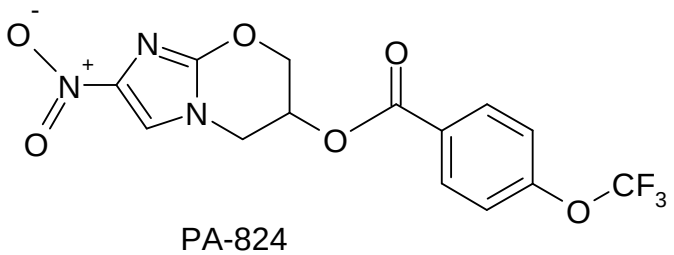


U - 100480

Charakteristika:

Oxazolidinony jsou perorálně účinná antibakteriální léčiva, jejichž spektrum zahrnuje *M. tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bakteriálních bílkovin, kdy se váže 23S podjednotka rRNA na 50S ribozomální podjednotku [13]. Mají významnou aktivitu proti *M. tuberculosis* s MIC 2-4 μg/ml. Linezolid, látka označována jako U-100480 vznikla náhradou atomu kyslíku za atom síry, je první používaný oxazolidinon a schválený FDA (***F**ood and **d**rugs **a**dministration* **FDA**) k léčbě mono nebo multirezistentním G+ bakteriálních infekcí a TBC. V současných klinických studiích, většina pacientů s multirezistentní TBC (MDR TB) byli úspěšně léčeni linezolidem v kombinaci s dalšími antituberkulotiky, ale dlouhotrvající užívání linezolidu v léčbě MDR TB často vedly k významné toxicitě, zahrnující anémii a periferní neuropatie [13]. Ačkoliv oxazolidinony mají slibný potenciál pro léčbu MDR TB, rozsáhlejší klinické studie jsou potřebné pro zhodnocení jejich účinnosti a toxicity stejně dobře jako stupeň rezistence rostoucích mykobakterií [13].

Nitroimidazofurany a nitroimidazopyrany



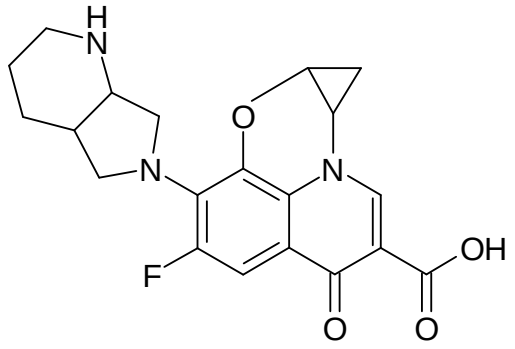
PA-824

Charakteristika:

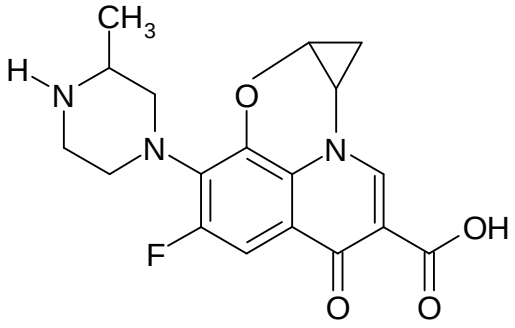
Nitroimidazofurany vykazovaly *in vivo* antituberkulotický účinek, ale kvůli prokázaným mutagenním vlastnostem nemohou být používány k léčbě TBC [6]. Naopak nitroimidazopyrany a především jejich vůdčí sloučenina niroimidazopyran PA-824 je obzvláště slibným kandidátem v léčbě TBC. PA-824 je odvozený od 5-nitroimidazolu a je vysoce účinný proti *M. tuberculosis*, jak na dělící latentní formy tak i na multirezistentní kmeny. Její MIC je nižší než 0,015-0,250 μg/ml. PA-824 je proléčivo, které potřebuje pro svoji aktivaci bakteriální F420 závislou na glukoso-6-fosfát-dehydrogenaze a nitroreduktaze, na jejichž základě dochází k inhibici bakteriální mykolové kyseliny a proteinové syntéze [7], [13]. PA-824 nevykazuje ani zkříženou rezistenci vůči dosud používaným antituberkulotikům. Účinnost je srovnatelná s isoniazidem a rifampicinem [6], [13]. Další vývoj vedl k řadě strukturně

příbuzných látek typu nitroimidazo[2,1-*b*]oxazolu, jako je OPC-67683. Toto potenciální léčivo je od roku 2004 podrobováno klinickým zkouškám [7].

Nové fluorochinolony



moxifloxacin

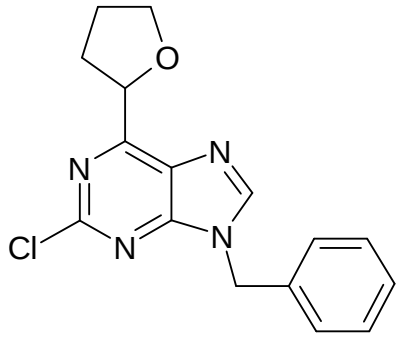


gatifloxacin

Charakteristika:

Fluorochinolony mají široké antibiotické spektrum a jsou v současné době používány jako antituberkulotika druhé linie při léčbě TBC a zároveň vykazují vysokou odolnost vůči mykobakteriím. Nový C-8-methoxy-fluorochinolon **moxifloxacin** (MXF) a **gatifloxacin** (GAT) mají delší biologický poločas a jsou účinnější proti *M. tuberculosis* než ofloxacin. Kombinací s RIF a PZA zabíjí tuberkulózní bacili v myších efektivněji než standardní kombinace INH+RIF+PZA. Tím by se mohlo dosáhnout stabilizovaného stavu za 4 měsíce bez opětovných relapsů. Tyto slibné studie zlepšují naději, že by moxifloxacin mohl časem nahradit INH+RIF+PZA a tak zkrátit u lidí léčbu TBC. Moxifloxacin má nezvykle brzkou antibakteriální aktivitu proti tuberkulózním bacilům s porovnáním s INH a byla také prokázána daleko lepší tolerance v předběžných humánních testech. Kombinovaná terapie s moxifloxacinem se zdá být účinná stejně jako současná standardní léková kombinace antituberkulotik. Moxifloxacin a gatifloxacin by měli být v současné době hodnoceny v klinických zkouškách v kombinaci s RIF a PZA. Obě dvě léčiva by se mohla potenciálně užívat jako léky první linie proti MDR TBC, kdy by mělo dojít hlavně ke zkrácení doby léčby, snížení dávky a tím i nežádoucích účinků léčiv [7], [13].

Puriny

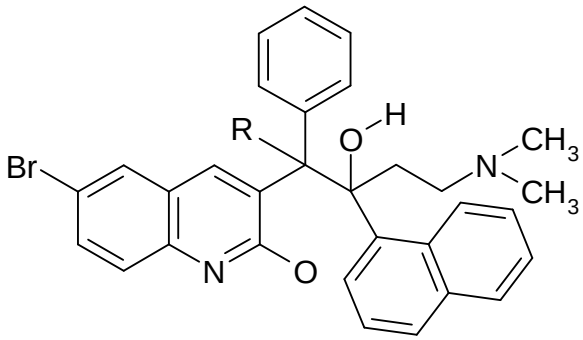


9-benzyl-2-chlor-6-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin

Charakteristika:

Nejvýznamnějšími potenciálními antituberkulotiky jsou deriváty 9-benzylpurinu s různými substituenty v polohách 2, 6 a 9, které vykazují vysokou aktivitu proti *M. tuberculosis*. Látka 9-benzyl-2-chlor-6-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin vykazuje antituberkulotickou aktivitu dokonce i při takto nízké MIC 0,78 μg/ml [6].

Diarylchinolin

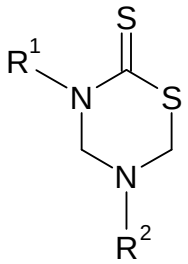


Charakteristika:

Nedávný objev diarylchinolinu jako slibného antituberkulotika, které je schopné zkrátit terapii TBC způsobilo mnoho rozruchu. Diarylchinolin je vysoce účinné léčivo proti mykobakteriím v pokusech *in vitro* na lékové zkoušky za použití rychle rostoucího *M. smegmatis*. Modifikace diarylchinolinu vedla k identifikaci struktury R207910/TMC207 (J sloučeniny) jako nejvíce aktivního činitele s MIC 0,003 μg/ml pro *M. smegmatis* a 0,030 μg/ml pro *M. tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici mykobakteriální protonové pumpy $F_0F_1H^+$ATPasy. J sloučenina je více méně účinná i proti jiným bakteriálním druhům, jako jsou *Escherichia coli*, a *Stafylococcus aureus* (MIC větší než 32 μg/ml). *M. tuberculosis* a *M. smegmatis* mohou vyvinout

resistenci vůči diarylchinolinu s frekvencí 1×10^{-7} až 1×10^{-8}. Mimořádně zajímavá je kooperace účinků mezi diarylchinolinem a pyrazinamidem, kdyby se mohlo jednat o velmi efektivní léky při léčbě lokalizované tuberkulózy ve slezině a v plicích. J sloučenina je v současné době pod klinickým testováním a čas ukáže zda-li by diarylchinolin mohl být podáván jako nové antituberkulotické léčivo, pro efektivnější léčbu TBC u lidí [7], [13].

Thiazidinthiony

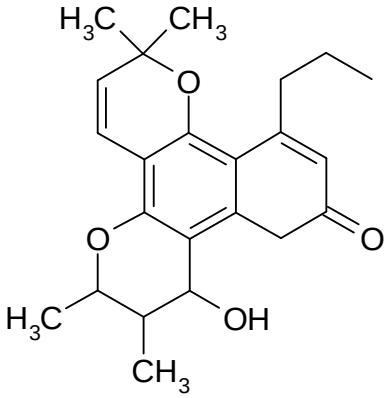


R^1, R^2 = alkyl, cykloalkyl, aryl

Charakteristika:

Thiazidinthiony jsou deriváty dithiokarbamových kyselin, které byly testovány proti *M. tuberculosis* díky jejich velice dobré biologické aktivitě zahrnující antibakteriální a antifungální účinnost. Jedna ze sloučenin, která se zdá být velice zajímavá v pokusech *in vitro* na antituberkulotickou aktivitu proti *M. tuberculosis* je $H_{37}Rv$ a dokonce vykazuje rezistenci proti mykobakteriím a zároveň ochraňuje myši v testech *in vivo* před TBC [6].

Benzopyran-2-ony



Calanolid A

Charakteristika:

Calanolid A byl původně testován jako potenciální léčivo proti viru HIV, ale byla zjištěna i antituberkulotická aktivita s nízkou MIC 3,13 μg/ml [6].

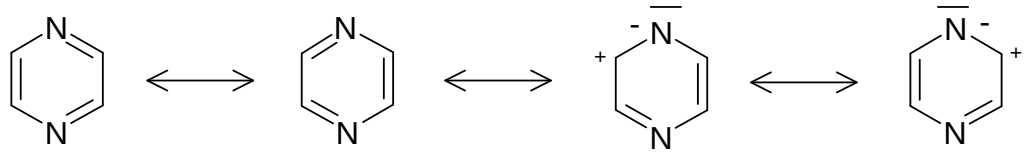
Budoucí perspektivy terapie

Lékově odolné TBC a HIV pandemie představují hlavní výzvu pro efektivnější kontrolu TBC. Léky proti TBC, které jsou v současné době používány byly vyvíjeny před více než 40 lety a jsou velmi potřebné obměny a syntézy nových generací antituberkulotik. Současný vývoj zahrnuje testování nových nebo přeměněných dosud užívaných léčiv a jejich vzájemnou kombinaci, která by mohla vést ke zkrácení terapie. Dále je nutný neustálý přísun a vylepšení současných léčiv, vývoj nových pomalu se uvolňujících systémů léčiv, které mohou redukovat frekvenci a množství léčiva nezbytného během léčby a další výzkum zaměřený na molekulární cíle. Cílem je najít lepší a více účinnější antituberkulotika a zkrátit tak dobu léčby, snížit toxicitu spojenou s léčivy a zajistit náhradní léčivo v případě vzniku rezistence. Racionální přístup k vývoji nových antituberkulotik zahrnuje v současnosti: chemickou modifikaci existujících léčiv (jako je rifampicin, fluorochinolony, makrolidy), zmapování genomu *M. tuberculosis,* definici biosyntézy v mykobakteriální buněčné stěně (glykosylace, biosyntéza mastných kyselin a biosyntéza diaminopimelové kyseliny), detekci genů ovlivňujících latenci a virulenci kmenů. Dále se zkoumá užití mikrovlnné analýzy a nástrojů molekulární biologie, následné studium mezi strukturou a účinkem pomocí molekulového modelování strukturně známého léčiva a hlavně *in vitro* a *in vivo* sledování identity a účinnosti nových léčiv, zhodnocení nových lékových kombinací a následné povolení k používání těchto nových léčiv v terapii TBC [6], [13].

2 Teoretická část

2.1 Vlastnosti pyrazinového jádra

Pyrazin představuje vysoce symetrickou molekulu. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů. Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid těchto níže uvedených struktur (a-d).



a b c d

Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly:

Sloučenina	% aromaticity
Benzen	*100*
Pyridin	*82*
Pyridazin	*65*
Pyrimidin	*67*
Pyrazin	*75*

Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná baze, v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je ale bazí nejslabší [14].

Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů [15]:

Sloučenina	pKa (1.stupeň)
Pyridin	*5,20*
Pyridazin	*2,33*
Pyrimidin	*1,30*
Pyrazin	*0,65*

Z hodnot hustoty π-elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota π-elektronů je zvýšená na dusíkatých atomech, zatímco na uhlíkových atomech je hustota výrazně menší. Vypočtené hodnoty se od naměřených hodnot téměř neliší. Z toho vyplývá, že hustoty π-elektronů na α-uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi

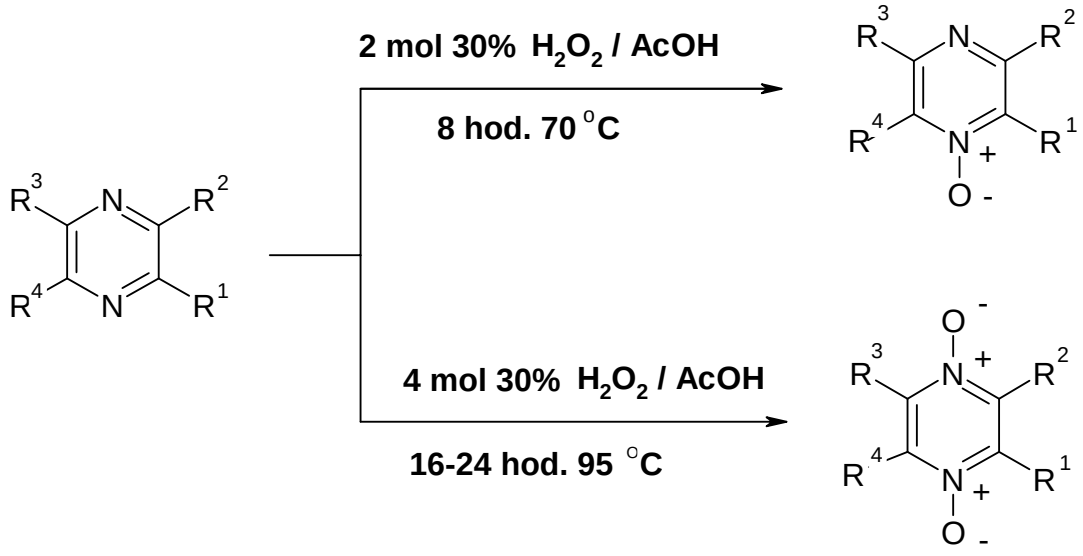
podobné a lze tedy očekávat i podobnou chemickou reaktivitu α-substituovaných pyrazinů a pyridinu.

Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivňuje geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární a vzdálenost *C-N* je 13,48 nm, *C-C* pak 13,83 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového jádra, takže úhel sevřený mezi N^1, α- a β- uhlíkem je o 5 ° ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu.

Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel – Craftsovým aromatickým substitucím, které vedou k přípravě arylalkylketonů. Přímý elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem (záporný indukční efekt, –I) dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou substituce nukleofilní, zvláště v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na *N*-oxid. Z preparativního hlediska je významná nukleofilní substituce protonovaných heteroaromatických bazí různými typy radikálů [15].

2.2 Příprava *N*-oxidů pyrazinu

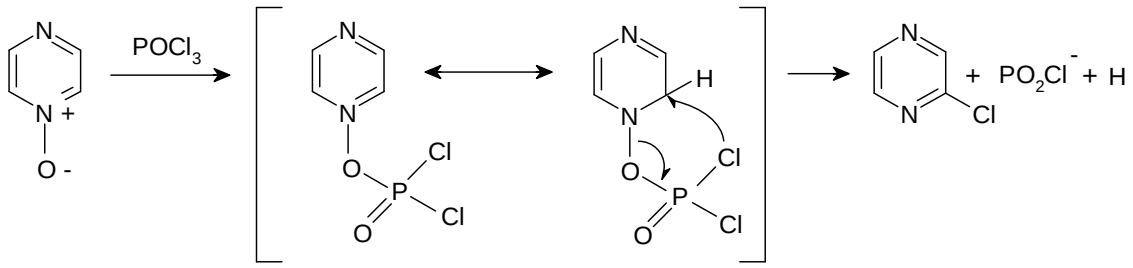
N-oxidy pyrazinu se připravují nejčastěji pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci peroxidu vodíku přechází pyrazin na 1-mono nebo 1,4-dioxid [16].



2.3 Halogenace pyrazinového jádra

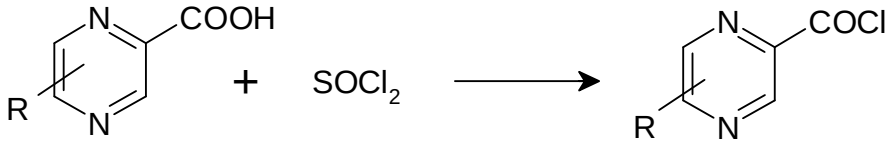
Halogenpyraziny představují důležitou skupinu sloučenin v chemii derivátů pyrazinu, protože umožňují přípravu mnoha jinak nedostupných derivátů díky snadné záměně atomu halogenu za nukleofil (molekula s volným elektronovým párem).

Halogenderiváty se dají připravit třemi klasickými způsoby. První z metod spočívá v přímé reakci pyrazinu s halogenem v plynné fázi, druhá metoda pak v záměně hydroxylu či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejčastěji se však halogenderiváty pyrazinu připravují nukleofilní halogenací *N*-oxidu pyrazinu. Halogenace takto aktivovaného jádra pyrazin 1-oxidu probíhá nejčastěji do polohy 2, méně častěji pak do polohy 3.



2.4 Příprava acylhalogenidů

Acylhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Acylhalogenidy lze připravit řadou reakcí karboxylových kyselin s halogenidy fosforu, thionylu, fosforylu či sulfurylu [17]. Nejvýhodnější syntézou z hlediska čistoty připravovaných acylhalogenidů se jeví být použití chloridu thionylu (thionylchlorid $SOCl_2$). Lze ale použít i chlorid fosforečný (PCl_5) či chlorid fosforitý (PCl_3). Někdy je vhodným činidlem pro převádění kyselin na acylhalogenidy fosgen, popř. chlorid šťavelové kyseliny a pro práci s citlivými kyselinami benzoylchlorid [18].



V případě, že není možné přebytek thionylchloridu oddestilovat pro blízké teploty varu thionylchloridu a vzniklého acylhalogenidu, odstraní se přebytečný thionylchlorid přidáním kyseliny mravenčí podle následující rovnice:

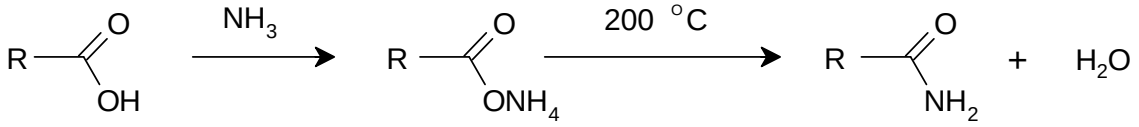
$$HCOOH + SOCl_2 \rightarrow CO + SO_2 + 2\ HCl$$

2.5 Příprava anilidů karboxylových kyselin

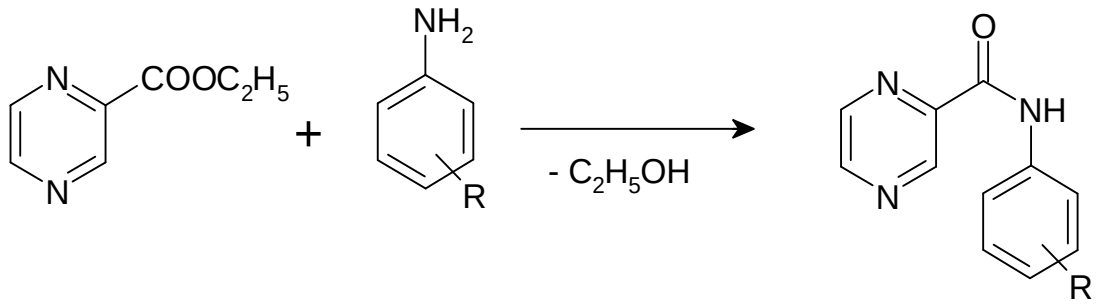
Pyrazinamid je antituberkulotikum používané od roku 1985, kdy jeho zavedení do terapie podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazin-2-karboxylových kyselin. Anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny představují právě díky tomu nejlépe prostudovanou skupinu.

Amidy karboxylových kyselin lze připravit několika způsoby, jednak z kyselin, ale i většiny jejich funkčních derivátů.

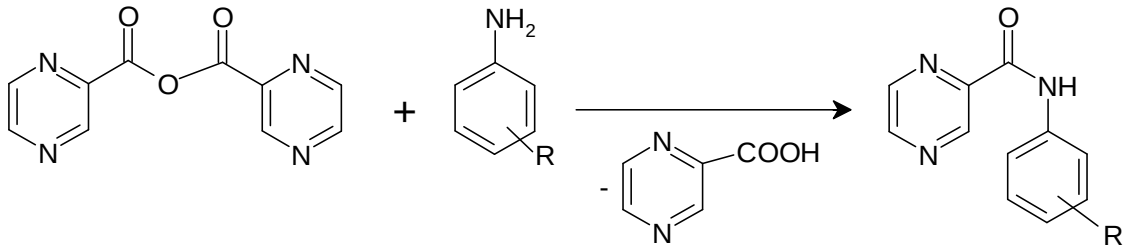
Aminolýza karboxylových kyselin má pro laboratorní přípravu anilidů malý význam. Z kyselin se nejčastěji připravují amidy tak, že se kyselina převede na sůl s amoniakem nebo primárním či sekundárním aminem a ta se pak podrobí tepelnému rozkladu (za teploty okolo 200°C). Tímto způsobem lze získat primární, ale i sekundární a terciární amidy [17].



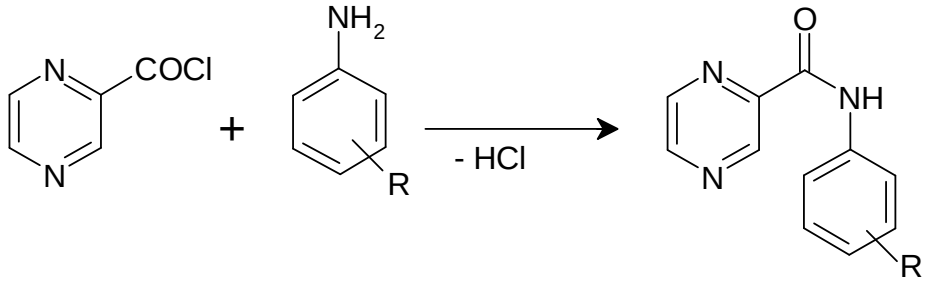
Metoda, při níž je získán amid reakcí amoniaku (resp. aminu) s esterem je nazývána aminolýzou esterů [17]. Jedná se o výhodnější cestu přípravy, která se obyčejně provádí při zvýšené teplotě zahříváním směsi obou složek k varu. Rovnováha reakce směrem k amidu je posouvána oddestilováním volného alkoholu.



Dalším způsobem vzniku amidu karboxylových kyselin je aminolýza anhydridů organických kyselin:



Nejpoužívanější metodou přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny je aminolýza chloridu kyseliny. Aminolýza chloridů probíhá ve většině případů za velmi příznivých podmínek. Do reakční směsi se přidává pyridin, který je důležitý jako akceptor protonů uvolněné kyseliny, lze použít i jiný terciární amin. Jinak uvolněný chlorovodík vyváže 1 mol aminu [18].


N
COCl
N
+
NH2
R
- HCl
O
N
NH
N
R

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a chemikálie

U použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty. Rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna obvyklým způsobem.

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách SILUFOL UV 254 (Kavalier, Votice, ČR) za použití vyvíjecí soustavy toluen - aceton (1:1). Deriváty pyrazinu obsahující volnou karboxylovou skupinu byly vyvíjeny v soustavě propanol - amoniak (2:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku BOËTIUS PHMK 05 (VEB KOMBINAT NAGEMA, VEB Wägetechnik RAPIDO, Radebeul, Německo) a jsou nekorigované.

Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano, Itálie) provedla paní Hronová na KFCHKL.

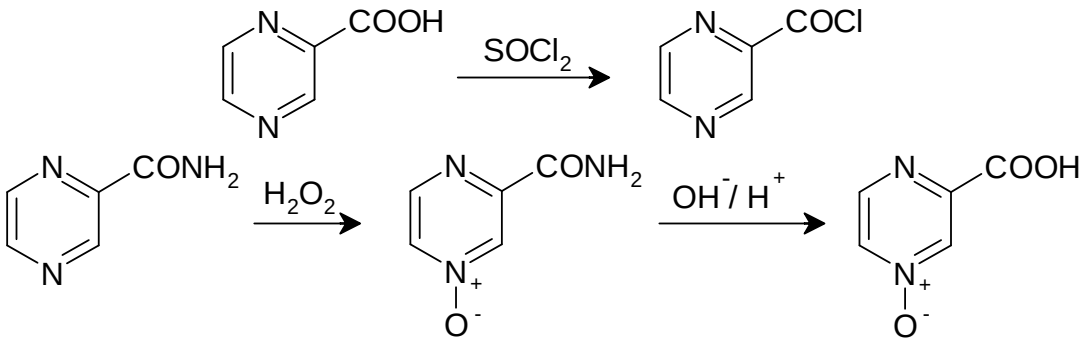
Infračervená spektra byla změřena paní Vencovskou na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg KBr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1}.

^{1}H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkury – Vx BB 300 (299,95 MHz – ^{1}H and 75,43 MHz – ^{13}C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k $Si(CH_3)4$.

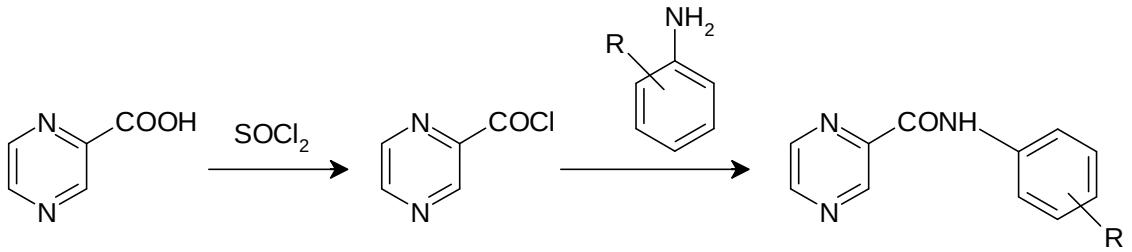
Log *P* sloučenin byl vypočten pomocí programu CS ChemOffice Ultra, verze 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.).

3.2 Schéma prováděných reakcí

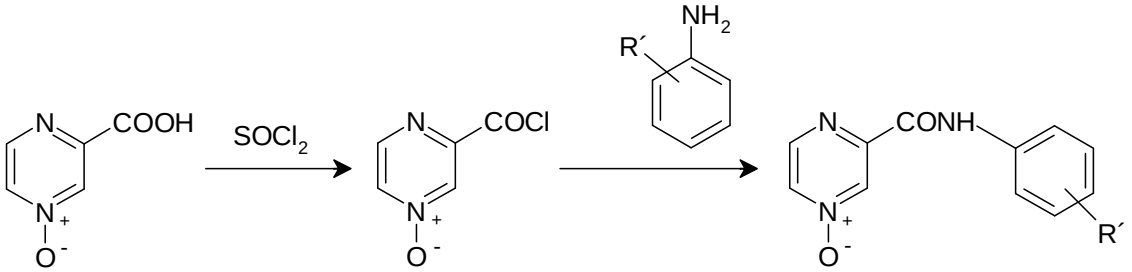
3.2.1 Výchozí struktury



3.2.2 Příprava vlastních anilidů

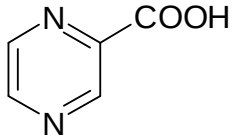


R = H
3-F, 4-F
3,4-Cl, 3-OH-6-Cl
2-Br, 3-Br, 4-Br
3,5-dibrom-4-hydroxy



R´ = 2-F, 3-F
3-Br

3.3 Příprava pyrazinkarboxylové kyseliny



30 g (0,24 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se smíchá se 112 ml 10% roztoku hydroxidu sodného a povaří se asi dvě hodiny. Roztok se okyselí 15% kyselinou chlorovodíkovou. Vyloučené krystaly pyrazinkarboxylové kyseliny se odsají a překrystalizují z vody.

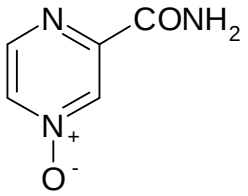
Molekulová hmotnost: 124,1

Teplota tání: 223 – 225 °C

(dle literatury [19]: 222 - 225°C za rozkladu)

Od roku 2006 byla používána komerčně dostupná pyrazinkarboxylová kyselina od firmy Aldrich.

3.4 Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



K roztoku 34,0 ml (1,1 mol) 30% peroxidu vodíku v 52,0 ml (0,9 ml) ledové kyseliny octové bylo po částech přidáno 12,8 g (0,104 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Směs byla zahřáta na 70 °C a dále byla teplota udržována na 70-80 °C po dobu šesti hodin. Po ochlazení byla směs ponechána přes noc v lednici. Vyloučené krystaly byly odfiltrovány, promyty vodou a ethanolem. Krystalizace byla provedena z vody.

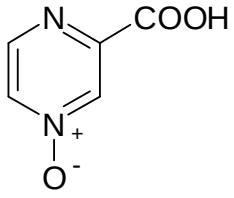
Molekulová hmotnost: 139,1

Teplota tání: 303 °C (za rozkladu)

(dle literatury [20]: 300 °C, 302-305 °C za rozkladu)

Výtěžek: 5,5 g (42,97 % teoretického výtěžku)

3.5 Příprava 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny

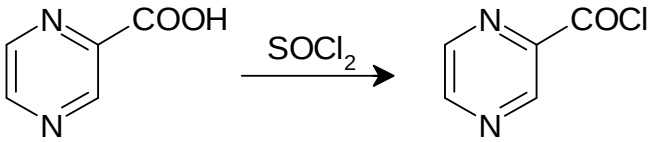


10,72 g (0,22 mol) 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny bylo 2 hodiny zahříváno k varu s 37,3 ml (0,28 mol) 10 % roztoku hydroxidu sodného. Vyloučené krystaly sodné soli 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly odfiltrovány a poté rozpuštěny v 50 ml horké vody. Roztok byl opět zfiltrován a za horka okyselen 15 % kyselinou chlorovodíkovou na pH 3. Vyloučený produkt byl krystalizován z vody.

Molekulová hmotnost:	140,1
Teplota tání:	196,5 °C
	(dle literatury [21]: 212 – 213 °C)
Výtěžek:	9,89 g (92,26 % teoretického výtěžku)

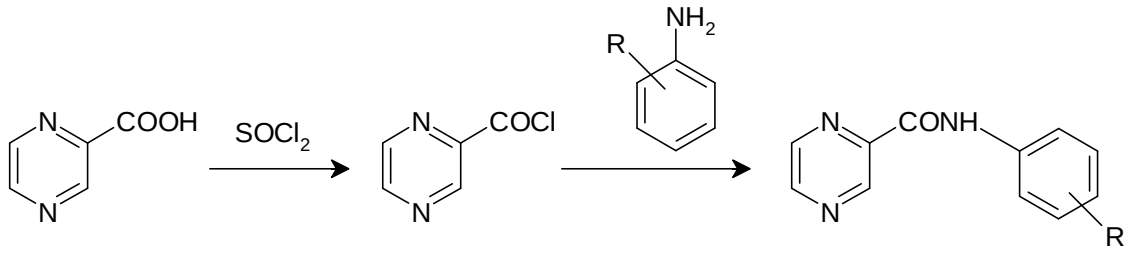
3.6 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

3.6.1 Příprava chloridů pyrazin-2-karboxylové kyseliny



0,0081 mol pyrazinkarboxylové kyseliny se rozpustí ve 25 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka je opatřena zpětným chladičem s uzávěrem proti vniknutí vzdušné vlhkosti. K roztoku se přidá 0,22 mol (16 ml) thionylchloridu a zahřívá se pod zpětným chladičem k varu při teplotě 120-125 °C 1,5 hodiny. Poté se nezreagovaný podíl thionylchloridu oddestiluje za sníženého tlaku. Po oddestilování na rotační vakuové odparce se na závěr přidá malé množství toluenu pro azeotropní oddestilování zbytku thionylchloridu z produktu. Surový produkt v baňce se dále nečistí, ale použije se k dalším reakcím. Obdobným způsobem byly připraveny chloridy 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

3.6.2 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

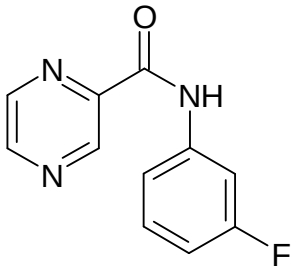


R = H
3-F, 4-F
3,4-Cl, 3-OH-6-Cl
2-Br, 3-Br, 4-Br
3,5-dibrom-4-hydroxy

0,0027 mol substituovaného anilinu se rozpustí v 10 ml bezvodého acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku se přidá 0,0027 mol (0,23 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce se po kapkách přidává roztok 0,0027 mol chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém acetonu. Směs se míchá asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté se aceton oddestiluje za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt se překrystalizuje ze směsi voda:ethanol. Následně se provede kontrola průběhu reakce pomocí TLC za použití vyvíjecí soustavy toluen:aceton (1:1). Na závěr se změří teplota tání získaného produktu. Obdobným způsobem byly připraveny anilidy 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

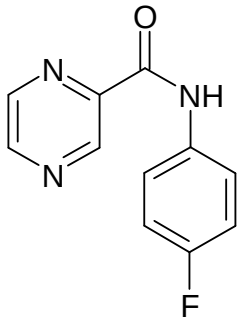
3.7 Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky

3.7.1 (3-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



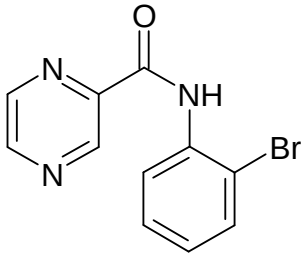
Sumární vzorec	$C_{11}H_8FN_3O$
Výtěžek	0,160 g (52,4 %)
M. h.	217,2
T_t	139-140 °C
R_F	0,79
Čistota [%]	99,79
Elementární analýza	vypočteno: C 60,83 %, H 3,71 %, F 8,75 %, N 19,35 %, O 7,37 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3353 (NH), 1683 (C=O), 1597 (fenyl), 1537 (NH), 1273, 1149, 1021 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.2 (4-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



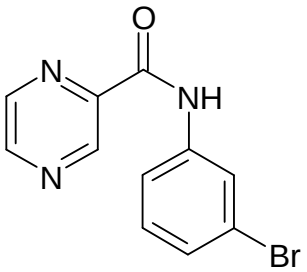
Sumární vzorec	$C_{11}H_8FN_3O$
Výtěžek	0,23 g (76,7 %)
M. h.	217,2
T_t	159-160 °C
R_F	0,77
Čistota [%]	91,21
Elementární analýza	vypočteno: C 60,83 %, H 3,71 %, F 8,75 %, N 19,35 %, O 7,37 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3351 (NH), 1676 (C=O), 1607 (fenyl), 1539 (NH), 1399, 1215, 1022 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.3 (2-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_8BrN_3O$
Výtěžek	0,33 g (71 %)
M. h.	278,11
T_t	141,5 °C
R_F	0,88
Čistota [%]	99,72
Elementární analýza	vypočteno: C 47,51 %, H 2,90 %, Br 28,73 %, N 15,11 %, O 5,75 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3320 (NH), 1693 (C=O), 1589 (fenyl), 1541 (NH), 1304, 1131, 1021 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

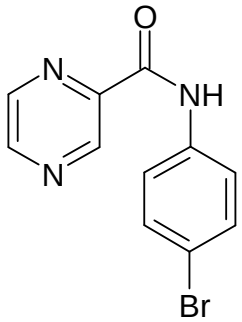
3.7.4 (3-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_8BrN_3O$
Výtěžek	0,24 g (51,7 %)
M. h.	278,11
T_t	131-132 °C
R_F	0,81
Čistota [%]	99,83
Elementární	vypočteno: C 47,51 %, H 2,90 %, Br 28,73 %, N 15,11 %, O 5,75 %

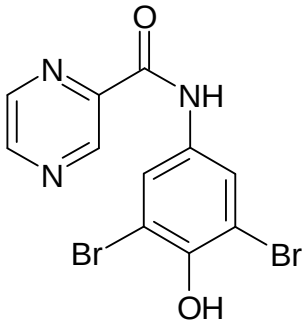
analýza	naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3344 (NH), 1679 (C=O), 1586 (fenyl), 1519 (NH), 1304, 1122, 1022 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.5 (4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



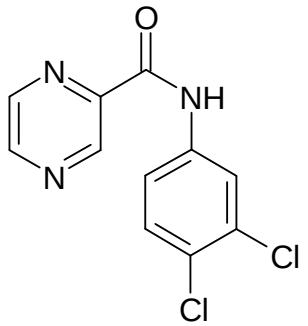
Sumární vzorec	$C_{11}H_8BrN_3O$
Výtěžek	0,11 g (23,7 %)
M. h.	278,11
T_t	197-199 °C
R_F	0,79
Čistota [%]	99,65
Elementární analýza	vypočteno: C 47,51 %, H 2,90 %, Br 28,73 %, N 15,11 %, O 5,75 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	(NH), (C=O), (fenyl), (NH), (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.6 (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_7Br_2N_3O_2$
Výtěžek	0,16 g (22,2 %)
M. h.	373,01
T_t	256,5-257,5 °C
R_F	0,78
Čistota [%]	98,57
Elementární analýza	vypočteno: C 35,42 %, H 1,89 %, Br 42,84 %, N 11,27 %, O 8,58 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3343 (NH), 1694 (C=O), 1574 (fenyl), 1516 (NH), 1304, 1271, 1123 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

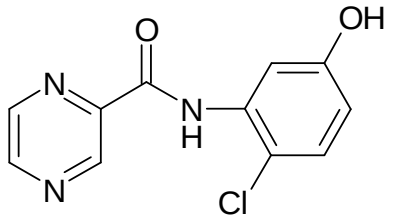
3.7.7 (3,4-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_7Cl_2N_3O$
Výtěžek	0,20 g (45,5 %)

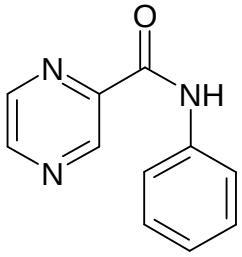
M. h.	268,10
T_t	180-181 °C
R_F	0,81
Čistota [%]	98,69
Elementární analýza	vypočteno: C 49,28 %, H 2,63 %, Cl 26,45 %, N 15,67 %, O 5,97 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	(NH), (C=O), (fenyl), (NH), (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.8 (3-hydroxy-6-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



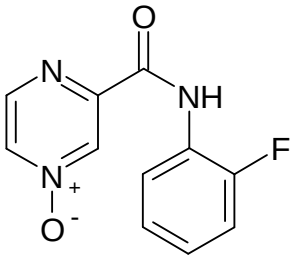
Sumární vzorec	$C_{11}H_8ClN_3O_2$
Výtěžek	0,21 g (72,2 %)
M. h.	249,66
T_t	226,5 °C
R_F	0,79
Čistota [%]	99,39
Elementární analýza	vypočteno: C 52,92 %, H 3,23 %, Cl 14,20 %, N 16,83 %, O 12,82 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	(NH), (C=O), (fenyl), (NH), (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.9 anilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_9N_3O$
Výtěžek	0,020 g (8 %)
M. h.	199,21
T_t	126-127 °C
R_F	0,80
Čistota [%]	99,92
Elementární analýza	vypočteno: C 66,32 %, H 4,55 %, N 21,09 %, O 8,03 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	(NH), (C=O), (fenyl), (NH), (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

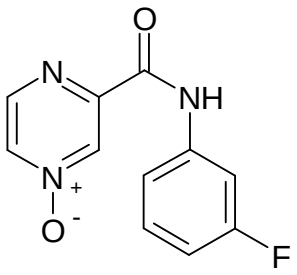
3.7.10 (2-fluorfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_{10}FN_3O_2$
Výtěžek	0,23 g (28,8 %)
M. h.	235,22
T_t	214,9 °C
R_F	0,71
Čistota [%]	
Elementární analýza	vypočteno: C 56,17 %, H 4,29 %, F 8,08 %, N 17,86 %, O 13,60 % naměřeno:

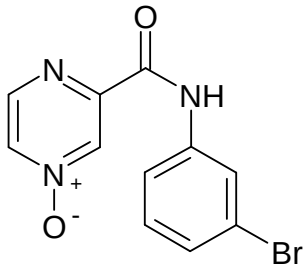
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3349 (NH), 1687 (C=O), 1594 (fenyl), 1543 (NH), 1256, 1119, 1010 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.11 (3-fluorfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_{10}FN_3O_2$
Výtěžek	0,15 g (18,9 %)
M. h.	235,22
T_t	276-277 °C
R_F	0,94
Čistota [%]	
Elementární analýza	vypočteno: C 56,17 %, H 4,29 %, F 8,08 %, N 17,86 %, O 13,60 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	(NH), (C=O), (fenyl), (NH), (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

3.7.12 (3-bromfenyl)-4-N-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Sumární vzorec	$C_{11}H_{10}BrN_3O_2$
Výtěžek	0,32 g (25,9 %)
M. h.	296,13
T_t	194-195 °C
R_F	0,61
Čistota [%]	
Elementární analýza	vypočteno: C 44,62 %, H 3,40 %, Br 26,98 %, N 14,19 %, O 10,81 % naměřeno:
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3327 (NH), 1688(C=O), 1584 (fenyl), 1538 (NH), 1330, 1289, 1109, 1005 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	

4 Biologické hodnocení

4.1 Antituberkulotická aktivita

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na účinnost proti *M.tuberculosis* $H_{37}Rv$ v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility). Antimykobakteriální aktivita je testována na *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ v BACTEC 12B mediu použitím BACTEC 460 radiometrického systému [22]. V tabulce jsou uvedeny pouze některé nově připravené anilidy, výsledky ostatních látek nebyly do odevzdání diplomové práce k dipozici.

Testovaná látka č.	% inhibice při MIC 6,25 μg/ml
1	57
6	82
10	28
12	65

4.2 Antimykotická aktivita

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na antifungální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové.

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640[1)] s glutaminem, roztok byl pufrován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS[2)]. Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 0,975 do 1000 μM. Součástí testování byly slepé pokusy (bez účinné látky). MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Inkubace probíhala staticky, ve tmě a ve vlhké atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

[1)] RPMI 1640 = medium (zkratka z angl. Rockwell Park Memorial Institute).
[2)] MOPS- systematicky: 3-(morfolino)propansulfonová kyselina.

Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti uvedeným kmenům (kód, číslo):

Candida albicans ATCC 44859 (CA1)	*Trichosporon asahii* 1188 (TA)
C. tropicalis 156 (CT)	*Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM)
C. krusei E28 (CK2)	*Aspergillus fumigatus* 231(AF)
C. glabrata 20/I (CG)	*Absidia corymbifera* 272 (AC) [23]

Testované kmeny	**MIC/IC$_{80}$** [µmol/l]							
	CA	**CT**	**CK**	**CG**	**TA**	**AF**	**AC**	**TM**
Délka inkubace	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	72h
	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	120h
flukonazol	0,06	0,12	3,91	0,98	0,24	>125	>125	1,95
	0,12	>125	15,62	3,91	0,48	>125	>125	3,91

KMEN (kód)		**Testovaná látka** (kód) – **MIC/IC$_{80}$** [µmol/l]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CA	24h					>500		>125	**125**	>500		>250	
	48h					>500		>125	>500	>500		>250	
CT	24h					>500		>125	**250**	>500		>250	
	48h					>500		>125	>500	>500		>250	
CK	24h					>500		>125	**250**	>500		>250	
	48h					>500		>125	**500**	>500		>250	
CG	24h					>500		>125	**31,25**	>500		>250	
	48h					>500		>125	**125**	>500		>250	
TA	24h					>500		>125	**62,5**	>500		>250	
	48h					>500		>125	**125**	>500		>250	
AF	24h					>500		>125	>500	>500		>250	
	48h					>500		>125	>500	>500		>250	
AC	24h					>500		>125	>500	>500		>250	
	48h					>500		>125	>500	>500		>250	
TM	72h					>500		**125**	**500**	>500		>250	
	120h					>500		**125**	**500**	>500		>250	
Poznámka: **tučně** vyznačené hodnoty MIC/IC$_{80}$ [µmol/l] se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací													

4.3 Herbicidní aktivita

4.3.1 Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastu špenátu

Chloroplasty byly připraveny metodou dle Walkera [24] z rostliny špenátu (*Spinacia oleracea*). Inhibice přenosu elektronů při fotosyntéze v chloroplastech špenátu byla stanovena spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) za použití 2,6-dichlorfenol-indofenolu (DCIPP) jako akceptoru elektronů metodikou dle Kráľové [22]. Testované látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO v použité koncentraci (nejvýše 4 %) neovlivňuje fotochemické pochody v chloroplastech špenátu. Účinnost inhibice testovaných látek je vyjádřena jako IC_{50}, což odpovídá molární koncentraci látky způsobující 50% pokles produkce kyslíku oproti kontrolní skupině. Jako standard byl použit selektivní herbicid DCMU[3)].

4.3.2 Testování redukce obsahu chlorofylu v Chlorella vulgaris

Zelená řasa *Chlorella vulgaris* byla kultivována při pokojové teplotě metodou dle Kráľové [25]. Účinek sloučenin na obsah chlorofylu v řasách byl zjišťován po 4-denní kultivaci řas v přítomnosti sledované látky, výsledek byl stanoven spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) po extrakci chlorofylu methanolem podle Wellburna [26]. Látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v DMSO. Kontrolní vzorky obsahovaly stejné množství DMSO jako testované. Antialgální aktivita je vyjádřena jako IC_{50}, jako standard byl použit DCMU.

[3)] DCMU- systematicky: 3-(3, 4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea.

5 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na syntézu látek ze skupiny anilidů substituované pyrazinkarboxylové kyseliny. Na katedře bylo v minulosti připraveno několik sérií látek tohoto typu [23], [27], [28], [29], [30] u kterých se na aromatickém jádře vyskytovaly v různých polohách fenolická (kyselá) skupina, popř. lipofilní skupiny (halogeny, alkyly, alkoxyskupiny).

Celkem bylo připraveno 12 látek, které lze rozdělit do dvou větších sérií:

1. anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny,
2. anilidy 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

Látky byly připraveny reakcí chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny s příslušnými aminy. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

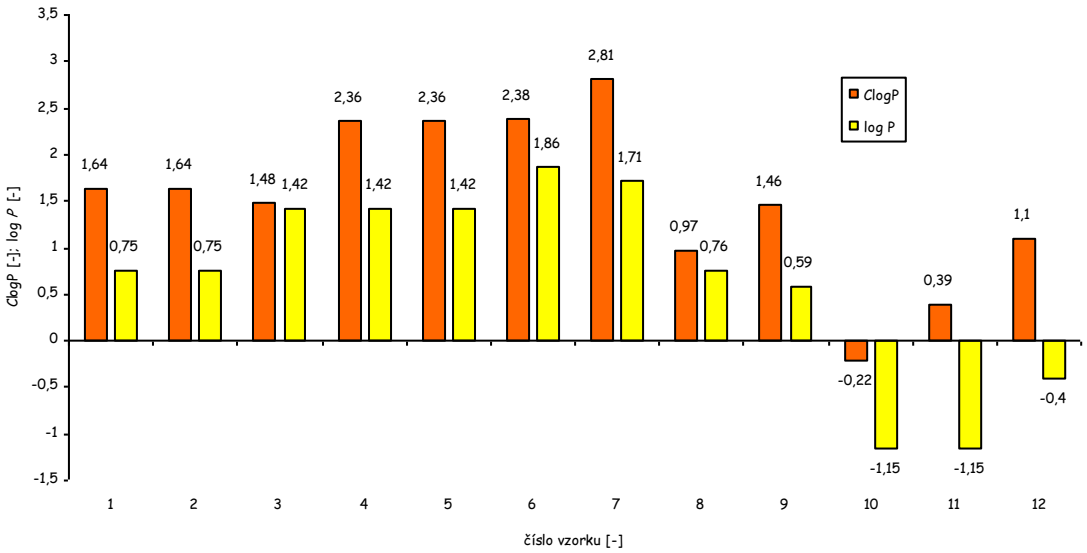
1. příprava chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny v bezvodém toluenu,
2. vlastní syntéza anilidu příslušné kyseliny aminolýzou.

Reakce probíhaly většinou hladce a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 8,0 – 76,7 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu.

Finální látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, ^{1}H a ^{13}C NMR spektry, popř. i elementarní analýzou. Čištění látek jsem prováděla rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

Dále byly u látek zjištěny hodnoty lipofility ClogP a log *P* pomocí programu CS ChemOffice Ultra, verze 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Hodnota ClogP je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě n-oktanol/voda, při jehož výpočtu jsou brány v úvahu možné chemické interakce. Hodnota log *P* je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě n-oktanol/voda Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí ClogP –0,22 - 2,81, log *P* –1,15 - 1,86. Předpokládá se, že dostatečná lipofilita je jednou z důležitých a základních podmínek pro průnik přes vysoce lipofilní mykobakteriální stěnu. Z grafu je patrné, že lipofilita stoupá s molekulovou hmotností, ve skupině anilidů odvozených od kyseliny pyrazinkarboxylové jsou lipofilnější sloučeniny s navázaným chlorem a bromem než látky obsahující hydroxy skupinu či bez substituce na aromatickém jádře. V případě anilidů odvozených od 4-*N*-oxidu

pyrazinkarboxylové kyseliny jsou hodnoty log *P* záporné, což odpovídá hydrofilní struktuře daných sloučenin.



Byly určeny hodnoty kapacitního faktoru *K* za použití HPLC Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu p.a. (70 %) a vody (30 %). Detekce probíhala spektrofotometricky při 210 nm. Byl změřen retenční čas T_R (vzdálenost od nástřiku k maximu píku) a mrtvý retenční čas T_D (vzdálenost od nástřiku k maximu píku neadsorbované látky: použit roztok KI v methanolu). Kapacitní faktor byl spočítán použitím programu Millennium 32^R podle vzorce:

$$K = (T_R - T_D) / T_D$$

Log *K* je pak spočítán z kapacitního faktoru *K* a je použit jako index lipofility.

Vypočítané hodnoty lipofility (log P)
a chromatograficky stanovené hodnoty log K

číslo látky	log *P*	log *K*
1	0,75	0,4247
2	0,75	0,4416
3	1,42	0,7186
4	1,42	0,5822
5	1,42	0,6331
6	1,86	0,7985
7	1,71	0,7162
8	0,76	0,4527

9	0,59	0,4119
10	-1,15	
11	-1,15	
12	-0,40	

Všech 12 látek bylo odesláno na testování **antimykobakteriální aktivity** do TAACF, v USA. Pouze u čtyřech látek jsou dostupné výsledky v době odevzdání této diplomové práce. U ostatních zatím nejsou k dispozici. Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu *in vitro* vykazuje látka číslo **6** ((3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny, procento inhibice činí 82 %. Zjištěné procento inhibice je velmi vysoké, ale pro další testování v rámci programu TAACF je nutná minimálně 90% inhibice. Tato látka představuje vysoce lipofilní sloučeninu v dané skupině látek (log *P* 1,86, ClogP 2,38). Další látka číslo **12** ((3-bromfenyl)amid 4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny vykazuje procento inhibice 65 %. Látka číslo **1** ((3-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny) vykazuje 57% antituberkulotickou aktivitu a látka číslo **10** ((2-fluorfenyl)4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylová kyseliny) jejíž procento inhibice je pouze 28 %. Z uvedeného vyplývá, že pro průnik přes mykobakteriální stěnu důležitá nejenom lipofilita, ale i vhodné prostorové uspořádání molekuly.

Dále byly látky podrobeny testování na **antimykotickou aktivitu**. Nejvyšší antimykotickou aktivitu *in vitro* vykazovala sloučenina číslo **8** ((3-hydroxy-6-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny) a to především proti kmenu *Candida glabrata*, v pořadí druhým nejcitlivějším kmenem byl *Trichosporon asahii* a dále pak *Candida albicans*. Látka číslo **7** ((3,4-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny) vykazovala velmi slabou aktivitu proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes*. U ostatních látek byla zjištěna velmi slabá antimykotická aktivita v porovnání se standardem (flukonazol).

6 Závěr

V rámci této diplomové práce jsem plnila následující úkoly:

1. S použitím dostupné odborné literatury a internetu jsem provedla řešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě a trendy v terapii
2. V dostupné chemické literatuře jsem zjistila metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny a 4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravila jsem tyto v literatuře dosud nepopsané produkty:
   1) (3-flourfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   2) (4-fluorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   3) (2-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   4) (3-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   5) (4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   6) (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   7) (3,4-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   8) (3-hydroxy-6-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   9) anilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   10) (2-fluorfenyl)-4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   11) (3-fluorfenyl)-4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   12) (3-bromfenyl)-4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxylové kyseliny

   Výše uvedené produkty jsou charakterizovány teplotou tání, elementární analýzou, IČ, ^{1}H a ^{13}C NMR spektry.
4. Série látek jsem podrobila *in vitro* biologickému hodnocení:
   Získala jsem údaje o antituberkulotické aktivitě pouze u některých látek, antifungální aktivitě……..
5. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log *P* a ClogP nově připravených látek: log *P* připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí –1,15 - 1,86 a ClogP v rozmezí –0,22 - 2,81.
6. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (viz. Diskuze).

Literatura

[1] BÁRTŮ, V., Tuberkulóza a její rezistentní formy. [online] *Medical Tribune*, 2006, Ročník II., č. 34, 23. října 2006, [cit. 11. listopad 2006] Dostupné na WWW: <www.medical-tribune.cz>

[2] Solutio, *Tuberkulóza.* [online] Solutio 2000/2001, [cit. 11. listopad 2006] Dostupné na WWW: <http://medon-solutio.cz>

[3] World Health Organization, [online] [cit. 12. února 2007] Dostupné na WWW: <http://www.who.int>

[4] OČKOVÁNÍ proti tuberkulóze (TBC). [online] [cit. 9. října 2006] Dostupné na WWW: <http://www.vakciny.net/pravidelne_ockovani/TBC.htm>

[5] BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V., *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty.* Karolinum, Praha 1998, 192 stran, ISBN: 80-7184-565-5

[6] TRIPANTI, R., P., TEWARI, N., DWIVEDI, N., TIWARI, V., K., Fighting Tuberculosis: An Old Disease with New Challenges. *Medicinal Research Reviews*, 2005, vol. 25, no 1, ©2004 Wiley Periodicals, Inc, p 93-131, ISSN 0198-1128

[7] JANIN, Y., L., Antituberculosis drugs: Ten years research. In *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007 April, vol. 15, no. 1. ISSN: 0968-0896 (Print), 1464-3391 (Electronic)

[8] HAVELKOVÁ, M., *Tuberkulóza*. [online] szu 2004, [cit. 11. října 2006] Dostupné na WWW: <http://www.szu.cz/Menu1/verejnost/tuberkuloza.html>

[9] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., *Základní a aplikovaná farmakologie.* Galén, Karolinum, Praha 2005, 601 stran, ISBN: 80-7262-168-8 (Galén), ISBN: 80-246-0539-4 (Karolinum)

[10] JULÁK, J., *Mikrobiologie 1* (přednáška). [online], 1. Lékařská fakulta Karlovy Univerzity. 2004, [cit. 10. ledna 2007] Dostupné na WWW: <http://lf1.cz/upload/tbc.doc>

[11] HRDINA, R., *Antituberkulotika.* Farmakologie - přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2005

[12] ZHANG, Y., WADE, M., M., SCORPIO, A., ZHANG, H., SUN, Z., Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. October 2003, vol. 52, p.790-795. ISSN: Online 1460-2091, Print 0305-7453

[13] ZHANG, Y., POST-MARTENS, K., DENKIN, S., New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. In *Drug Discovery Today*. January 2006, vol. 11, no. 1/2. p 21-27. ISSN: 1359-64463

[14] POŽARISKIJ, A., F., In *Chim. Geterocikl. Soedin.*, vol 7. 1987, p. 867

[15] PRATT, Y., T., Pratt Y. T.: The Pyrazines and Piperazines. In: *Elderfield R. C.: Heterocyclic Compounds*. 1957, vol. 6., J. Wiley & Sons, New York. p.377

[16] KLEIN, B., HETMAN, N., E., O´DONNELL, M., E., Pyrazines. III. The Action of Phosphoroyl Chloride on Pyrazine N-Oxides, The Journal of Organic Chemistry, 1963, vol. 28, p 1682 – 1686, ISSN: Online 1520-6904, Print 0022-3263

[17] HRABÁLEK, A., a kol., *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1999, 170 stran, ISBN 80-7184-968-5

[18] ČERVINKA, O., a kol., Chemie organických sloučenin, 2. díl, 1. vydání. SNTL/ALFA, 1987

[19] FOKS, H., JANOWIEC, M., ZIELENIECKI, M., *Acta Pol. Pharm.* 1964, vol. 21, p. 429

[20] BERNARDI, L. et al. Gaz. Chim. Ital., 1961, vol. 91, p. 1434. Chem. Abstr. 1962, vol. 57, p. 2223

[21] FOKS, H., JANOWIEC, M., ZIELENIECKI, M., In *Polish Journal of Pharmacology.* 1977, vol. 29, p. 663, ISSN: 03010244

[22] KRÁĽOVÁ, K.- ŠERŠEŇ, F.- SIDOOVÁ, E. *Chemical. Papers*, 1992, vol. 46, p. 348, ISSN: electronic 1336-9075, print 0366-6352

[23] DOLEŽAL, M.- VIČÍK, R.- MILETÍN, M.- KRÁĽOVÁ, K. *Chemical Papers*, 2000, vol. 54, p. 245, ISSN: electronic 1336-9075, print 0366-6352

[24] WALKER, D.A., Preparation of higher plant chloroplasts, *Methods in Enzymology Part C; San Pietro ed*, Academic Press: New York, 1980, vol. 69, p. 94-104

[25] KRÁĽOVÁ, K.- ŠERŠEŇ, F.- MELNIK, M. J., Inhibition of photosynthesis in Chlorella vulgaris by Cu(II) complexes with biologically active ligands. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*. Taylor & Francis 1998, vol. 16, p. 491 – 500, ISSN: 0733-4680

[26] WELLBURN, A..R., *Journal of Plant Physiology*, 1994, vol. 144, p.307. ISSN 0176-1617

[27] DOLEŽAL, M., HARTL, J., MILETIN, M., et al., *Chemical. Papers*, 1999, vol. 53, p. 126, ISSN: electronic 1336-9075, print 0366-6352

[28] DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., HARTL, J., et al. *4th Internetinal Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4)*, [online] September 2000, p 1-30, [cit. 30. dubna 2007] Dostupné na WWW: <http://www.unibas.ch/mdpi/ecsoc-4/c0028/c0028.htm>.

[29] DOLEŽAL, M., KRÁĽOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F., MILETÍN, M., *Folia Pharm. Univ. Carol.*, [online], 2001, vol. 26, p. 13, [cit. 30. dubna 2007] Dostupné na WWW: <http://www.faf.cuni.cz/folia/26/2602dolezal.htm>

[30] DOLEŽAL, M., HARTL, J., MILETÍN, M., et al., *Folia Pharm. Univ. Carol.*, [online], 2000, vol. 25, p. 15, [cit. 30. dubna 2007] Dostupné na WWW: <http://www.faf.cuni.cz/folia/25/2502dolezal.htm>