

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Natálie Živná

SYNTÉZA A *IN VITRO* HODNOCENÍ CYTOTOXICKÉHO ÚČINKU  
POTENCIÁLNÍCH DEKONTAMINAČNÍCH ČINIDEL ZE SKUPINY  
KVARTERNÍCH AMONIOVÝCH SOLÍ

Synthesis and *in vitro* evaluation of cytotoxic effect of potential  
decontaminants based on quaternary ammonium salts

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Markéta Benková

Praha 2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2019

## Abstrakt

Tato práce se zabývá syntézou a biologickým hodnocením potenciálních dekontaminačních činidel ze skupiny kvarterních amoniových solí odvozených od 4-aminopyridinu. U nově připravených látek byl testován cytotoxický efekt na savčí buněčné linii CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary). Na buněčné linii byla měřena hodnota inhibiční koncentrace způsobující 50% inhibici růstu ( $IC_{50}$ ) za použití kolorimetrického MTT testu, při kterém dochází k přeměně žluté tetrazoliové soli životaschopnými buňkami na fialově zabarvený formazan, který je možné hodnotit spektrofotometricky. Byly porovnány hodnoty  $IC_{50}$  připravených látek s hodnotami  $IC_{50}$  benzalkoniových solí používaných jako standardní biocidní látky. Dále byl hodnocen vliv struktury na cytotoxický účinek látek. Nově syntetizované látky byly vyhodnoceny jako toxicitější v porovnání se standardními benzalkoniovými solemi. Byl potvrzen trend, že s rostoucí délkou alkylového řetězce stoupá cytotoxicita.

**Klíčová slova:** cytotoxicita, MTT test, kvarternizace, kvarterní amoniové soli

## Abstract

This work deals with the synthesis and biological evaluation of potential decontaminants based on quaternary ammonium salts derived from 4-aminopyridine. Novel substances were tested for cytotoxic effect on the mammalian cell line CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary). An inhibition concentration of 50 % ( $IC_{50}$ ) was discovered on the cell line while using colorimetric MTT assay, where yellow tetrazolium salts are converted by viable cells into purple formazan, which can be evaluated spectrophotometrically. Values of  $IC_{50}$  were compared with  $IC_{50}$  values of benzalkonium salts used as standard biocides. Furthermore, the effect of structure on cytotoxicity was evaluated. Novel substances were found to be more toxic in comparison to standard benzalkonium salts. A trend was confirmed—the longer the alkyl chain, the higher its cytotoxicity.

**Key words:** cytotoxicity, MTT assay, quaternisation, quaternary ammonium salts

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia i při zpracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Markétě Benkové, která se mi pečlivě věnovala při výzkumu i sepisování bakalářské práce, PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. za pomoc se syntézou látek a doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. a doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. za umožnění pracovat na tématu, které jsem si vybrala. Děkuji pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Mgr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. za analýzu syntetizovaných látek.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>10</b>
2.1	<i>Dekontaminační metody</i> .....	10
2.1.1	Dezinfekce.....	11
2.1.1.1	Fyzikální dezinfekce.....	11
2.1.1.2	Chemická dezinfekce.....	12
2.2	<i>Kvarterní amoniové soli</i> .....	14
2.2.1	Struktura.....	14
2.2.2	Mechanismus účinku.....	15
2.2.3	Použití KAS.....	17
2.2.4	Obecný postup přípravy KAS.....	17
2.3	<i>Tetrazoliové kolorimetrické testy pro stanovení cytotoxického účinku</i> .....	18
2.3.1	MTT test.....	18
2.3.2	MTS test.....	20
2.3.3	XTT test.....	20
2.3.4	WST-1 test.....	21
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>23</b>
4.1	<i>Metodika – organická syntéza</i> .....	23
4.1.1	Použitý materiál a chemikálie.....	23
4.1.2	Zpracování výsledků.....	23
4.1.3	Syntéza 4-amino-1-dodecylpyridinium bromidu (NŽ10).....	25
4.1.4	Syntéza 4-amino-1-tetradecylpyridinium bromidu (NŽ12).....	26
4.1.5	Syntéza 4-amino-1-hexadecylpyridinium bromidu (NŽ13).....	27
4.1.6	Syntéza 4-acetylamino-1-pyridinium bromidu (NŽ21).....	28

4.2	<i>Metodika – testování cytotoxicity</i> .....	29
4.2.1	Použitý materiál a instrumentální vybavení .....	29
4.2.2	Protokol .....	32
4.2.3	Zpracování a hodnocení získaných dat.....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>36</b>
5.1	<i>Organická syntéza</i> .....	36
5.2	<i>Testování cytotoxicity</i> .....	40
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>43</b>

## Seznam zkratek a symbolů

CHO-K1	Ovariální buňky křečka čínského (Chinese Hamster Ovary)
DMSO	Dimethylsulfoxid
G+	Gram-pozitivní
G-	Gram-negativní
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	High resolution mass spectroscopy
IC <sub>50</sub>	Polovina maximální inhibiční koncentrace (inhibitory concentration)
KAS	Kvarterní amoniové soli
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)- <i>2H</i> -tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
WST-1	2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)- <i>2H</i> -tetrazolium
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)- <i>2H</i> -tetrazolium-5-karboxanilid



# 1 Úvod

Nozokomiální nákazy jsou definované jako nákazy, jejichž vznik souvisí s pobytem nebo ošetřením ve zdravotnickém zařízení [1]. Ve vyspělých státech tvoří tyto infekce 7% podíl z celkového množství registrovaných infekčních onemocnění, v rozvojových zemích se jedná až o 10% podíl [1]. Nozokomiální nákazy je možné omezit různými strategiemi - využitím kontrolních programů, antimikrobiálních přípravků nebo omezením nadužívání antibiotik. Rezistentní kmeny bakterií už ale existují a stále vznikají nové. Jedním ze způsobů, jak zajistit dekontaminaci prostředí, objektů a osob, kde se tyto kmeny nachází, je používáním a střídáním antimikrobiálních látek. Do této skupiny látek spadají i kvarterní amoniové soli, jejichž uplatnění v praxi je široké.

Volbu antimikrobiálního prostředku ovlivňuje mnoho faktorů: citlivost každého druhu mikroorganismu na dezinfekční prostředek je jiná, účinek na různé mikroorganismy se liší, dezinfekční prostředek má působit na celý povrch dezinfikovaného objektu a nesmí poškozovat dezinfikované objekty či aplikující personál [2]. Pro optimalizaci všech faktorů je nutné rozšiřovat paletu dezinfekčních přípravků o nové látky, následně je charakterizovat a testovat jejich účinnost. Prvním krokem po syntéze nových látek mohou být cytotoxické testy na buněčných liniích pro určení  $IC_{50}$ , což je koncentrace, kdy dochází k 50% inhibici růstu buněk. Tyto testy definují bezpečnost použití látky, a zda je možné ji používat i na lidi.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Dekontaminační metody

V roce 1847 Ignác Filip Semmelweis, maďarský lékař, položil základy antiseptiky návrhem mytí rukou před lékařským zákrokem [3]. Za tento návrh byl z práce propuštěn. V jiné nemocnici však na jeho nápad pohlíželi jinak. Po uvedení jeho návrhu do praxe se snížil počet úmrtí žen při porodu z 25 % na pouhé 1 %. V roce 1876 Robert Koch, německý lékař a mikrobiolog, zjistil, že původcem mnohých nemocí jsou patogenní bakterie [4].

Objev antibakteriálních vlastností penicilinu Alexandrem Flemingem z roku 1928 vedl k rozvoji nových antibiotických látek a následnému snížení morbidity a mortality důsledkem bakteriální infekce [3]. Antibiotika zasahují do různých růstových fází bakterií. Bakterie jsou schopny se na tento mechanismus adaptovat a opět se množit. V dnešní době dochází k nadužívání antibiotik, a i díky tomuto se rezistence bakterií silně zvýšila. Mnoho bakterií disponuje schopností přežít na suchých, neživých objektech po dobu mnoha měsíců, což ohrožuje pacienty v nemocničních zařízeních nozokomiální nákazou [5].

Biocidní dezinfekční látky, do kterých se řadí i námi syntetizované a testované kvarterní amoniové soli (KAS), na rozdíl od antibiotik zabíjejí bakterie nespecifickým způsobem, což bakteriím snižuje šanci vybudovat si rezistenci [3]. Rezistence bakterií a virů je stále rostoucím trendem, a proto je nutné vyvíjet nové látky a snažit se je zavádět do praxe.

Dekontaminace jako pojem shrnuje všechny procesy odstraňující nebezpečné látky, radioaktivitu nebo mikroorganismy z prostředí, předmětů nebo osob [2]. Podle úrovně účinnosti se dekontaminace dělí na sanitaci (nebo-li mechanickou očistu), dezinfekci, vyšší stupeň dezinfekce a sterilizaci [6]. Sanitace je řada postupů, které snižují nebo odstraňují nečistoty chemického původu nebo biofilmy. Dezinfekce zahrnuje snížení či odstranění mikroorganismů. Vyšší stupeň dezinfekce zahrnuje usmrcení mikroorganismů, ale ne zneškodnění vysoce rezistentních spor. Sterilizační procesy vedou k usmrcení mikroorganismů včetně spor [6]. KAS se řadí především do

dezinfekčních činidel, proto jsou v této práci rozebrány více dezinfekce.

### 2.1.1 Dezinfekce

Pro začátek je nutné pochopit rozdíl mezi dezinfekcí a sterilizací [6]. Dezinfekce je redukce mikroorganismů na úroveň přijatelnou pro další použití objektu a pro přerušení cesty nákazy od zdroje k hostiteli. Sterilizace je očištění povrchu od všech životaschopných mikroorganismů včetně odolných spor. Dezinfekce se rozděluje na fyzikální, chemickou a fyzikálně-chemickou. Fyzikálně-chemická dezinfekce využívá současného působení fyzikálních i chemických postupů. V praxi se používá např. paroformaldehydová dezinfekční komora, která využívá vodní páru o 45 – 75 °C a páry formaldehydu [2,7]. Fyzikálně-chemické metody v následujících kapitolách nejsou podrobněji rozebírány.

#### 2.1.1.1 Fyzikální dezinfekce

Metody fyzikální dezinfekce bývají ekologicky šetrnější než metody chemické [2,6]. Do metod fyzikální dezinfekce se řadí var ve vodě za atmosférického tlaku po dobu 30 minut, var v přetlakových nádobách po dobu 20 minut, užití páry s teplotou vyšší než 90 °C po dobu 10 minut, proudící horký vzduch o teplotě 110 °C po dobu 30 minut, pasterizace, UV záření, chlad, filtrace a spalování. Filtrace není formálně považována za dezinfekční metodu, není biocidní, jedná se pouze o fyzické odstranění mikroorganismů z plynů nebo kapalin. V této kapitole jsou podrobněji rozebrány metody využívající teplo, chlad a radiaci, které jsou v praxi nejběžnější.

#### **Teplo**

Dezinfekce teplem se využívá v praxi velmi často a funguje téměř univerzálně [8]. Jedná se o přenos energie z jednoho systému do druhého na základě rozdílu teplot. Teplo přechází z okolí na objekt kondukcí (přes povrch), konvekcí (přes kapalinu nebo plyn) nebo radiací (přes elektromagnetické záření nebo částice). Teplo je letální pro všechny mikroorganismy, účinek se liší pouze tolerancí k různě vysokým teplotám [8].

Vlhké teplo je velmi účinné a v praxi často používané [8]. Energie se přenáší vodou, která má vysokou tepelnou kapacitu a přenáší tak energii efektivně. Provedení dezinfekce vlhkým teplem probíhá ponořením do horké vody nebo využitím vodní páry. Suché teplo se používá hlavně při teplotách vyšších než 140 °C [9]. Známým užitím této metody v průmyslu je pasterizace mléka.

Při užití tepelné dezinfekce je nutné zvážit nevýhody [8]. Při pasterizaci může dojít ke změně chuti produktu [10], může dojít k degradaci dezinfikovaného materiálu, chirurgické nástroje by se měly používat ihned po vychladnutí. U některých gramnegativních bakterií může dojít k uvolnění endotoxinů [11].

## **Chlad**

Metoda využívající chlad je spíše vhodná pro uchování mikroorganismů než k jejich likvidaci [8]. Snížení teploty pod 10 °C má biostatické až biocidní účinky. V počátku dochází k zastavení činnosti enzymů v buňce, čímž se zastaví reprodukce. Pro uchování je nutné zvážit, zda zvolený mikroorganismus není psychrofilní, tedy zda nemá schopnost se množit ještě při 4 °C.

## **Radiace**

Radiace je přirozený proces, kdy se nestabilní jádro zbavuje přebytečné energie do bodu stability rozpadem na částice nebo vyzářením elektromagnetického záření [8,12]. Vznik vysoce energetických částic je pro mikroorganismy letální. V praxi se  $\alpha$  částice nevyužívá, protože není dostatečně pronikavá. Využívají se pouze urychlené částice  $\beta$  a záření  $\gamma$ , z neionizujícího záření pak nejvíce UV záření.

### **2.1.1.2 Chemická dezinfekce**

Chemická dezinfekce slouží ke zničení mikroorganismů roztokem nebo aerosolem o předem definovaném složení a koncentraci [2]. Provedení může být postřikem, ponořením, otřením, pěnou či aerosolem. Množství použitého přípravku je stanovené tak, aby se dosáhlo dostatečné účinnosti dezinfekce a zároveň aby nedocházelo ke zbytečnému poškození životního prostředí. U chemických přípravků je nutné sledovat

jejich účinky - bakteriostatické látky inhibují růst bakteriální kultury, baktericidní přípravky je usmrcují [8]. Do skupiny chemických dezinfekcí se řadí zásady a kyseliny, oxidační prostředky, halogeny, sloučeniny těžkých kovů, alkoholy, aldehydy, tenzidy a cyklické sloučeniny [6]. Do skupiny tenzidů patří KAS, kterým je věnována samostatná kapitola. V této kapitole jsou rozebrány pouze některé skupiny látek.

### **Zásady a kyseliny**

Organické kyseliny se využívají hlavně pro prezervaci a v menší míře jako dezinfekční činidla [13]. Silné anorganické kyseliny, jako například kyselina chlorovodíková nebo sírová, mají v nižších koncentracích bakteriostatické účinky, ve vyšších působí baktericidně. Kyselina chlorovodíková je efektivní i proti sporám kmene *Bacillus subtilis* [14]. Běžně se ale tyto kyseliny nevyužívají z důvodu bezpečnosti.

Vysoce koncentrované roztoky hydroxidu sodného a hydroxidu draselného se používají k čištění a dezinfekci nemocničních předmětů, například nástrojů, které přišly do kontaktu s krví [8]. Tyto zásady fungují na široké spektrum mikroorganismů, a také na priony, které vykazují velmi vysokou odolnost vůči dezinfekčním metodám. Obecně těmto hydroxidům odolávají pouze některé extrémofilní organismy. Nevýhodou je, že při jejich použití dochází k poškození povrchů nástrojů.

### **Aldehydy**

Z aldehydů jsou svými účinky nejvýznamnější glutaraldehyd a *ortho*-ftalaldehyd, které fungují jako nízkoteplotní, tekuté dezinfekční prostředky pro nemocniční nástroje citlivé na vysokou teplotu, např. endoskop [13]. Fungují dobře v rozmezí pH 4–9, ale se zvyšujícím se pH jejich antimikrobiální aktivita stoupá. V alkalickém prostředí však může docházet k polymerizaci, která snižuje životnost těchto dezinfekčních prostředků [11,12]. Formaldehyd, který se také řadí do této skupiny, se používá jako povrchová dezinfekce v laboratorním prostředí. Používání aldehydů se kvůli korozivním účinkům omezilo.

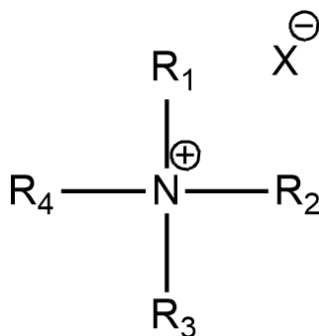
## 2.2 Kvarterní amoniové soli

Ačkoliv se o baktericidních účincích KAS vědělo již na začátku 20. století, zájem o ně na trhu nastal až v roce 1935 [15]. Jako dostupné dezinfekční prostředky byly dříve soli odvozené od rtuti, u kterých byl problém s toxicitou, a alkohol, který byl drahý. Očekávalo se, že dezinfekční přípravky budou bez zápachu, bezbarvé, dobře rozpustné ve vodě a budou mít dobrou účinnost. Tyto požadavky splňoval *N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzenmethanamonium chlorid, známý pod názvem Zephirol [15].

### 2.2.1 Struktura

KAS patří z chemického hlediska do povrchově aktivních látek a jsou obecného vzorce  $\text{NR}_4^+\text{X}^-$  (viz obr. 2.1) [16]. Pozitivně nabitou částí je kvarterní atom dusíku, který je kovalentně vázaný na čtyři atomy uhlíku, R nejčastěji zastupují uhlovodíkové zbytky. Kvarterní dusík zde využívá všechny své valenční elektrony. Tři elektrony vstupují do kovalentní vazby a zbývající dva do vazby donor-akceptorové, což dusíku poskytuje kladný náboj. Kvarterní kation není závislý na pH. Aniontovou část  $\text{X}^-$  zastávají většinou halogenidy, ale je možné se setkat i s jinými aniontovými skupinami [13].

S jejich strukturou souvisí jejich baktericidní účinky. Antimikrobiální aktivitu lze tak snadno modifikací struktury uzpůsobit pro dané potřeby [3]. Pro vysokou antimikrobiální aktivitu je nutné, aby alespoň jedna ze čtyř alkylových skupin byla v počtu uhlíků  $\text{C}_8 - \text{C}_{18}$  [13].



**Obr. 2.1:** Obecný vzorec KAS (kresleno v ChemDraw Ultra 12.0).

### 2.2.2 Mechanismus účinku

Schéma interakce KAS a cíleného mikroorganismu je možné popsat třemi kroky [13]. Při prvním kroku dochází k navázání biocidní látky na buněčnou stěnu, následně dochází k proniknutí látky skrz membránu do cytoplasmy, kde může reagovat s intracelulárními proteiny a nukleovými kyselinami. Při proniknutí látky do buňky dochází k rozrušení buněčné stěny, buňka ztratí svou integritu a dojde k úniku obsahu do okolí. Mechanismus účinku se však pro různé chemické látky liší.

#### **Antimikrobiální účinek**

Obecně je známo, že KAS působí na buněčnou membránu bakterií, což po zničení integrity buňky vede k jejímu zániku [3]. Tento proces není úplně objasněný na molekulární úrovni a existují dvě teorie.

Buněčná stěna grampozitivní (G+) a gramnegativní bakterie (G-) se liší [8]. Mnoha studiemi bylo prokázáno, že G+ bakterie byly více citlivé k biocidním látkám. Struktura buněčné stěny se skládá z několika vrstev peptidoglykanu a teichoové kyseliny [17–19]. G+ bakterie mají pouze jednu fosfolipidovou dvojvrstvu, a to v cytoplazmatické membráně. Buněčná stěna G+ bakterií tak snadno propouští látky o vysoké molekulové hmotnosti, což vysvětluje jejich vyšší citlivost vůči KAS a dalším bakteriocidním látkám.

G- bakterie vykazují vyšší rezistenci proti biocidním látkám [8]. Cytoplazmatická membrána je chráněna jednou vrstvou peptidoglykanu, který je lipoproteiny ukotven k vnější lipidové dvojvrstvě, která se skládá z fosfolipidů (na vnitřní straně) a z glykolipidů (vnější strana), které jsou kryté lipopolysacharidy [20]. Přidaná lipidová dvojvrstva je účinnější ochrana pro G- bakterie proti biocidním látkám.

Cytoplazmatická membrána je tvořena dvěma vrstvami fosfolipidů [7,16]. Fosfolipidy v membráně se skládají z hydrofobních uhlíkatých ocasů z mastných kyselin, z nichž jeden bývá nenasycený, a z hydrofilní hlavy, která se skládá z fosfátu a glycerolu. Na glycerol se navazují uhlíkaté ocase. Tato struktura jim poskytuje amfifilní charakter. V buňce je dvojvrstva tvořena tak, že hydrofobní části molekul jsou uvnitř

dvojvrstvy a hydrofobní jsou na okraji [8,21]. Fosfolipidy nesou záporný náboj, který je vyvážen vápenatými a hořečnatými kationty. Peptidoglykanová vrstva je polysacharidový útvar, který obsahuje opakující se jednotky sacharidů *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylmuramové kyseliny, dává buňce tvar a stabilitu a chrání snadno poškoditelnou fosfolipidovou membránu. Peptidoglykanová vrstva je propustná pro různé metabolity, ale i pro některé cizorodé látky, kam patří i KAS. G+ bakterie mají peptidoglykanovou vrstvu přibližně 4x silnější oproti G- bakteriím. KAS jsou účinné především vůči G+ bakteriím, pro které může být letální koncentrace od 0,0005 %, přibližně od 0,0033 % začínají být letální i pro G- bakterie [22]. KAS jsou účinné, jen pokud jsou samy amfifilního charakteru a shodují se tedy s charakterem fosfolipidů. Alkylový řetězec následně rozruší fosfolipidovou vrstvu a buňka přijde o svou integritu a esenciální látky pro její životaschopnost.

Druhý mechanismus se zakládá na tom, že rozrušení buňky souvisí s rozdílnou afinitou k aniontům [8]. Pokud by tedy pozitivně nabité KAS pronikly do buňky, tak je pro vyrovnání náboje nutné, aby se jiné kationty, například vápenaté, z povrchu membrány odloučily. Tyto kationty jsou nutné pro stabilizaci fosfolipidové membrány a jejich absence způsobí její rozpadnutí. Tento mechanismus by vysvětloval, proč jsou KAS toxičtější pro prokaryotní buňky než pro eukaryotní. Vnější vrstva eukaryotních buněk je tvořena lipidy s amfoterním charakterem, nepotřebuje tedy jiné kationty pro stabilitu.

KAS jsou nejúčinnější vůči G+ bakteriím, proti jiným mikroorganismům je jejich účinek nižší, například proti virům je jejich aktivita omezená [13]. Působí hlavně proti lipofilním virům, kam se řadí například herpes simplex virus, ale proti hydrofilním (neobaleným) virům má velmi slabé účinky. KAS působí také na houby, ačkoliv se jedná spíše o účinky statické než fungicidní [23]. G- bakterie, jako *E. coli*, *P. aeruginosa* a *S. typhimurium*, KAS po přijmutí do buňky opět vylučují [24]. Bylo hlášeno mnoho případů, kdy roztok KAS byl kontaminován G- bakteriemi. Antimykobakteriální účinky KAS nemají, zřejmě kvůli hydrofobní povaze membrány mykobakterií [13].



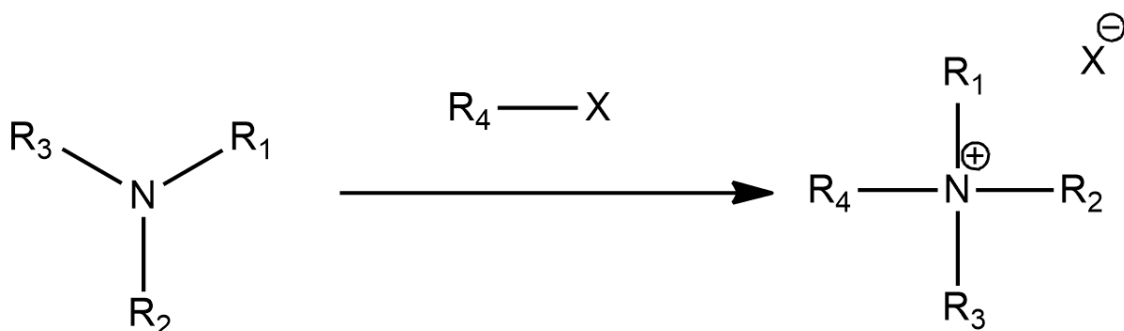
### 2.2.3 Použití KAS

KAS se často využívají v kosmetickém průmyslu [13]. Benzalkonium chlorid se používá k ošetření neporušené kůže před operací. Krémy připravované z KAS se používají u dětí na ošetření vyrážky z plín způsobené mikroorganismy produkující amoniak [13]. V některých státech je benzalkonium chlorid jeden z mála uznaných přípravků pro prezervaci očních kapek [25]. Benzethonium chlorid se používá pro redukci růstu zelených řas v bazénech [13]. Cetylpyridinium chlorid se využívá hlavně v kosmetickém průmyslu, například do deodorantů, pěn po holení nebo šamponů.

Díky těmto vlastnostem jsou KAS využívány pro klinické účely a často jako antiseptika [26].

### 2.2.4 Obecný postup přípravy KAS

Popisy první syntézy KAS se v publikacích objevily koncem 19. století [27]. Obecně existovaly tři způsoby syntézy. První je neutralizace volné amonné báze kyselinou, druhá je konverze, kdy dojde ke vzniku nerozpustné látky a KAS a třetí je alkylace aminů. Alkylace terciárních aminů probíhá pomocí alkylhalogenidu (viz obr. 2.2) [28]. Jedná se o tzv. couplingovou reakci. Poprvé byla popsána v roce 1890 N. Menshutkinem, po němž byla pojmenována [28].



Obr. 2.2: Schéma alkylace terciárního aminu (kresleno v ChemDraw Ultra 12.0).

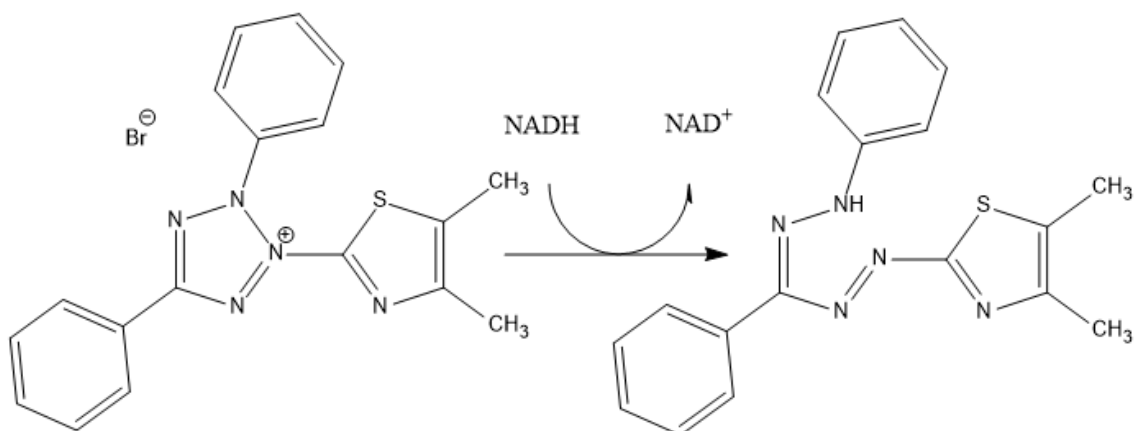
## 2.3 Tetrazoliové kolorimetrické testy pro stanovení cytotoxického účinku

Pro *in vitro* stanovení cytotoxického účinku testovaných látek je nutné znát počet životaschopných buněk na konci experimentu. Pro tato stanovení je možné využít kvantitativní kolorimetrické testy, které jsou založené na tetrazoliových solích [29]. Strukturně jsou tyto látky heterocyklické organické sloučeniny, které byly poprvé připraveny v roce 1894. Až v roce 1941 byly tyto látky propojeny s biologickými výzkumy [30]. Touto metodou je možné detekovat pouze živé buňky a signál získaný z těchto buněk je závislý na jejich aktivitě. Kromě cytotoxicity se testy buněčné viability používají i ke sledování proliferace nebo činnosti organel [29].

Tetrazoliové soli by se daly rozdělit do dvou skupin na základě náboje. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) má náboj kladný, což mu umožňuje vstup do buňky. Negativně nabitě jsou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2*H*-tetrazolium (MTS), 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2*H*-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) a 2-(4-iodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2*H*-tetrazolium (WST-1), které do buňky nevstupují, a jsou většinou používány spolu s akceptorem elektronů pro umožnění redukce tetrazolia na jeho zbarvený produkt formazan [31].

### 2.3.1 MTT test

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) test je založen na enzymy (dehydrogenasy, oxidoreduktasy) katalyzované redukci žlutého rozpustného tetrazoliového barviva na tmavě modrý (často také označovaný jako fialový) formazan (viz obr. 2.3) [31]. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné množství životaschopných buněk. Pomocí spektrofotometrických metod je možné zjistit změny absorbance při vlnové délce 570 nm, při které má formazan absorpční maximum, a referenční vlnové délce 630 nm.



**Obr. 2.3:** Struktura MTT, formazanu a průběh redukce MTT na formazan (překresleno z [31] pomocí softwaru ChemDraw Ultra 12.0).

Touto metodou je možné určit pouze živé buňky, mrtvé ztrácejí schopnost redukovat MTT na formazan [32]. Mechanismus této reakce není zcela objasněný, ale testy na mitochondriích izolovaných z krysí buněčné linie B12 ukázaly, že v přítomnosti sukcinátu, malátu a glutamátu dochází k redukci MTT [32]. Metabolická reakce těchto látek probíhá v přítomnosti NADH, což je koenzym oxidačně-redukčních reakcí. Tato studie ale nevyklučuje podíl jiných buněčných organel, například endosomů a lysosomů, na redukci MTT.

U této metody je několik problematických aspektů [29]. V první řadě se jedná o špatně rozpustné krystaly formazanu, které se hromadí převážně uvnitř buněk a je nutné je před měřením absorbance rozpustit. Dříve se pro rozpouštění využíval ethanol, ale docházelo k precipitaci proteinů, které interferovaly s měřením. Následně se začala doporučovat jiná rozpouštědla, jako například isopropanol [31]. Další komplikací byla živná média pro buňky, která mohou obsahovat fenolovou červeně. Ta při určitém pH může interferovat s optimální vlnovou délkou pro modrý formazan. Pokud je tohoto kroku třeba, dá se vyřešit převedením fenolové červeně na její žlutou formu snížením pH [29].

Ačkoliv je tato metoda závislá na živých buňkách, chemikálie MTT je sama o sobě toxická a může aktivovat faktory spouštějící apoptózu. Inkubace je časově limitovaná.

Bylo zjištěno, že po dvouhodinové inkubaci 70 % buněk vykazovalo probíhající apoptózu nebo buněčnou smrt [33]. Na poškození buněk se také podílí krystaly formazanu jehličkovitého tvaru, které porušují integritu buněčné membrány, což může vést ke smrti buňky. I přes veškeré výše zmíněné nevýhody MTT testu, které se dají snadno vyřešit, stále zůstává jednoduchou, časově nenáročnou a přesnou metodou.

### 2.3.2 MTS test

Při MTS testu dochází k tvorbě formazanu, který je v živném médiu rozpustný. Touto metodou je možné vyloučit krok nutný k rozpuštění formazanu [31]. Negativně nabitá tetrazoliová sůl MTS má díky svému náboji usnadněné rozpouštění ve vodě, ale dochází k zabránění jejího vstupu do buněk. Proto je nutné dodat takovou látku, například fenazin methyl sulfát, která se do buňky dostane, zredukuje se, buňku opustí a přemění tetrazolium na formazan [31].

### 2.3.3 XTT test

XTT je další látka ze skupiny tetrazoliových solí, která je redukována dehydrogenasami živých buněk na rozpustný oranžový formazan [31,34]. Rozpustnosti bylo dosaženo přítomností dvou funkčních skupin sulfonových kyselin obsažených v XTT, které ovlivnily celkový náboj sloučeniny. Testy založené na XTT oproti výše zmíněnému MTT tedy vynechávají krok, kdy je nutné intracelulární formazan rozpouštět [35]. Testování této metody v porovnání s MTT ukázalo, že ani po čtyřhodinové inkubaci nebylo XTT dostatečně zredukováno [29]. Nicméně, s činidlem, které se chová jako akceptor elektronů, se redukce XTT na formazan výrazně zlepšila. Při testech na mnohých lidských buněčných liniích (např. H23, MCR-5 nebo P388) bylo zjištěno, že zredukováná látka XTT není pro buňky toxická. I po 96-ti hodinách si buňky zachovaly schopnost metabolizovat XTT [34]. Při porovnávání MTT a XTT byla absorbance po provedení MTT testu měřena při 540 nm a po XTT eseji při 450 nm [34].

#### 2.3.4 WST-1 test

WST-1 je hlavním zástupcem ve vodě rozpustných tetrazoliových solí [31]. Díky této vlastnosti se v porovnání s MTT testem opět může vynechat krok nutný pro rozpuštění formazanu [34]. Rozpustnosti ve vodě bylo dosaženo přidáním kladného nebo záporného náboje nebo hydroxyskupin na aromatické jádro soli. Látky z této skupiny obsahují záporný náboj nesený sulfonovou kyselinou.

### 3 Cíl práce

Cílem práce je syntetizovat nové látky ze skupiny KAS dvěma různými způsoby a následně porovnat reakce s literaturou. Dalším cílem je pro nově syntetizované látky zjistit hodnotu  $IC_{50}$  a porovnat ji se standardními benzalkoniovými solemi a diskutovat vztah mezi cytotoxicitou a strukturou látek.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Metodika – organická syntéza

#### 4.1.1 Použitý materiál a chemikálie

##### **Chemikálie pro organickou syntézu**

- 4-aminopyridin 98% (A78403, Sigma-Aldrich)
- 1-bromdodekan min. 95% (16970, Sigma-Aldrich)
- 1-bromtetradekan 97% (195332, Sigma-Aldrich)
- 1-bromhexadekan 97% (234451, Sigma-Aldrich)
- 1-butanol 99,9% (537993, Sigma-Aldrich)
- Diethylether p.a. (603-022-00-4, Penta Chemicals)
- Methanol p.a. (603-001-00-X, Penta Chemicals)
- Kyselina octová min 99% (A6283, Sigma-Aldrich)
- Dichlormethan bezvodý min. 99,8% (270997, Sigma-Aldrich)
- Chloroform p.a. (17130-12500, Penta Chemicals)

##### **Instrumentální vybavení pro syntézu**

- TLC: Silica gel Aluminium Plate 60 F<sub>254</sub> (Merck)
- Rotační vakuová odparka (4053676, Heidolph)
- Míchačka magnetická s topením AREA (263217, Velp Scientifica)
- Bodotávek Intaco Micro (Intaco Micro spol. s.r.o.)

#### 4.1.2 Zpracování výsledků

##### **Nukleární magnetická rezonance (NMR)**

Struktura připravených látek byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H NMR a <sup>13</sup>C NMR na přístroji Varian VNMR S500, s pracovní frekvencí 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C, od firmy Varian Comp. (Palo Alto, USA). Chemický posun ( $\delta$ ) je uvedený v jednotkách ppm a je vztažen k tetramethylsilanu, který je používán jako interní standard. Analýzu prováděli pracovníci Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty

Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### **Hmotnostní spektrometrie**

Spektra s vysokým rozlišením byla získána pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s hmotnostním spektrometrem (MS). HPLC systém použitý pro měření byl Dionex Ultimate 3000 UHPLC: RS pumpa, RS kolonový kompartment, RS autosampler, detektor diodového pole řízený softwarem Chromeleon 6.80. Hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus Orbitrap byl propojen pomocí HESI (heated electrospray ionization) zdroje a ovládán softwarem Thermo Xcalibur 3.1.66.10. Analýza byla provedena pracovníky Centra biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

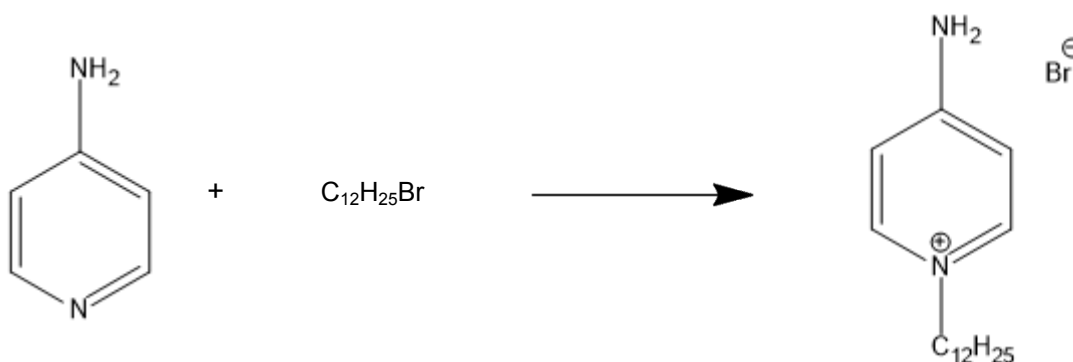


### 4.1.3 Syntéza 4-amino-1-dodecylpyridinium bromidu (NŽ10)

Tab. 4.1: Reakční množství výchozích látek a teoretický výtěžek reakce.

	m [g]	n [mol]	M <sub>r</sub> [g/mol]	V [ml]	d [g/ml]
4-aminopyridin	2,01	$2,14 \cdot 10^{-2}$	94,11	-	-
dodecylbromid	7,94	$3,19 \cdot 10^{-2}$	249,25	7,64	1,04
NŽ10	7,35	$2,14 \cdot 10^{-2}$	343,35	-	-

#### Reakční schéma:



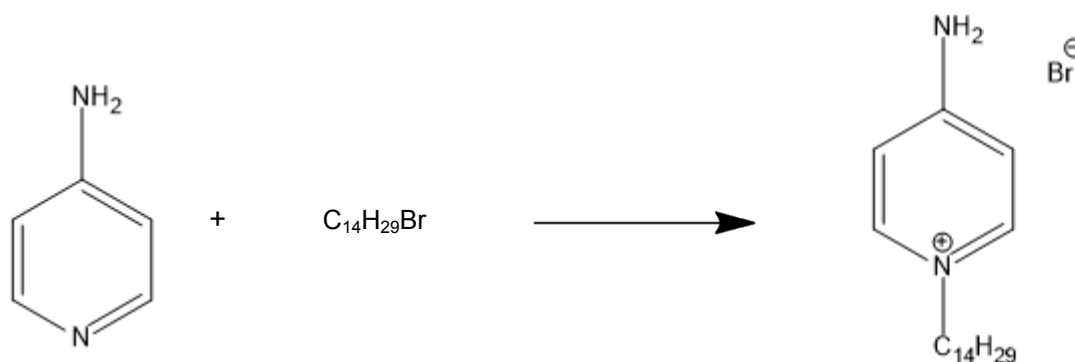
**Postup:** Při syntéze látky byl použit modifikovaný postup z článku [36], navážky výchozích látek s teoretickým výtěžkem produktu jsou uvedeny v tab. 4.1. Výchozí látka 4-aminopyridin (21,4 mmol) byla rozpuštěna v 1,00 ml butan-1-olu. Následně bylo přidáno 7,64 ml dodecylbromidu (31,9 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni na 180 °C po dobu 2 hodin. Nezareagovaný dodecylbromid byl odstraněn rekrystalizací produktu z 50 ml diethyletheru. Směs byla zahřáta na teplotu 40 °C, poté přefiltrována přes fritu se zrnitostí S4. Pro monitorování reakce bylo používáno TLC s mobilní fází methanol/kyseliny octová (10:1).

#### 4.1.4 Syntéza 4-amino-1-tetradecylpyridinium bromidu (NŽ12)

Tab. 4.2: Reakční množství výchozích látek a teoretický výtěžek reakce.

	m [g]	n [mol]	M <sub>r</sub> [g/mol]	V [ml]	d [g/ml]
4-aminopyridin	2,01	$2,14 \cdot 10^{-2}$	94,11	-	-
tetradecylbromid	8,73	$3,15 \cdot 10^{-2}$	277,33	9,37	0,932
NŽ12	7,95	$2,14 \cdot 10^{-2}$	371,40	-	-

#### Reakční schéma:



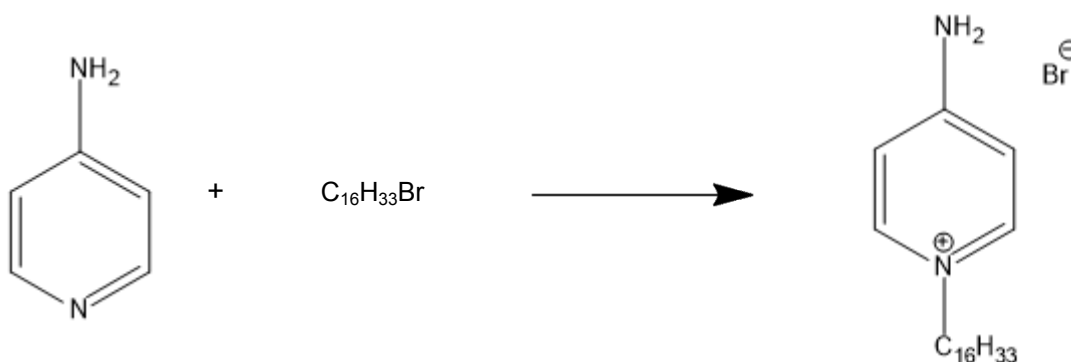
**Postup:** Postup je modifikován dle článku [36], navážky výchozích látek spolu s teoretickým výtěžkem jsou uvedeny v tab. 4.2. V baňce byl rozpuštěn 4-aminopyridin (21,4 mmol) v 1,00 ml butan-1-olu. Baňka byla vložena do olejové lázně o teplotě 180 °C a bylo přidáno 9,37 ml tetradecylbromidu (31,5 mmol). Po 2 hodinách byla reakce zastavena a přivedena na laboratorní teplotu. Do baňky bylo přilito 50 ml diethyletheru a bílá sraženina, která v reakční směsi vznikla, v něm byla rozmíchána. Reakční směs byla přivedena k 40 °C a následně za horka zfiltrována přes fritu S4. Pro monitorování reakce bylo použito TLC s mobilní fází methanol:kys. octová (10:1).

#### 4.1.5 Syntéza 4-amino-1-hexadecylpyridinium bromidu (NŽ13)

Tab. 4.3: Reakční množství výchozích látek a teoretický výtěžek reakce.

	m [g]	n [mol]	M <sub>r</sub> [g/mol]	V [ml]	d [g/ml]
4-aminopyridin	2,01	$2,14 \cdot 10^{-2}$	94,11	-	-
hexadecylbromid	9,62	$3,15 \cdot 10^{-2}$	305,36	9,63	0,999
NŽ13	8,54	$2,14 \cdot 10^{-2}$	399,47	-	-

#### Reakční schéma:



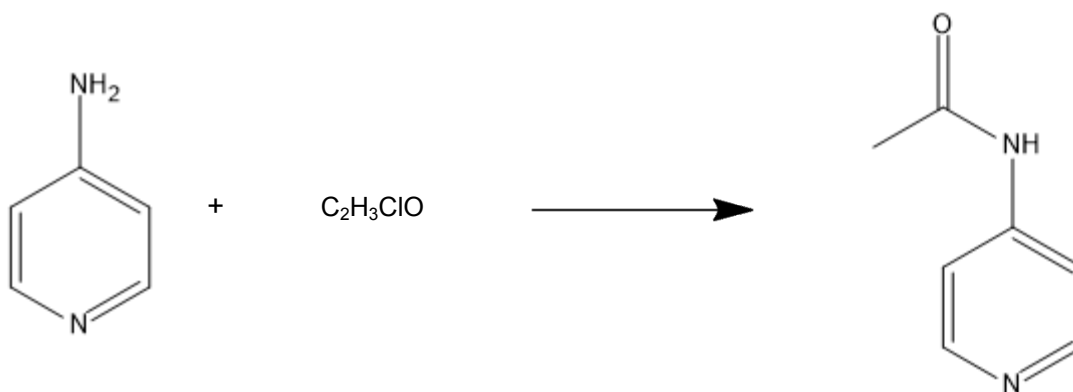
**Postup:** Postup byl modifikován podle článku [36], navážky výchozích látek a teoretický výtěžek produktu jsou uvedeny v tab. 4.3. V 1,00 ml butan-1-olu byl rozpuštěn 4-aminopyridin (21,4 mmol). Reakční směs byla přivedena ke 180 °C a do baňky bylo přidáno 9,63 ml hexadecylbromidu (31,5 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází chloroform:methanol (10:1). Po dvou hodinách byla reakce ukončena. Jakmile reakční směs byla o laboratorní teplotě, bylo přidáno 50 ml diethyletheru a baňka byla zahřáta na 40 °C. Bílá sraženina, která v reakční směsi vznikla, byla odfiltrována na fritě se zrnitostí S4.

#### 4.1.6 Syntéza 4-acetylaminopyridinium bromidu (NŽ21)

Tab. 4.4: Reakční množství výchozích látek a teoretický výtěžek reakce.

	m [g]	n [mol]	M <sub>r</sub> [g/mol]	V [ml]	d [g/ml]
4-aminopyridin	4,00	$4,25 \cdot 10^{-2}$	94,11	-	-
acetylchlorid	5,01	$6,42 \cdot 10^{-2}$	77,99	4,53	1,104
NŽ21	5,78	$4,25 \cdot 10^{-2}$	136,06	-	-

#### Reakční schéma:



**Postup:** Postup byl modifikován podle článku [36], navážky výchozích látek a teoretický výtěžek produktu jsou uvedeny v tab. 4.4. Do dvojhrdlé baňky byl navážen 4-aminopyridin (42,5 mmol). Následně byl přidán chladič se septem a do baňky byla zavedena inertní atmosféra dusíku. Do bočního otvoru byla umístěna příkapávací baňka s 20 ml bezvodého dichlormethanu a 4,53 ml acetylchloridu (64,2 mmol). Tato směs byla k 4-aminopyridinu za stálého míchání pomalu příkapávána. Po dobu příkapávání byla baňka umístěna v ledové lázni. Po smíchání výchozích látek byla reakční směs zahřáta na 40 °C po dobu dvou hodin. Po vytemperování na pokojovou teplotu byla směs filtrována. Získané krystaly byly rozpuštěny v mobilní fázi a aplikovány na 60 cm dlouhou kolonu plněnou silikagelem. Kolona byla promývána isokratickou elucí chloroform:methanol (10:1). Frakce byly sbírány do 30ml baněk. TLC o poměru rozpouštědel chloroform:methanol (10:1) bylo použito pro monitorování obsahu frakcí. Byly sbírány frakce označené č. 11 – 70. U dalších frakcí TLC zobrazilo přítomnost 4-aminopyridinu.

## 4.2 Metodika – testování cytotoxicity

### 4.2.1 Použitý materiál a instrumentální vybavení

#### **Buněčný model**

- Ovariální buňky čínského křečka (Chinese Hamster Ovary, CHO-K1), ECACC, Salisbury, UK

#### **Chemikálie pro cytotoxické testy**

- Živné médium: Nutrient Mixture F-12 Ham (N4888, Sigma-Aldrich) + 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) + 1 % Penicillin-Streptomycin (ATB)
- FBS: Fetal Bovine Serum (F0804, Sigma-Aldrich)
- Antibiotikum: Penicillin-Streptomycin (P4333, Sigma-Aldrich)
- Trypsin: Trypsin-EDTA solution (T4049, Sigma-Aldrich)
- PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D8537, Sigma-Aldrich)
- DMSO: Dimethyl sulfoxide p.a., min. 99 %, (D8418, Sigma-Aldrich)
- DMSO: Dimethyl sulfoxide p.a., min. 99 % (41644M1000, Verkon)
- Alikvoty MTT: 0,5 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98% (M2128, Sigma-Aldrich) rozpuštěno ve 100 ml PBS, sterilně přefiltrováno a alikvotováno po 1 ml (uskladněno v -20 °C)

Testované látky, které jsou používány v této práci, jsou uvedeny v tab. 4.5. Látky 2-C<sub>12</sub>, 2-C<sub>14</sub> a 2-C<sub>16</sub> byly poskytnuty Centrem biomedicínského výzkumu v Hradci Králové. Syntéza látek NŽ10, NŽ12 a NŽ13 je uvedena v této práci.

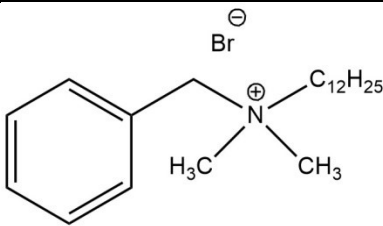
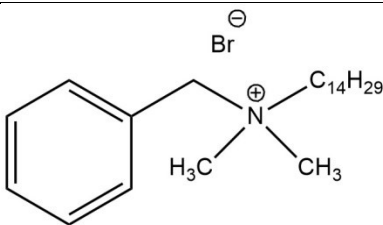
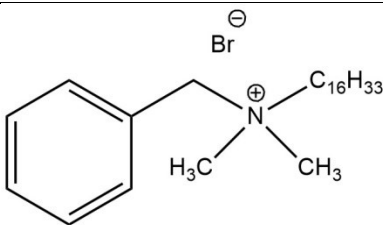
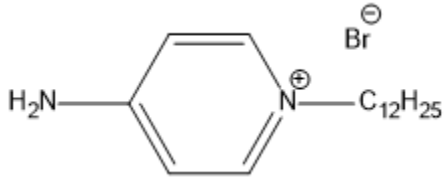
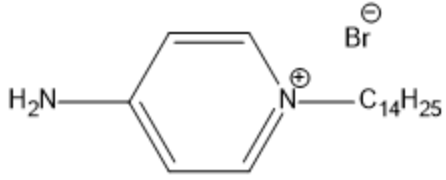
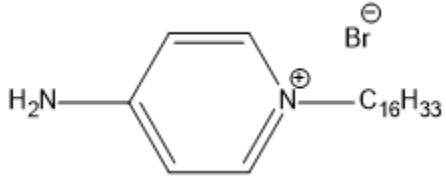
#### **Instrumentální vybavení a spotřební materiál pro cytotoxické testy**

- Třepačka Vortex: Wizard s bezdotykovým spínačem, VELP Scientifica F202A0173
- Rezervoár na reagenty: Costar<sup>®</sup> 50 ml Reagent Reservoir sterile, Corning Costar 4870
- Kultivační 96-jamkové destičky: TPP<sup>®</sup> tissue culture plates 92696

- Ultrazvuk: Lázeň ultrazvuková, Elmasonic P 30 H
- Vodní lázeň: PolyScience WA28A12E
- Horkovzdušná pistole: Makita HG551V
- Termostat: CO<sub>2</sub> inkubátor, Thermo Scientific 311 TC 230
- Laminární box: SafeFlow 1.2, Bioair
- Analytické váhy: CPA225D-0CE, Sartorius
- Mikroskop inverzní: Optika Microscopes
- Spektrofotometr: Multidetekční reader Synergy HT, BioTek S1LFTA

**Tab. 4.5:** Přehled testovaných látek, jejich označení, systematický název a struktura (ChemDraw Ultra 12.0).

**Standardní benzalkoniové soli – poskytnuty Centrem biomedicínského výzkumu**

<b>2-C<sub>12</sub></b>	<i>N</i> -dodecyl- <i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethylamonium bromid	
<b>2-C<sub>14</sub></b>	<i>N</i> -tetradecyl- <i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethylamonium bromid	
<b>2-C<sub>16</sub></b>	<i>N</i> -hexadecyl- <i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethylamonium bromid	
<b>Syntetizované látky</b>		
<b>NŽ10</b>	4-aminododecylpyridinium bromid	
<b>NŽ12</b>	4-aminotetradecylpyridinium bromid	
<b>NŽ13</b>	4-aminohexadecylpyridinium bromid	

## 4.2.2 Protokol

### Nasazení buněčné linie do kultivační nádoby – 1. den

Kultivační médium a trypsin byly předem vytemperovány na 37 °C ve vodní lázni. Z kultivační láhve obsahující buňky CHO-K1 bylo serologickou pipetou (10 ml) odsáto živné médium. Následně byl povrch buněk jemně propláchnut 5 ml PBS, po opláchnutí buněk bylo PBS z lahve odstraněno. Do této láhve byl přidán 1 ml roztoku Trypsin-EDTA solution s 0,25 % trypsinu, který byl rovnoměrně rozprostřen po dně, a poté byla láhev 5 minut inkubována v termostatu (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po této době bylo pro ředění a následné počítání buněk napipetováno 1,8 ml živného média do 5 ml zkumavky a do kultivační láhve s buňkami a trypsinem bylo pipetováno 5 ml kultivačního média Nutrient Mixture F-12 Ham. Do připravené 5 ml zkumavky se z láhve odebralo 0,2 ml média s uvolněnými buňkami a obsah se promíchal. Do Bürkerovy počítací komůrky s krycím sklíčkem bylo přidáno 10 µl obsahu zkumavky. Následně se pod mikroskopem (zvětšení 10x/0,25) počítalo množství buněk podle tohoto vzorce:

$$x = \frac{a * 10^3}{n * h} * r \quad (4.1)$$

Pro tento vzorec  $x$  odpovídá počtu buněk/ml buněčné suspenze,  $a$  odpovídá vypočítanému množství buněk,  $10^3$  je zařazeno pro převod z µl na ml,  $n$  odpovídá počtu počítaných čtverců,  $h$  hloubce komůrky (0,1 mm) a  $r$  odpovídá ředění, v tomto případě byly buňky ve zkumavce zředěny 10x. Požadované množství bylo 8000 buněk na jamku destičky.

Vypočítaný objem potřebného živného média byl pipetován do rezervoáru na reagentie, následně byl z kultivační láhve odebrán vypočítaný objem odpovídající potřebnému množství buněk v médiu. Obsah rezervoáru byl promíchán 8-kanálovou pipetou, poté bylo do každé jamky ve sloupcích 1 – 11 pipetováno 100 µl buněčné suspenze z rezervoáru. Do každé jamky 12. sloupce bylo pipetováno 100 µl média bez buněk. Tento sloupec sloužil jako slepý vzorek. Kultivační 96-jamková destička byla inkubována v termostatu (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 24 hodin.

V kultivační láhvi bylo ponecháno vhodné množství buněčné suspenze (většinou cca



1,5 ml) a do 10 ml bylo doplněno nové živné médium. Následně byla láhev po zpasážování vrácena do termostatu.

#### Přidání roztoků KAS do kultivačního média – 2. den

Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v DMSO do 1,5ml zkumavek. Pro zvolenou finální koncentraci KAS byl vypočítán odebíraný objem ze zásobního roztoku, ke kterému se do konečného objemu 2 ml doplnilo živné médium (použily se 5ml zkumavky). Obsah DMSO ve finálních roztocích testovaných látek nesměl překročit 0,5 %, protože DMSO je ve větší míře toxické a ovlivňuje měření. Finální roztok o zvolené koncentraci byl promíchán a vložen do ultrazvukové lázně.

**Tab. 4.4:** Nejnižší a nejvyšší koncentrace roztoků KAS dosažené dvojkovým ředěním, u látek NŽ10, NŽ12 a NŽ13 u měření 2, 3 a 4 byla nejnižší koncentrace (min) zředěna 10x, 100x a 1000x pro další tři jamky.

	Měření 1 [μM]		Měření 2 [μM]		Měření 3 [μM]		Měření 4 [μM]	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>2-C<sub>12</sub></b>	1,5	200	1,5	200	1,5	200	-	-
<b>2-C<sub>14</sub></b>	1,2	150	1,2	150	1,2	150	-	-
<b>2-C<sub>16</sub></b>	1,2	150	1,2	150	1,2	150	-	-
<b>NŽ10</b>	6	767	0,117	480	0,117	480	0,117	480
	-	-	0,117 zředěno 10x, 100x a 1000x pro další 3 jamky					
<b>NŽ12</b>	4,3	549	0,098	400	0,098	400	0,098	400
	-	-	0,098 zředěno 10x, 100x a 1000x pro další 3 jamky					
<b>NŽ13</b>	3,8	480	0,049	200	0,049	200	0,049	200
	-	-	0,049 zředěno 10x, 100x a 1000x pro další 3 jamky					

Byly připraveny roztoky KAS o požadovaných koncentracích pomocí dvojkového ředění s kultivačním médiem. V tab. 4.4 jsou uvedeny nejvyšší koncentrace (max.), které následně byly ředěny dvojkovým ředěním do nejnižší koncentrace (min.). U látek NŽ10, NŽ12 a NŽ13 u měření 2, 3 a 4 byly nejnižší koncentrace ředěny desetkrát,

stokrát a tisíckrát.

Kultivační destička byla přenesena z termostatu do laminárního boxu. Do nového rezervoáru, který sloužil jako odpadní, byl 8-kanálovou pipetou odebrán obsah jamek kultivační destičky z předchozího dne a stejnou pipetou s novými špičkami bylo do jamek přidáno 100  $\mu$ l každé koncentrace připravených roztoků v triplicátu z 96-jamkového rezervoáru. Do jamek sloupce 12 (slepý vzorek) a do jamek sloupců 10 a 11, které byly kontrolními sloupci s buňkami, se také přidalo 100  $\mu$ l nového média/jamku. Kultivační destička byla vložena zpět do termostatu pro 24-hodinovou inkubaci (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### **Inkubace s MTT a měření – 3. den**

Živné médium a alikvoty MTT (5 mg/1 ml PBS) byly vytemperovány na 37 °C ve vodní lázni. Byl připraven prázdný odpadní rezervoár a rezervoár s 10 ml živného média promíchaného s 1 ml MTT alikvoty pro jednu destičku. Kultivační destička byla přesunuta z termostatu do laminárního boxu a ze všech jamek byl 8-kanálovou pipetou odebrán obsah do odpadního rezervoáru. Poté byl opět obsah rezervoáru s médiem a MTT promíchán 8-kanálovou pipetou a do všech jamek v destičce bylo z tohoto rezervoáru pipetováno 100  $\mu$ l. Následovala 3-hodinová inkubace v termostatu (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Po 3 hodinách byly připraveny dva rezervoáry, jeden opět odpadní a jeden na DMSO. 8-kanálovou pipetou byl z jamek kultivační destičky odebrán obsah do odpadního rezervoáru a následně bylo pipetováno 100  $\mu$ l DMSO do všech jamek destičky z druhého rezervoáru. Destička byla umístěna ve speciálním nástavci na třepačku, a tím důkladně promíchána (2 minuty). Následně byla destička bez víčka vložena do spektrofotometru a měřila se absorbance při  $\Delta\lambda$  570/650 nm.

#### **4.2.3 Zpracování a hodnocení získaných dat**

Data byla získána z hodnot absorbancí naměřených při  $\Delta\lambda$  570/650 nm (Gen 5 Ver. 2.0 Data Analysis Software.) a vztažena k průměru všech kontrolních jamek

odpovídajících danému měření. Data byla následně zpracována v programu GraphPad Prism 5 (nelineární regrese, čtyři parametry). Absorbance všech látek byla měřena vždy v triplikátu. Měření 1 u látek ze série NŽ (viz tab. 4.4) bylo vyřazeno pro zvolení nevhodného koncentračního rozsahu.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Organická syntéza

Přímou kvarternizací (viz obr. 5.1) byly syntetizovány tři deriváty 4-aminopyridinu dle postupu vycházejícího z článku [36]. Výtěžek látky NŽ 10 byl 91,9 % a teplota tání byla určena na 130-131 °C. Identita látky byla potvrzena NMR spektrem a výsledky z HRMS analýzy (viz tab. 5.1). Při přípravě látky NŽ10 došlo ke vzniku malého množství vedlejšího produktu, kdy oba dusíky byly alkylované dlouhým řetězcem (potvrzenou pomocí HRMS analýzy). Tato látka byla při přečištění z větší části vymyta do filtrátu. Nicméně se jí nepodařilo zcela oddělit od látky NŽ10. Tento fenomén nebyl u dalších dvou připravovaných látek pozorován.

**Tab. 5.1:** Výsledky organické syntézy a následné analýzy produktu tj. látky NŽ10

NŽ10	
<sup>1</sup> H NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8.19 (s, 2H), 7.98 – 7.94 (m, 2H), 7.35 – 7.32 (m, 2H), 4.16 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.81 (p, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 1.31 – 1.20 (m, 18H), 0.86 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H).	
<sup>13</sup> C NMR (126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 158.94, 141.64, 110.49, 58.45, 31.82, 31.03, 29.52, 29.44, 29.35, 29.25, 29.01, 26.07, 22.60, 14.05.	
<b>HRMS:</b> <i>m/z</i> 263.2477 [M <sup>+</sup> ] (vypočteno pro: [C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 263.2482)	
<b>Výtěžek:</b> 91,9 % (6,75 g), bílá krystalická látka	<b>Teplota tání:</b> 130-131 °C

Reakce NŽ12 proběhla s 92,2% výtěžkem produktu NŽ12. Teplota tání této látky byla určena na 136-137 °C a její identita byla potvrzena NMR a HRMS spektrem (viz tab. 5.2).

**Tab. 5.2:** Výsledky organické syntézy a následné analýzy produktu tj. látky NŽ12

<b>NŽ12</b>	
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8.20 (s, 2H), 7.95 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 2H), 4.16 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 2H), 1.33 – 1.19 (m, 22H), 0.87 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H).	
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 158.97, 141.60, 110.54, 58.48, 31.87, 31.05, 29.63, 29.60, 29.56, 29.48, 29.37, 29.30, 29.03, 26.10, 22.63, 14.07.	
<b>HRMS:</b> <i>m/z</i> 291.2791 [M <sup>+</sup> ] (vypočteno pro: [C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 291.2795)	
<b>Výtěžek:</b> 92,2 % (7,33 g), bílá krystalická látka	<b>Teplota tání:</b> 136-137 °C

Výtěžek reakce NŽ13 byl 91,9 % a teplota tání látky NŽ13 byla určena na 138-139°C. Identita této látky byla potvrzena NMR a HRMS analýzou (viz tab. 5.3).

**Tab. 5.3:** Výsledky organické syntézy a následné analýzy produktu tj. látky NŽ13

<b>NŽ13</b>	
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8.19 (s, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 7.36 – 7.30 (m, 2H), 4.15 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.88 – 1.76 (m, 2H), 1.31 – 1.19 (m, 26H), 0.86 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H).	
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 158.91, 141.55, 110.55, 58.44, 31.88, 31.12, 29.63, 29.61, 29.60, 29.56, 29.50, 29.47, 29.35, 29.28, 29.03, 26.10, 22.63, 14.06.	
<b>HRMS:</b> <i>m/z</i> 319.3106 [M <sup>+</sup> ] (vypočteno pro: [C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 319.3108)	
<b>Výtěžek:</b> 91,9 % (7,85 g), bílá krystalická látka	<b>Teplota tání:</b> 138-139 °C

Výsledky byly porovnány s daty uvedenými v článku Zhao a G. Sun [36], kde je u jednokrokové syntézy uváděn výtěžek 55,3 %. Od jejich postupu se příprava v této práci liší především délkou inkubace reakční směsi a vynecháním posledního kroku rekrystalizace z vodného prostředí. Vzhledem k potvrzené identitě a čistotě jsme usoudili, že tento krok není nutný. Vzhledem k tomu, že KAS působí jako tenzidy [13], je možné, že u jejich rekrystalizace z vody by došlo k nadbytečným ztrátám při tomto kroku.

Snažili jsme se rovněž připravit deriváty 4-aminopyridinu také tříkrokovou syntézou, která vychází ze stejného článku [36] za použití acetylu jako chránicí skupiny. Už první krok měl nízký výtěžek, konkrétně 22,3 %. V článku byl uveden celkový výtěžek 66,3 %, což se u látek v této práci nepodařilo dosáhnout. Po zvážení se v dalším kroku syntézy nepokračovalo. Výsledky analýzy této reakce a teplota tání látky NŽ21 jsou zobrazeny v tab. 5.4. Protože látka není KAS, nebyla testována na cytotoxicitě.

**Tab. 5.4:** Výsledky organické syntézy a následné analýzy produktu tj. látky NŽ21

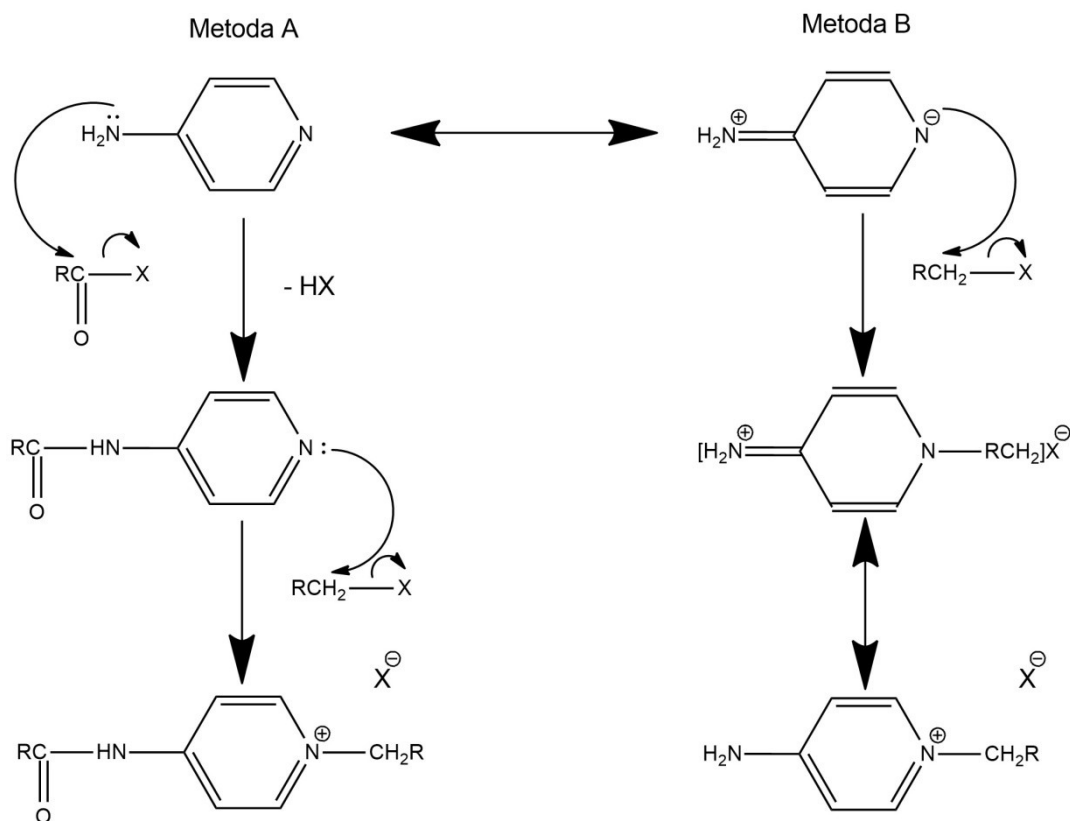
<b>NŽ21</b>	
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 11.75 (s, 1H), 8.62 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 8.04 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H).	
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (126 MHz, DMSO) δ 171.06, 151.89, 143.71, 114.06, 24.66.	
<b>HRMS:</b> <i>m/z</i> 137.0708 [ <i>M</i> <sup>+</sup> H] (vypočteno pro: [C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 137.0670)	
<b>Výtěžek:</b> 22,3 % (1,29 g), bílá krystalická látka	<b>Teplota tání:</b> 223-224 °C

### Vysvětlení mechanismu reakcí

V této práci byly kvarterní amoniové soli připraveny kvarternizací 4-aminopyridinu, který ve své struktuře obsahuje dva atomy dusíku a aromatické jádro. Díky rezonančním strukturám této látky byly navrženy dva mechanismy reakcí (viz obr. 5.1) [36].

Mechanismus A využívá chránění aminové skupiny, která vystupuje jako nukleofilní činidlo, atakuje parciálně kladný uhlík acylhalogenidu, halogenid odstupuje. V druhém kroku elektrony dusíku v heterocyklu atakují parciálně kladný uhlík v alkylhalogenidu a dochází ke vzniku KAS. Mechanismus B nejspíš využívá rezonančních struktur 4-aminopyridinu. Záporně nabitý dusík, který je součástí heterocyklu, atakuje parciálně kladný uhlík alkylhalogenidu, dochází ke vzniku intermediátu a následnému ustálení struktury.

V článku [36] připravovali mechanismem B deriváty s alkylovými řetězci od butanu (výtěžek 55,3 %), oktanu (výtěžek 58,7 %) a dodekanu (67,7 %). Je možné pozorovat trend o vzrůstajícím výtěžku s délkou řetězce. V této práci byly většinou syntetizovány deriváty s delšími řetězci v porovnání se syntézou v článku [36], což vylučuje, že mohlo docházet ke sterickému bránění. Derivát odvozený od alkylového řetězce dodekanu je stejný, přesto se výtěžky reakcí liší o 24,2 %.



**Obr. 5.1:** Schéma navržených mechanismů kvarternizace 4-aminopyridinu (překresleno z [36] pomocí softwaru ChemDraw Ultra 12.0).

## 5.2 Testování cytotoxicity

U standardních i nově syntetizovaných látek bylo potvrzeno, že se vzrůstajícím počtem uhlíků v alkylové skupině roste i cytotoxický potenciál látek (viz tab. 5.5). Tento trend byl popsán a potvrzen v několika publikacích [37–39]. V článku [38] je uvedeno, že tento jev souvisí s lipofilitou molekuly, která se s rostoucím alkylovým řetězcem v molekule zvyšuje. Lipofilní charakter napomáhá látce vstoupit do buňky. U látky 2-C<sub>16</sub> a NŽ13, které obě obsahují C<sub>16</sub> alkylový řetězec, byla pozorována nižší rozpustnost v kultivačním médiu. Tento jev byl očekáván na základě tabelovaných hodnot rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol/voda dodekanu, tetradekanu a hexadekanu, které vypovídají o výše zmíněném lipofilním charakteru látek a následně o potenciální cytotoxicitě a antimikrobním účinku látek. Je sice možné na základě tohoto rozdělovacího koeficientu predikovat cytotoxicitu látky [40], není to vždy spolehlivé [38] a proto je nezbytné provést cytotoxické testy na buněčných liniích. Závislost lipofility a biocidního účinku není lineární, ale parabolická. Pro G<sup>+</sup> bakterie dosahuje maxima při délce alkylového řetězce 12-14 [38,41,42]. Pro G<sup>-</sup> dosahuje maxima 14-16, což odpovídá i tomu, že G<sup>-</sup> bakterie jsou méně citlivé pro biocidní látky [8] a vyžadují silnější dezinfekční prostředky. Pro zjištění, zda jsou látky ze série NŽ lepšími antimikrobiálními prostředky a zda je možné je uvést do praxe, je potřeba provést další *in vitro* testy na bakteriálních buňkách, případně kvasinkách nebo virech.

Tab. 5.5: Přehled naměřených hodnot IC<sub>50</sub>.

	Látka	IC <sub>50</sub> ± SEM [μM]
Standardní látky	2-C <sub>12</sub>	14,91 ± 0,57
	2-C <sub>14</sub>	10,50 ± 1,22
	2-C <sub>16</sub>	9,42 ± 0,61
Syntetizované látky	NŽ10	8,35 ± 1,29
	NŽ12	5,65 ± 1,12
	NŽ13	3,24 ± 0,58



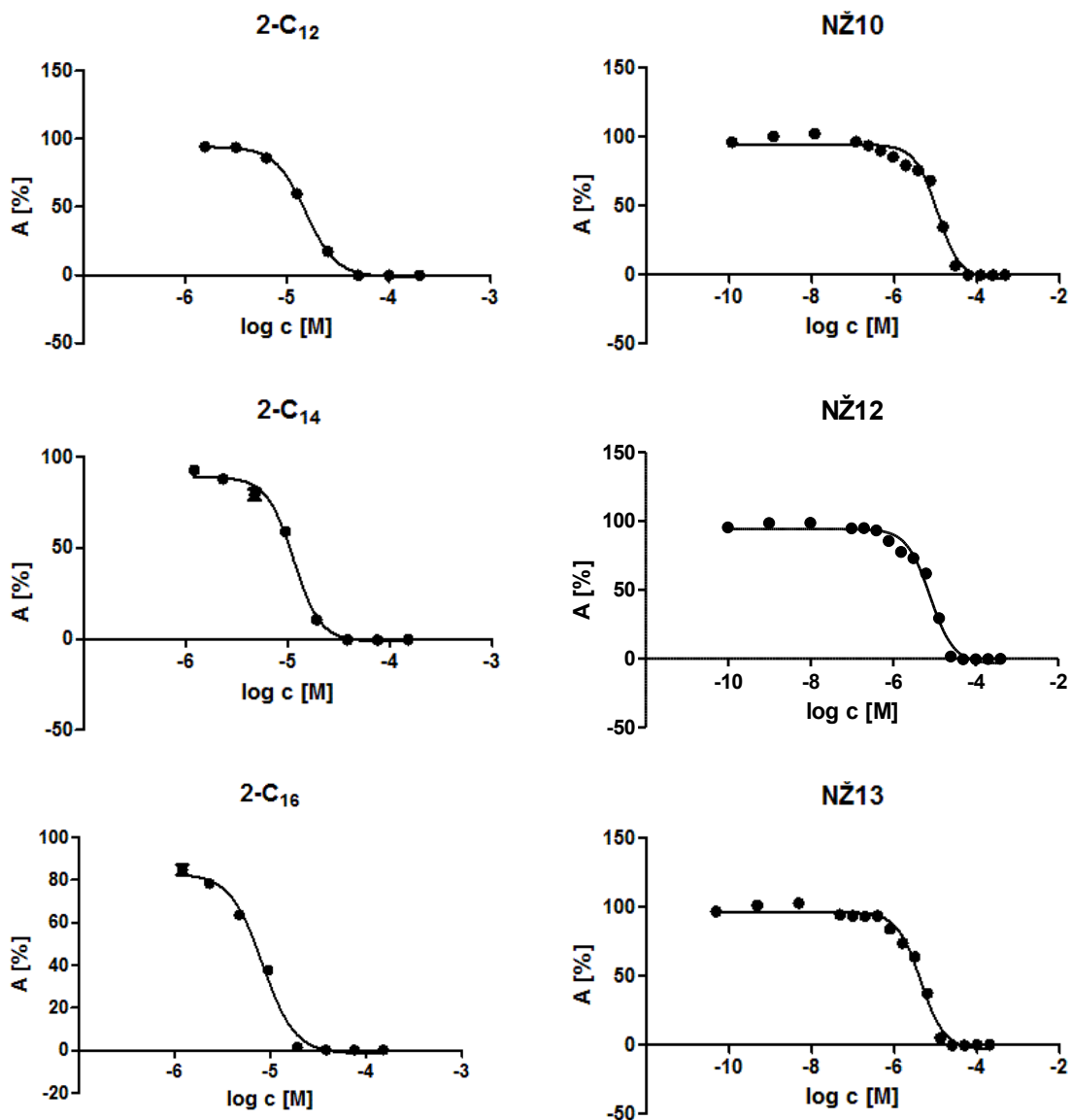
Pro dosažení lepších výsledků je možné navrhnout obměny struktur látek ze série NŽ. Optimální délka řetězce již byla v mnohých publikacích objasněna a její obměna by neměla význam. Lze ale obměňovat počet řetězců, jejich umístění a vlastní strukturu hydrofilního heterocyklu. Díky přítomnosti dvou atomů dusíku ve struktuře 4-aminopyridinu je možné připravit látky s dvěma alkylovými řetězci. V článcích [43,44] byly podobné látky připraveny a antimikrobiální testy i cytotoxické testy vycházely lépe než standardně používané látky.

Do budoucna by nové látky mohly být otestovány na více buněčných liniích včetně lidských, pro přibližné zjištění orgánové cytotoxicity. Také je potřeba látky otestovat na antimikrobiální účinek, tedy zda je jejich cytotoxicita dostatečná vůči prokaryotním buňkám.

Při práci s literaturou jsem zjistila, že chybí články o KAS, které by uváděly vliv různých organických jader nebo funkčních skupin na cytotoxicitu. V literatuře pro mě nebylo možné dohledat informace o *in vitro* cytotoxickém působení základních výchozích látek jako benzen a pyridin ani vliv různých substitučních skupin např. aminové skupiny na cytotoxicitu.

Na obr. 5.6 jsou zvolené ukázky grafů z měření hodnoty  $IC_{50}$ . Grafy zobrazují závislost absorbance, převedenou na procenta vztažením k hodnotě absorbance kontrolních jamek, na logaritmu koncentrace roztoků KAS.

**Obr. 5.6:** Přehled ukávek grafů získaných vyhodnocením cytotoxických testů testovaných látek v programu GraphPad Prism. Pro každou měřenou látku byl zvolen jeden zástupný graf. Graf 2-C<sub>12</sub> byl měřen v koncentračním rozsahu 2 – 200 μM (měření 1), 2-C<sub>14</sub> v 1,2 – 150 μM (měření 2) a 2-C<sub>16</sub> v 1,2 – 150 μM (měření 3). Pro NŽ10 byl koncentrační rozsah 0,000117 – 480 μM (měření 4), pro NŽ12 0,000098 – 400 μM (měření 4) a pro NŽ13 0,000049 – 200 μM (měření 4).



## 6 Závěr

Byly připraveny tři látky (série NŽ) ze skupiny KAS lišící se délkou alkylového řetězce. Provedené reakce měly výtěžek 92 %. U látek byl testován vliv na viabilitu savčích buněk (buněčné linii CHO-K1) a získané výsledky byly porovnány s výsledky získanými testováním standardních benzalkoniových solí (2-C<sub>12-16</sub>). U látek ze série NŽ byla stanovena nižší hodnota IC<sub>50</sub>, tudíž vyšší cytotoxický potenciál, než u referenčních benzalkoniových solí. Testováním byl potvrzen trend, že se vzrůstající délkou alkylového řetězce se zvyšuje cytotoxicita látky. Látka NŽ21 byla připravena s velmi nízkým výtěžkem a dále se s ní v syntéze nepokračovalo. Protože se nejedná o KAS, netestovala pomocí cytotoxických testů.

## Seznam použité literatury

1. H. A. Khan, F. K. Baig, R. Mehboob: Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7:5 478–482 (2017).
2. D. Göpfertová, P. Pazdiora, J. Dáňová: *Epidemiologie obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí*. Praha: Nakladatelství Karolinum; 2006.
3. J. A. Loontjens. Quaternary Ammonium Compounds: In: *Biomaterials Associated Infection*. 1. vyd. New York: Springer; 2013.
4. R. Koch: The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2:2 277–310 (1876).
5. A. Kramer, I. Schwebke, G. Kampf: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* 6 (2006).
6. M. Tuček, A. Slámová: *Hygiena a epidemiologie pro bakaláře*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum; 2012.
7. C. Sacré, R. Freerksen, E. Merö: Bacteriological testing of formaldehyde disinfection chambers. *Das Öffentliche Gesundheitswesen* 44:6 386–389 (1982).
8. G. E. McDonnell: *Antisepsis, disinfection and sterilization*. 2. Washington, DC: ASM Press; 2017.
9. E. M. Darmady, K. E. A. Hughes, J. D. Jones, D. Prince, W. Tuke: Sterilization by dry heat. *Journal of Clinical Pathology* 14:1 38–44 (1961).
10. A. L. Gandy, M. W. Schilling, P. C. Coggins, C. H. White, Y. Yoon, V. V. Kamadia: The Effect of Pasteurization Temperature on Consumer Acceptability, Sensory Characteristics, Volatile Compound Composition, and Shelf-Life of Fluid Milk. *Journal of Dairy Science* 91:5. 1769–1777 (2008).
11. W. A. Lynn, D. T. Golenbock: Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today* 13(7) 271–276 (1992).
12. L. G. Piluso, C. Moffatt-Smith: Disinfection using ultraviolet radiation as an antimicrobial agent: a review and synthesis of mechanisms and concerns. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 60:11–16 (2006).
13. H. Russell, Ayliffe's. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. 4. vyd. Blackwell Publishing; 2012.

14. B. Setlow, C. A. Loshon, P. C. Genest, A. E. Cowan, C. Setlow, P. Setlow: Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology* **3** 362–375 (2002).
15. G. Domagk: Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **61**:21 829–832 (1935).
16. T. Padrtová, P. Marvanová, P. Mokry: Kvarterní amoniové soli - syntéza a využití. *Chemické Listy* **111** 197–205 (2017).
17. J. J. Armstrong, J. Baddiley, G. R. Greenberg: Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. *Journal of the Chemical Society* 4344–4354 (1958).
18. J. Baddiley. Structure, biosynthesis, and function of teichoic acids. *Accounts of Chemical Research*. 1970;3(3):98–105.
19. H. J. Rogers, H. R. Perkins, J. B. Ward: Membrane functions. In: *Microbial Cell Walls and Membranes*; 1980.
20. Y. Kamio, H. Nikaido: Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**:12 2561–2570 (1976).
21. D. J. Robertson: The Molecular Structure and Contact Relationships of Cell Membranes. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* **10** 343–418 (1960).
22. W. A. Hamilton: Membrane-active antibacterial compounds. In: *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. 1. vyd. Academic Press 1971.
23. P. F. D'Arcy: Inhibition and destruction of moulds and yeasts. In: *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. 1. vyd. Academic Press 1971.
24. B. M. A. El-Falaha, A. D. Russell, J. R. Furr: Sensitivities of wild-type and envelope-defective strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Microbios* **38** 99–105 (1983).
25. Pharmaceutical society of Great Britain: *Pharmaceutical Codex*. London: Pharmaceutical Press; 1994.
26. M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe: Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *ChemMedChem* **7** 22–31 (2012).
27. M. M. Markowitz: A Convenient Method for Preparation of Quaternary

- Ammonium Salts. *Journal of Organic Chemistry* **22**:8 983–984 (1957).
28. N. Menshutkin: Beiträge zur Kenntnis der Affinitätskoeffizienten der Alkylhaloide und der organischen Amine. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **5** 589–600 (1890).
  29. T. Mosmann: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55 55–63 (1983).
  30. F. P. Altman: Tetrazolium Salts and Formazans. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag; 1976.
  31. T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, et al. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual*.
  32. Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert: Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* **69** 581–593 (1997).
  33. L. Lü, L. Zhang, M. S. M. Wai, D. T. W. Yew, J. Xu: Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology In Vitro* **26** 636–644 (2012).
  34. D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, et al.: Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* **48** 4827–4833 (1998).
  35. B. J. Moss, Y. Kim, M. P. Nandakumar, M. R. Marten: Quantifying Metabolic Activity of Filamentous Fungi Using a Colorimetric XTT Assay. *Biotechnology Progress* **24**:3 780–783 (2008).
  36. T. Zhao, G. Sun: Synthesis and Characterization of Antimicrobial Cationic Surfactants: Aminopyridinium Salts. *Journal of Surfactants and Detergents* **9**:4 325–330 (2006).
  37. J. Herron, R. C. Reese, K. A. Tallman, R. Narayanaswamy, N. A. Porter, L. Xu: Identification of Environmental Quaternary Ammonium Compounds as Direct Inhibitors of Cholesterol Biosynthesis. *Toxicological Sciences* **151** 261–270 (2016).
  38. J. Marek, D. Malinak, R. Dolezal, O. Soukup, M. Benková, P. Nachtigal, et al.: Novel Series of Quaternary Ammonium Surfactants Based on 2,3-Dihydro-[1,4]dioxino[2,3-b]pyridin-7-ol Ring: Synthesis, Analysis and Antimicrobial Evaluation. *Letters in Organic Chemistry* **15** 3–9 (2017).

39. O. Soukup, R. Dolezal, D. Malinak, J. Marek, S. Salajkova, M. Pasdiorova, et al.: Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **24**:4 841–848 (2016).
40. R. Dolezal, O. Soukup, D. Malinak, R. M. L. Savedra, J. Marek, M. Dolezalova, et al.: Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *European Journal of Medical Chemistry* **121** 699–711 (2016).
41. J. Marek, D. Malinak, M. Pasdiorova, M. Dolezal, K. Kuca: Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-5-aldoxime Based Salts. *Molecules*. **20**:3 3681–3696 (2015).
42. P. Gilbert, L. E. Moore: Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* **99**:4 703–715 (2005).
43. S. Zhang, S. Ding, J. Yu, X. Chen, Q. Lei, W. Fan: Antibacterial activity, in vitro cytotoxicity and cell cycle arrest of Gemini quaternary ammonium surfactants. *Langmuir* **31**:44 12161–12169 (2015).
44. H. Nagamune, T. Maeda, K. Ohkura, H. Kourai: Evaluation of the cytotoxic effects of bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. *Toxicology in Vitro* **14**:2 139–147 (2000).