

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra organické a bioorganické chemie**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Syntéza a hodnocení potenciálních  
antimikrobiálních sloučenin na bázi steroidů**

**Pavla Požárová**

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

**HRADEC KRÁLOVÉ**

**2024**

## **Poděkování**

Velice děkuji všem lidem, díky kterým mohla tato bakalářská práce vzniknout. Především děkuji svému vedoucímu bakalářské práce doc. PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za zodpovědné vedení mé práce a odbornou pomoc, kterou vedl vždy důkladně a trpělivě. Velké díky bych chtěla vyjádřit také RNDr. Adéle Šimkové za její podporu a vedení během mého času stráveného v laboratoři. Její odborné rady, trpělivost a vstřícnost při mé práci byly pro mě nesmírně cenné. Poděkování si také zaslouží paní Ida Dufková, která změřila biologické aktivity (antibakteriální a antifungální) a umožnila mi se podívat na měření některých látek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za zázemí a podporu po celou dobu mého studia.

Práce byla podpořena z prostředků projektů Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NW24-05-00549.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2024



Pavla Požárová

# OBSAH

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT .....	7
1. ÚVOD .....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 Antibiotická rezistence .....	11
2.1.1 Vrozená rezistence .....	11
2.1.2 Získaná rezistence .....	12
2.1.3 Mechanismy antibiotické rezistence .....	13
2.1.3.1 Změna vychytávání léčiva bakteriální buňkou .....	15
2.1.3.2 Modifikace cíle léčiva .....	15
2.1.3.3 Inaktivace léčiva .....	16
2.1.3.4 Aktivní eflux .....	16
2.1.4 Selekční tlak .....	16
2.1.5 Multirezistentní kmeny .....	17
2.1.6 ESKAPE patogeny .....	18
2.1.6.1 Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE) .....	18
2.1.6.2 Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus (MRSA) .....	19
2.1.6.3 Klebsiella pneumoniae odolná vůči karbapenemům (KPC) .....	21
2.1.6.4 Acinetobacter baumannii .....	22
2.1.6.5 Pseudomonas aeruginosa .....	22
2.1.6.6 Enterobacter species .....	22
2.2 Systematika antibiotik .....	23
2.2.1 Antibiotika působící proti buněčné stěně bakterií .....	23
2.2.1.1 Beta-laktamová antibiotika .....	23
2.2.1.2 Glykopeptidy .....	26
2.2.2 Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií .....	27
2.2.2.1 Cyklické lipopeptidy .....	28
2.2.2.2 Aminoglykosidy .....	29
2.2.3 Antibiotika působící na nukleové kyseliny .....	30
2.2.3.1 Fluorochinolony .....	30

2.2.3.2	Rifamyciny .....	31
2.2.4	Antibiotika působící na ribozomy .....	31
2.2.4.1	Makrolidy, azalidy .....	32
2.2.4.2	Kyselina fusidová .....	32
2.3	Steroidní deriváty .....	33
2.3.1	Steroidní hydrazonové deriváty .....	34
3.	CÍL PRÁCE .....	35
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
4.1	Chemie .....	36
4.1.1	Obecné metody .....	36
4.1.2	Příprava cílových steroidních sloučenin .....	37
4.1.2.1	Obecný postup přípravy .....	37
4.1.2.2	Příprava výchozích chloridů kyseliny .....	39
4.1.3	Syntézy a charakterizace jednotlivých sloučenin .....	40
4.2	Biologie .....	56
4.2.1	Hodnocení antibakteriální aktivity .....	56
4.2.2	Hodnocení antifungální aktivity .....	56
4.2.3	Hodnocení antimykobakteriální aktivity .....	57
4.2.4	Hodnocení inhibice cholinesteráz .....	58
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	59
6.	ZÁVĚR .....	64
7.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	65
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	67
9.	POUŽITÁ LITERATURA .....	68

## ABSTRAKT

Závažný problém představující hrozbu pro lidstvo je antibiotická rezistence. Vývojem nových účinných látek můžeme bojovat proti tomuto trendu a zvrátit jeho vývoj. Jelikož steroidní struktury vykazují širokou škálu biologických aktivit, byla zvolena výchozí látka estron, která byla pomocí různých reakcí modifikována. Bylo tak připraveno celkově patnáct nových sloučenin, které byly testovány na antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivitu, doplnkově také na inhibici cholinesteráz.

Modifikace estronu probíhala primárně dvěma různými způsoby za vzniku hydrazonů a esterů. Takto bylo připraveno dvanáct látek, u zbylých látek došlo ke změně výchozích látek či postupu. V případě čtyř sloučenin bylo potřeba předem syntetizovat i jeden z reaktantů. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí od 62 % do 95 % u hydrazonů a od 8 % do 54 % u esterů. Antibakteriální aktivita byla testována proti čtyřem vybraným grampozitivním a gramnegativním kmenům. Antifungální aktivita byla testována proti čtyřem kvasinkám a vláknitým houbám. Antimykobakteriální aktivita byla testována proti pěti kmenům mykobakterií. Všechny tyto metody byly testovány pomocí mikrodiluční bujónové metody.

Testované látky neprojevily žádnou aktivitu při antibakteriálním a antifungálním testování. Aktivita byla zaznamenána pouze při antimykobakteriálním testování, kdy deset z dvanácti testovaných látek vykazovalo aktivitu alespoň vůči jednomu kmenu mykobakterií. Největší aktivitu neboli nejnižší hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) projevilo 4-chlorbenzohydrazon estronu (PaP-7), a to vůči *Mycobacterium kansasii*.

Také byla hodnocena inhibice acetyl- (AChE) a butyrylcholinesterázy (BChE). Zde byly aktivní všechny deriváty v hodnotami  $IC_{50}$  od 31,88 do 166,19  $\mu$ M. Všechny sloučeniny byly duálními inhibitory obou enzymů, nejlepší aktivitu jak na AChE, tak i BChE vykázal 4-chlorfenyl ester estronu.

Syntetizované látky bohužel neprokázaly dostatečnou aktivitu vůči bakteriím a houbám, ale mohly by být užitečné v boji proti mykobakteriím a jako potenciální inhibitory cholinesteráz.

**Klíčová slova:** antimikrobiální sloučeniny, antimykobakteriální aktivita, enzymová inhibice, cholinesterázy, steroidy, syntéza

## ABSTRACT

Antibiotic resistance represents a significant threat to humanity. To combat this trend, the development of new effective substances can be employed to potentially reverse its progression. Due to the broad range of biological activities exhibited by steroid structures, estrone was chosen as the starting material and was modified through various reactions. In total, fifteen new compounds were synthesized, which were tested for their antibacterial, antifungal, and antimycobacterial activities, and additionally for cholinesterases inhibition.

The modification of estrone primarily involved two different approaches, resulting in the formation of hydrazones and esters. Twelve compounds were prepared through these steps. For the remaining three derivatives, changes in the starting materials or procedures were necessary. In the case of four compounds, it was necessary to synthesize one of the reactants. The yields ranged from 62% to 95% for hydrazones and from 8% to 54% for esters. The antibacterial activity was tested against four selected Gram-positive and Gram-negative strains. Antifungal activity was evaluated against four yeasts and filamentous fungi. Antimycobacterial activity was tested against five mycobacterial strains. All these methods utilized the microdilution broth method.

The tested molecules showed no activity in the antibacterial and antifungal assays. Activity was only observed in the antimycobacterial evaluation, where ten out of the twelve tested compounds exhibited activity against at least one mycobacterial strain. The compound 4-chlorobenzohydrazone of estrone (encoded as PaP-7) showed the greatest activity or the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) against *Mycobacterium kansasii*.

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) was also assessed. All derivatives were active, with IC<sub>50</sub> values ranging from 31.88 to 166.19  $\mu$ M. All compounds were dual inhibitors of both enzymes, with the 4-chlorophenyl ester of estrone showing the best activity against both AChE and BChE.

Although the synthesized compounds did not demonstrate sufficient activity against bacteria and fungi, they could be useful in the fight against mycobacteria and as potential inhibitors of cholinesterases.

**Keywords:** antimicrobial compounds, antimycobacterial activity, cholinesterases, enzyme inhibition, steroids, synthesis



# 1. ÚVOD

Antibiotika (ATB) jsou látky, jejichž cílem je bakteriocidní nebo bakteriostatický účinek. Bakteriocidní účinek způsobuje usmrcení mikroorganismů, kdežto bakteriostatický účinek brání jejich růstu nebo rozmnožování. Primárně jsou užívána k léčbě bakteriálních infekcí. Základním principem je narušení základních buněčných procesů nebo narušení bakteriální buněčné stěny.

V dřívějších dobách způsobovaly infekční nemoci v celém světě vysokou úmrtnost. Mezi největší hrozby patřily nemoci jako zápal plic, záškrť, pravé neštovice, cholera nebo tuberkulóza. V roce 1928 objevil Alexandr Fleming penicilin, který znamenal začátek antibiotické revoluce. Od roku 1945 se stal penicilin široce dostupný. Zlatou érou je označováno období mezi 50. a 70. léty 20. století, kdy vzniklo nejvíce nových ATB. Léčba antibiotiky se stala velice úspěšnou a díky tomu vzrostla i průměrná délka života.

Hrozbou se však pro celý svět stala antibiotická rezistence, která komplikuje léčbu. Bakterie jsou schopné odolávat účinku ATB, na které byly dříve citlivé. Rezistence může být důsledkem přirozené nebo získané rezistence. Přirozená rezistence se vztahuje na druhy, které nejsou ve spektru působení antibiotika. (1) Dochází k ní při přirozené evoluci a adaptaci na nepříznivé podmínky. Získaná rezistence vzniká genetickou mutací nebo selekčním tlakem prostředí. Zejména nesprávné užívání ATB napomáhá k rozvoji rezistence. První bakterii, u které se prokázala rezistence, byla bakterie *Staphylococcus aureus* (SA), která byla rezistentní na beta-laktamové léčivo methicilin. (2) Mezi další významné rezistentní kmeny patří *Streptococcus pneumoniae* rezistentní na penicilin nebo enterokoky rezistentní na vankomycin.

Rezistentní kmeny vyžadují náročnější léčbu, která zahrnuje vyšší dávky ATB nebo alternativní léky, které mnohdy bývají toxičtější pro pacienta a jsou dražší. Situaci zhoršují nově se objevující onemocnění, nedostatečný vývoj nových tříd ATB a rostoucí antibiotická rezistence. Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) aktivně řeší tento problém a cílí na snížení výskytu antibiotické rezistence. V jejich celosvětovém plánu je například zvýšení povědomí a porozumění o rezistenci u lékařů i široké veřejnosti, posílit dohled a výzkum nových ATB, snížit výskyt infekcí a optimalizovat užívání léčiv. (1)

Znepokojivá antibiotická rezistence je velkým problémem do budoucna, který bude ohrožovat životy všech jedinců. Bakterie jsou velmi univerzální a přizpůsobivé. Proto je důležité se zaměřit na vývoj nových účinných látek, které by napomohly léčbě infekčním onemocněním a vedly ke snížení antibiotické rezistence.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Antibiotická rezistence

Jak bylo v první kapitole zmíněno, některé bakterie mají schopnost odolávat podmínkám obvyklé koncentrace určitého ATB. Rezistentní kmen se v přítomnosti terapeuticky stanovených koncentrací ATB rozmnožuje podobně, jako bez přítomnosti ATB.

Rezistence ohrožuje zdraví populace kvůli zvyšující se prevalenci bakterií odolných vůči ATB. Rezistence se vyskytuje u grampozitivních i gramnegativních bakterií, které mohou způsobovat závažné stavy pacienta. Hlavním faktorem, který přispívá vzniku a šíření antibiotické rezistence je nadužívání a nesprávné používání ATB. Rezistence je vždy podmíněna geneticky. Geny se přenáší z rodičovských buněk do dceřiných. (3–5)

Míra rezistence je možná vyjádřit pomocí hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC, minimum inhibitory concentration). Za definovaných podmínek se stanovuje nejnižší koncentrace testovaného antimikrobiálního činidla, která je schopná inhibovat růst bakterie. Naměřené hodnoty MIC slouží ke stanovení citlivosti bakterií vůči antimikrobiální látce. Hodnotu MIC můžeme testovat pomocí mikrotitrační destičky, kam se testované bakterie naočkují do růstového média za přítomnosti různých koncentrací antimikrobiální látky. Po určitou dobu se destička nechává inkubovat a poté se odečítá hodnota MIC. Tato hodnota je poslední koncentrace ATB, která ještě zamezuje růstu bakterií. Dalšími způsoby testování je měření podle velikosti inhibiční zóny na Petriho misce s disky, které jsou napuštěné různými ATB, nebo E-test, který využívá proužek napuštěný ATB se vzestupnou koncentrací. (5,6)

#### 2.1.1 Vrozená rezistence

Vrozená antibiotická rezistence, známá také jako primární nebo přirozená rezistence, nastává bez předchozího kontaktu s ATB. Necitlivost na dané ATB je podmíněna geneticky prostřednictvím přirozených struktur nebo funkčních charakteristik, která jsou sdílena v rámci bakteriálního druhu. To znamená, že celý bakteriální druh je vždy rezistentní k určitému ATB.

Mezi mechanismy patří nedostatek afinity léčiva k cílové struktuře, nedostatečný vstup léčiva do bakteriální buňky, což snižuje jeho účinnost, nebo přirozená produkce inaktivujících látek. Příkladem mohou být všechny gramnegativní bakterie, které jsou přirozeně rezistentní ke glykopeptidům, klindamycinu, daptomycinu a linezolidu. Znalost vrozené rezistence jednotlivého patogenu je důležitá, aby se předešlo nevhodným a neúčinným terapiím. (7,8)

### **2.1.2 Získaná rezistence**

Získaná neboli sekundární antibiotická rezistence vzniká důsledkem expozice bakterií antibiotikům. Bakterie tedy byla původně vůči účinkům ATB citlivá a po zavedení léčby se vyvinula v rezistentní. Rezistence vzniká mutací genu na bakteriálním chromozomu nebo získáním genetické informace pro rezistenci od jiné bakterie. (9)

Většina mutací jsou pro buňku škodlivá, pouze u několika typů genů způsobují rezistenci. Jsou to geny, které kódují lékové cíle, lékové transportéry, regulátory a geny kódující enzymy, které modifikují ATB. Pokud tato rezistence nese selekční výhodu, rezistentní buňky se začnou v populaci více prosazovat. (8)

Bakterie získávají nový genetický materiál z rezistentních kmenů horizontálním šířením. To spočívá v přenosu genetické informace mezi buňkami, které pochází z různých klonů nebo i z různých druhů či rodů. Přenosy genů se mohou uskutečňovat například pomocí konjugace, transformace nebo transdukce. Konjugace je přenos genetické informace mezi dvěma bakteriemi přes cytoplazmatické spojení tzv. sex pili. U transdukce je přenos zprostředkován bakteriofágem. Při transformaci mohou bakterie získávat DNA přímo z okolního prostředí. Zdrojem mohou být například uhynulé bakterie. (5)

Pro horizontální přenos genů slouží mobilní genetické elementy. Jsou to zejména plazmidy a transpozony. Plazmid je malá, většinou kruhová molekula DNA. Vyskytuje se přirozeně v cytoplazmě. Existuje ve více kopiích, které nesou jeden nebo několik genů. Genetickou informaci z plazmidu mohou bakterie využívat stejně jako vlastní DNA. Transpozony jsou geny, které se přesouvají z místa kompaktní DNA na jiné místo DNA. Mohou měnit lokalizaci v rámci bakteriálního chromozomu nebo přeskokovat z chromozomu na plazmid a obráceně. (5)

Získané geny mohou bakterii umožnit produkci enzymů, které ničí antibakteriální léčivo, omezují vstup léčiva do buňky nebo modifikují cílové struktury léčiva. (9)

### **2.1.3 Mechanismy antibiotické rezistence**

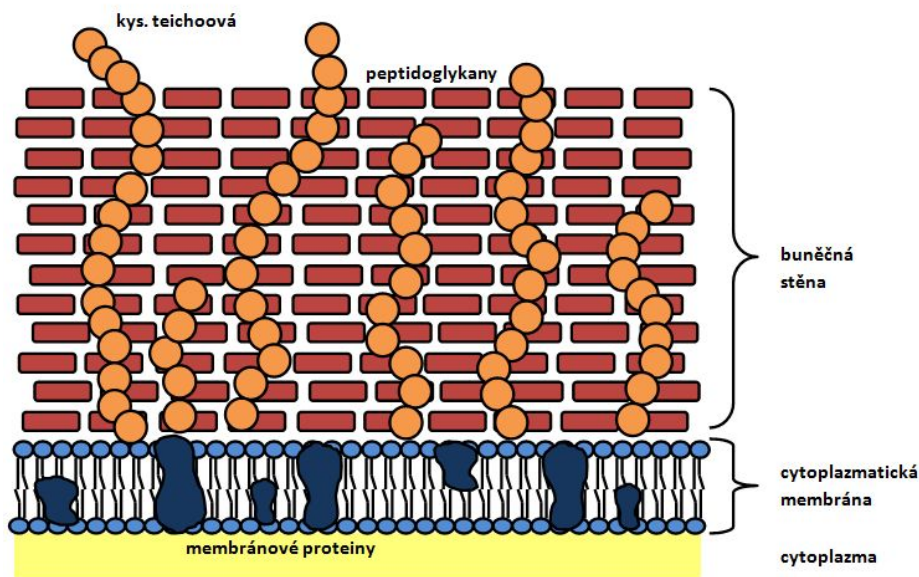
Mikroorganismy jsou schopné si vyvinout obranné mechanismy vůči antimikrobiálním látkám. I přes velký počet vynalezených antimikrobiálních látek, které můžeme volit pro terapii infekcí, existuje ke všem z nich antimikrobiální rezistence.

Mezi hlavní mechanismy patří omezení vychytávání léčiva, modifikace jeho cíle, inaktivace léku a aktivní eflux. Tyto mechanismy mohou být pro bakterie vrozené nebo získané od jiných mikroorganismů. Pochopení mechanismů vede k lepším možnostem léčby a vývoji antimikrobiálních látek, které by mohly odolat obranným mechanismům bakterie.

ATB fungují na základě různých interakcí s patogenem. Patří mezi ně inhibice syntézy buněčné stěny, narušení buněčné membrány, inhibice syntézy proteinů, inhibice syntézy nukleových kyselin a inhibice dalších metabolických drah v bakteriích. Syntézu buněčné stěny inhibují beta-laktamová a glykopeptidová ATB. Mezi beta-laktamová ATB patří karbapenemy, cefalosporiny, monobaktamy a peniciliny. Lipopeptidy depolarizují buněčnou membránu bakterie. Syntézu proteinů inhibují aminoglykosidy, tetracykliny, chloramfenikoly, makrolidy, linkosamidy, oxazolidinony a streptograminy. Chinolony a fluorochinolony inhibují syntézu nukleových kyselin a inhibici metabolických drah způsobují např. sulfonamidy a trimethoprim.

Kvůli odlišné struktuře grampozitivních (Obr. 1) a gramnegativních (Obr. 2) bakterií se využívané mechanismy liší. Grampozitivní bakterie nemají na rozdíl od gramnegativních bakterií vnější membránu, mají tedy méně možností, jak se ATB bránit. (5,8)

**Obrázek 1 – Grampozitivní bakterie – struktura stěny**

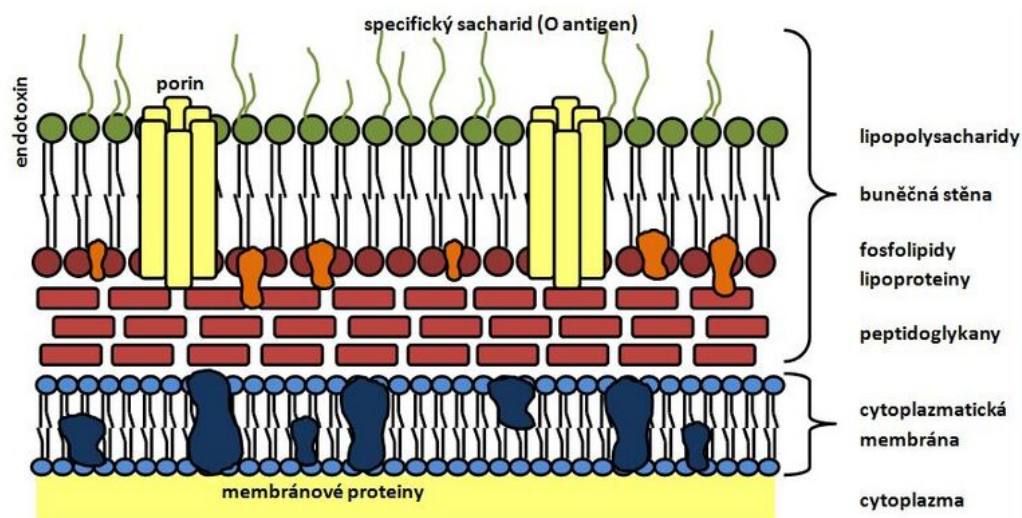


Zdroj

[https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram\\_pozitivn%C3%AD.JPG#/media/Soubor:Gram\\_pozitivní.JPG](https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram_pozitivn%C3%AD.JPG#/media/Soubor:Gram_pozitivní.JPG)

obrázku:

**Obrázek 2 – Gramnegativní bakterie – struktura stěny**



Zdroj

[https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram\\_negativn%C3%AD.JPG#/media/Soubor:Gram\\_negativní.JPG](https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Gram_negativn%C3%AD.JPG#/media/Soubor:Gram_negativní.JPG)

obrázku:

Antimikrobiální látky mohou být zaměřeny na mnoho různých částí bakteriální buňky, ale stejně tak existuje mnoho částí buňky, které mohou bakterie změnit, aby se staly vůči ATB rezistentní. (8)

### **2.1.3.1 Změna vychytávání léčiva bakteriální buňkou**

#### *2.1.3.1.1 Vrozená rezistence*

Gramnegativní bakterie mají ve vnější membráně lipopolysacharidy (LPS), které poskytují bariéru pro určité molekuly. Membrána je tedy přirozeně chráněná proti určitým skupinám ATB. Mykobakterie obsahují vysoké procento lipidů ve své vnější membráně, a to způsobuje omezený přístup hydrofilním léčivům, naopak hydrofobní léčiva, jako jsou rifampicin a fluorochinolony mají přístup k buňce snadnější. (8)

#### *2.1.3.1.2 Získaná rezistence*

Gramnegativní bakterie mají ve vnější membráně mimo LPS také poriny. Poriny jsou proteinové molekuly, které bakterii slouží jako kanálky, kterými prostupují látky jako jsou například ATB. Bakterie může omezit příslušný typ porinů nebo změnit propustnost těmito poriny, a tím se ATB nedostane k cílovému místu. Některá ATB s velkými molekulami nejsou schopna prostoupit skrze poriny, a proto se jejich účinek vztahuje pouze ke grampozitivním bakteriím. Grampozitivní bakterie vnější membránu nemají, a proto tato bariéra vstupu léčiva není tolik častá. U *Enterococcus aerogenes* byla pozorována mutace v porinovém kanálu, která jim zajistila rezistenci vůči imipenemu a některým cefalosporinům. U *Neisseria gonorrhoeae* mutace způsobila rezistenci vůči beta-laktamům a tetracyklinu. (5,8)

Dalším bakteriemi oblíbeným mechanismem je tvorba bariéry kolem buňky. Například pouzdro brání přístup ATB, podobně tvorba hlenu, pokud bakterie roste v biofilmu. Biofilmová matrice obsahuje polysacharidy, proteiny a deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) z bakterií a ztěžuje tak antimikrobiálním látkám přístup k bakterii. (5,8)

### **2.1.3.2 Modifikace cíle léčiva**

V buňce se nachází více cílových struktur a stejně tak i bakterie mohou tyto cíle různě modifikovat, aby se chránily. Mezi tyto cíle patří například enzymy, ribozomy nebo některé stavební prvky buněčné membrány. Jedním z mechanismů vůči beta-laktamům je změna struktury anebo počtu proteinů vazajících penicilin. Tento mechanismus používají výhradně grampozitivní bakterie. Změna struktury může snižovat schopnost vazby ATB nebo ho zcela inhibovat. Změna počtu proteinů ovlivňuje množství léčiva, které je schopno se navázat na cíl. (5,8)

### **2.1.3.3 Inaktivace léčiva**

Bakterie léčivo degradují nebo ho inaktivují enzymatickým přenosem chemické skupiny. Na léčivo přenáší nejčastěji acetylové, fosforylové nebo adenylové skupiny. Acetylace inhibuje například aminoglykosidy, chloramfenikol, streptograminy a fluorochinolony. Fosforylace a adenylace nejvíce působí proti aminoglykosidům. (8)

### **2.1.3.4 Aktivní eflux**

Bakterie mají na svém povrchu efluxní transmembránové systémy, které zbavují buňku toxických látek i proti koncentračnímu gradientu. Tento proces je energeticky náročný a vyžaduje určité množství energie. Systém ABC (ABC transportér, ATP-binding cassette) využívá zdroj energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Další pumpy využívají jako zdroj protonový nebo sodný gradient. Existuje mnoho různých typů efluxních pump. Klasifikují se většinou podle struktury a zdroje energie. Nejčastěji jsou to pumpy jednosložkové a transportují látky přes cytoplazmatickou membránu. Pumpy mají omezenou kapacitu čerpání za jednotku času. Jedná se tedy o saturabilní děj. Naopak výhodou těchto pump je to, že efluxní pumpy jsou fyziologickou součástí bakterie. Nemusí tedy složitě získávat tento způsob rezistence. Další výhodou může být čerpání několika druhů nežádoucích molekul. To zajišťuje bakterii odolnost proti více druhům ATB zároveň. (5,8)

### **2.1.4 Selekční tlak**

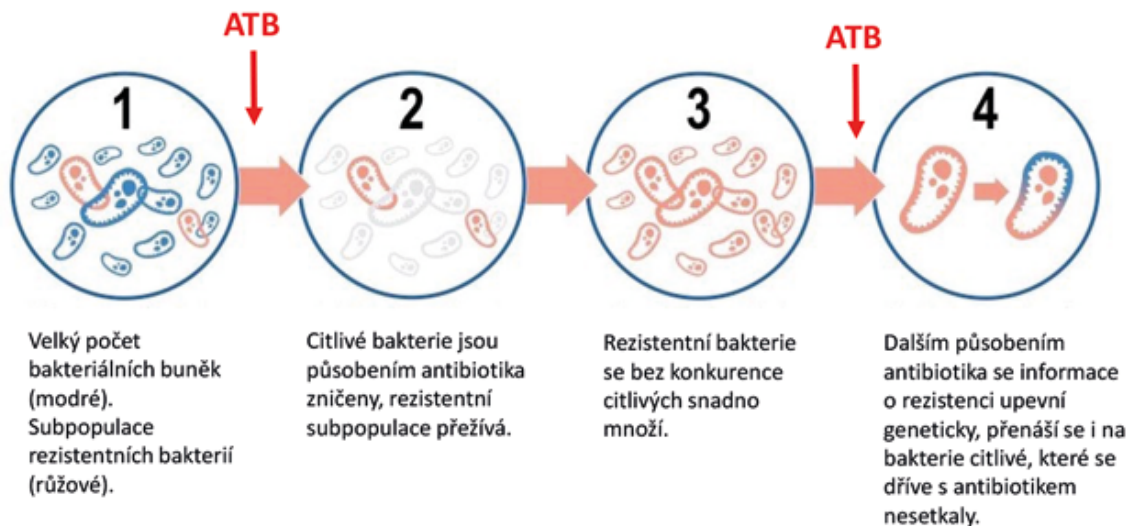
Vývoj rezistence může souviset se spotřebou ATB. Při málo častém užívání antimikrobiální látky je selekční tlak malý. Bakterie tak nemají zapotřebí reagovat na tuto situaci, aby si nezhoršily celkovou zdatnost přibíráním genů. Pokud je však používání látky časté a selekční tlak přesáhne určité kritické hranice, začnou se bakterie bránit i za cenu snížení zdatnosti. Bojují o přežití a snaží se získat geny pro rezistenci (Obr. 3). (5)

Ke zvýšení selekčního tlaku také napomáhají užívaná ATB v humánní a veterinární medicíně, která se dostávají do životního prostředí skrze odpadní vody z čistíren, nemocnic nebo zemědělském odpadu a při úniku z kontejnerů a skládek. Geny pro rezistenci jsou uvolňovány do životního prostředí společně s antibiotickými sloučeninami. To vyvíjí selekční tlak na bakterie, který zvyšuje prevalenci rezistence. (10)



Existují však odborné studie, které vyvrací přímou souvislost mezi užíváním určitého ATB a bakteriální rezistencí. Například pokles užívání cefalosporinů III. generace a fluorochinolonů neznamenal snížení odolnosti bakterií vůči těmto ATB. (11)

**Obrázek 3 – Selekční tlak antibiotik**



Zdroj obrázku: <https://images.app.goo.gl/h9jD1ZQELKpfzy299>

### 2.1.5 Multirezistentní kmeny

Pojem multirezistence (MDR, multiple drug resistance) vznikl s rozšířeným používáním ATB. Znamená to, že je kmen rezistentní minimálně k jednomu přípravku ze tří různých relevantních skupin ATB. Příčinou bylo nesprávné užívání a nadužívání ATB, nedostatečná investice do výzkumu nových ATB a šíření MDR bakterií.

První případ multirezistence byl objeven u *Mycobacterium tuberculosis*. Označení MDR-TB znamená rezistenci *Mycobacterium tuberculosis* k rifampicinu a isoniazidu, tedy ke dvěma nejdůležitějším antituberkulotikům. Na začátku 21. století byl sestaven a přijat systém hodnocení MDR u běžných bakteriálních patogenů. V Evropě tuto situaci sleduje Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control). Podle každoročních přehledů se vyskytují velké rozdíly mezi jednotlivými zeměmi. Z grampozitivních bakterií se pravidelně sledují např. kmeny *Staphylococcus aureus* nebo enterokoky. U gramnegativních bakterií je vzrůstající rezistence ještě větší. Zde se hlavně sledují enterobakterie s rezistencí k cefalosporinům III. generace. (4,5)

## 2.1.6 ESKAPE patogeny

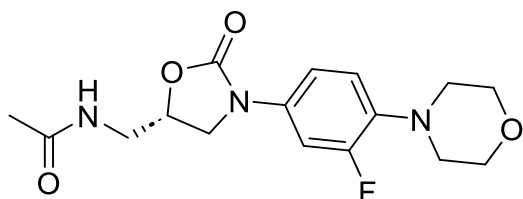
Zkratka ESKAPE je názvem pro skupinu šesti multirezistentních bakterií, které představují globální hrozbu ve zdravotnictví a vedou k obrovské morbiditě a mortalitě. Do této skupiny patří: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter species*. (12)

V současné době nefunguje žádný systematický dohled nad antibiotickou rezistencí, ale podle odhadů v Evropě každým rokem zemře přes 33 000 pacientů s infekcí způsobenou rezistentními bakteriemi. V roce 2017 označila WHO ESKAPE patogeny jako prioritní, u kterých je naléhavě zapotřebí se zaměřit na výzkum a vývoj nových ATB. Pomocí různých mechanismů si ESKAPE patogeny vytvořily rezistenci vůči oxazolidinonům, lipopeptidům, makrolidům, fluorochinolonům, tetracyklinům, beta-laktamům a též antibiotikům poslední linie, jako jsou karbapenemy, glykopeptidy a polymyxiny. (12)

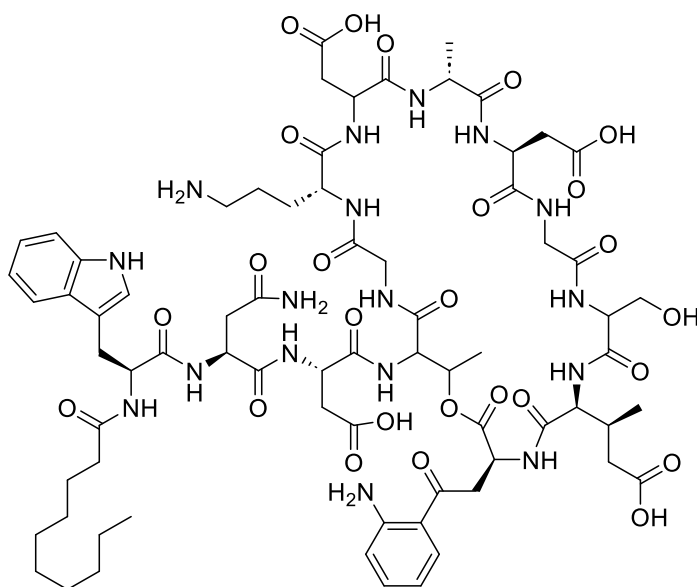
### 2.1.6.1 Vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE)

Enterokoky jsou přirozenou mikroflórou GIT (gastrointestinálního traktu). Zařazujeme je podle Grama mezi grampozitivní koky, které se vyskytují ve dvojicích nebo v řetězcích. Grampozitivní bakterie identifikujeme pomocí barviva krystalové violeti, která interaguje se silnou peptidoglykanovou vrstvou a pod mikroskopem tak vidíme bakterie modrofialově. Ve vztahu ke kyslíku jsou enterokoky fakultativně anaerobní organismy. Jejich kultivace je poměrně nenáročná. Běžně fungují komenzálně s lidským organismem, avšak mohou způsobovat různé infekce. Nejčastějšími onemocněními jsou infekce močových cest, intraabdominální infekce nebo infekční endokarditida. Vzácně mohou být původci meningitidy, osteomyelitidy nebo zápalu plic. Většina infekcí je způsobována *Enterococcus faecalis*, který bývá citlivý na beta-laktamy. Proto by beta-laktamy měly být první volbou léčby infekce. Naopak druh *Enterococcus faecium* je vůči beta-laktamům odolný. Primární léčbou na VRE jsou linezolid (Obr. 4) a daptomycin (Obr. 5). (13)

**Obrázek 4 – Linezolid**



**Obrázek 5 – Daptomycin**



Díky různým mechanismům, které si enterokoky vytvořily, jsou rezistentní vůči několika ATB. Patří mezi ně například beta-laktamy, tetracykliny, chinolony a vankomycin. Rezistence na vankomycin je způsobena změnou v syntéze peptidoglykanu, který tvoří bakteriální buněčnou stěnu. Konec proteinových prekurzorů peptidoglykanu se změní, a to způsobí slabší vazbu vankomycinu. VRE byly prokázány v Evropě v 80. letech minulého století nejspíš kvůli glykopeptidovému antibiotiku avoparcinu, který se využíval jako růstový stimulant při chovu hospodářských zvířat. V dnešní době je nejčastějším rizikovým faktorem předchází antimikrobiální léčba. (13)

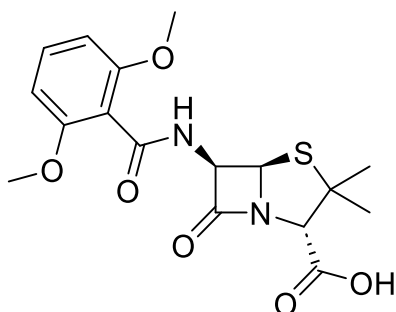
### **2.1.6.2 Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

SA, nazývaný také jako zlatý stafylokok, je přizpůsobivá grampozitivní bakterie vyskytující se ve shlucích. Je to fakultativně anaerobní kok, který je součástí běžné mikroflóry člověka a některých zvířat. Přirozeně kolonizuje nosní sliznice, kůži, vzácněji pak axily, GIT a vaginu. Stafylokoky mají poměrně nenáročné podmínky pro kultivaci.

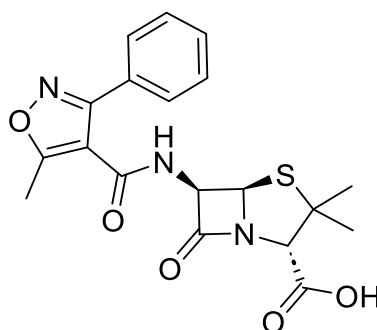
Rostou na jedné z nejběžnějších kultivačních půd, a tou je krevní agar. Katalázovým testem rozlišujeme pomocí peroxidu vodíku rod stafylokoků nebo streptokoků. U stafylokoků je tento test pozitivní a poznáme to tak, že se tvoří malé bublinky plynu. Stafylokoky dále rozlišujeme podle plazmakoagulázového testu, který je u SA koaguláza pozitivní. Jsou oportunními patogeny, které zapříčiňují především nozokomiální, ale i komunitní infekce. Mohou způsobovat mírné záněty kůže a měkkých tkání, infekce dýchacích cest i závažná onemocnění jako je osteomyelitida, endokarditida a syndrom toxického šoku. Infekce způsobují lidem různého věku i původu, avšak rizikovější jsou u malých dětí, seniorů a imunosuprimovaných jedinců. (14,15)

SA je známý tím, že je vysoce adaptabilní. Pouze několik let po zavedení penicilinu do léčebné praxe si k němu vyvinul rezistenci. Obranným mechanismem byla tvorba enzymů beta-laktamázy, které hydrolyzovaly beta-laktamový kruh penicilinu, který je potřebný k jeho antimikrobní aktivitě. Byly proto vytvořeny polosyntetické peniciliny, které byly vůči beta-laktamáze odolné. Mezi tyto peniciliny patří methicilin (Obr. 6) a oxacilin (Obr. 7).

**Obrázek 6 – Methicilin**



**Obrázek 7 – Oxacilin**



V roce 1961 se však vyskytla rezistence i vůči těmto ATB. Bylo zjištěno, že tyto kmeny SA jsou rezistentní vůči všem beta-laktamovým ATB včetně karbapenemům a některým cefalosporinům. Rezistence je způsobena tvorbou PBP2a (protein vázající penicilin, penicillin-binding protein), který je produktem genu *mecA* a snižuje afinitu k penicilinu a beta-laktamovým ATB. Gen *mecA* SA získává u neznámých heterologních zdrojů.

MRSA rozdělujeme do tří skupin: MRSA, který se vyskytuje v nemocničním prostředí (HA-MRSA). Pacienti jsou vystaveni MRSA kvůli hospitalizaci, hemodialýze nebo chirurgickým zákrokům. Jsou spojovány s těžkou pneumonií a infekcemi krevního

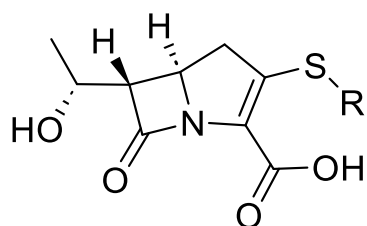
řečiště. Druhou skupinou je CA-MRSA, tedy komunitní MRSA, kdy je jedinec infikován rezistentním kmenem bez kontaktu se zdravotnickým zařízením. Jsou spojovány s infekcemi kůže a měkkých tkání. Třetí skupinou je MRSA, která souvisí s hospodářskými zvířaty, tzv. LA-MRSA. Ta se v současnosti vyskytuje pouze u rizikových skupin pracovníků se zvířaty. (5,12,14,15)

### **2.1.6.3 *Klebsiella pneumoniae* odolná vůči karbapenemům (KPC)**

*Klebsiella pneumoniae* (KP) je gramnegativní tyčkovitá bakterie. Patří mezi fakultativně anaerobní bakterie, které jsou nepohyblivé a zapouzdřené. Přirozeně se vyskytuje v půdě a povrchových vodách a je součástí běžné lidské flóry. Osidluje nejčastěji lidské sliznice, včetně GIT a orofaryngu. Pokud se dostanou do jiných tkání, mohou způsobit lehké infekce jako infekce močových cest, ale i těžké infekce jako pneumonie nebo meningitida. Jedná se o oportunní bakterii, která dříve způsobovala infekce imunokompromitovaným jedincům. V současné době se rozšířil výskyt hypervirulentních kmenů, které infikují i zdravé jedince. Kromě toho se stávají odolnými vůči několika ATB. (16)

Existují dva hlavní typy rezistence, kde první mechanismus rezistence zahrnuje expresi beta-laktamázu s rozšířeným spektrem (ESBL, Extended Spectrum Beta-Lactamases) a to činí bakterie odolné vůči cefalosporinům a monobaktamům. Druhým mechanismem rezistence je exprese karbapenemázy, která způsobuje rezistenci téměř ke všem dostupným beta-laktamům, včetně karbapenemů (Obr. 8). Jelikož byl první případ KP exprimující karbapenemázu objeven v Severní Karolíně roku 1996, nazýváme tento typ KPC. Šíření multirezistentních kmenů KP se v poslední době velice zkoumalo a kmeny se klasifikovaly podle sekvenčních typů, které jsou definovány svými nukleotidovými sekvencemi na sedmi lokusech. (16)

**Obrázek 8 – Obecná struktura karbapenemů**



#### **2.1.6.4 *Acinetobacter baumannii***

Zcela běžně vyskytující bakterií ve vodě a půdě je *Acinetobacter baumannii* (ACI). Je to oportunní gramnegativní bakterie, která pro zdravého jedince nepředstavuje nebezpečí. Nebezpečí ale představuje v nemocnici, se kterou je primárně spojován. Infekce se vyskytují u pacientů hospitalizovaných i u pacientů, kteří jsou v úzkém kontaktu se systémem zdravotní péče. Bakterie je specificky zaměřená na vlhké tkáně, jako jsou sliznice nebo poraněná narušená kůže. Historicky byla bakterie spojována s horkým a vlhkým klimatem. Avšak v současnosti má ACI stále běžnější výskyt v mírném podnebí. Ve srovnání s jinými ESKAPE patogeny je míra infekce u ACI poměrně nízká, avšak přibližně 45 % izolátů je považováno za MDR. Míra rezistence však ve Spojených státech přesahuje 60 % a v Turecku a Řecku až 90 %. Přestože byl ACI v 70. letech minulého století citlivý na většinu ATB, díky svému sklonu k rychlému rozvoji rezistence, vykazuje dnes rozsáhlou rezistenci vůči karbapenemům a jiným beta-laktamům. (12,17)

#### **2.1.6.5 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) patří mezi gramnegativní tyčkovité bakterie. Je hojně rozšířená ve vodním prostředí. Vyskytuje se nejčastěji u imunokompromitovaných pacientů s respiračními infekcemi nebo s rakovinou. Bakterie je oportunní a považuje se za původce komunitních infekcí, přestože má značný podíl i u nozokomiálních infekcí. LPS je u jiných gramnegativních tyčinek mnohem více toxický než u PA. PA má schopnost chronicky přetrvávat v organismu, protože vyvolává nízkou zánětlivou reakci, a také se vyhýbat léčbě antibiotiky. Genom PA se skládá z jednoho kruhového chromozomu, který je relativně velký. Díky tomu kóduje velké množství enzymů pro různé metabolické dráhy. Dále více než 8 % genomu kóduje regulační geny, které umožňují adaptaci na měnící se prostředí. V současnosti je PA rezistentní vůči více třídám ATB. (12,18)

#### **2.1.6.6 *Enterobacter species***

*Enterobacter* je rod gramnegativních tyčinek, které jsou fakultativně anaerobní. Na rozdíl od ostatních ESKAPE kmenů je složitější najít vhodná ATB v důsledku jejich rychlému exponenciálnímu vývoji. Do rodu *Enterobacter* patří několik druhů, které mohou být oportunními patogeny nebo se běžně vyskytují v životním prostředí. Mezi

klinicky nejznámější druhy tohoto rodu patří *Enterobacter aerogenes* a *Enterobacter cloacae*. Odolnost bakterie je vysoká díky schopnosti řízení různých mechanismů rezistence prostřednictvím regulačních genů a díky modulaci exprese proteinů, včetně enzymů a membránových transportérů. Je součástí hlavních bakterií, které způsobují rezistentní nozokomiální infekce. Mají vrozenou rezistenci k aminopenicilinům, cefalosporinům první generace a cefoxitinu. Navíc byla popsána i produkce ESBL, což ztěžuje léčbu. (19)

## **2.2 Systematika antibiotik**

Antibiotika se vážou na bakterie různými způsoby a narušují jejich funkci. Mohou porušovat buněčnou stěnu, membránu, DNA či působí na jiné struktury a buněčné děje, čímž zabraňují bakterii v přežití.

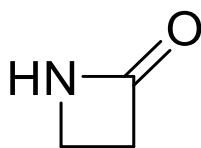
### **2.2.1 Antibiotika působící proti buněčné stěně bakterií**

Buněčná stěna je nepostradatelnou součástí většiny grampozitivních i gramnegativních bakterií. Součástí této stěny bakterií je peptidoglykan, na který mohou ATB selektivně působit, aby nepoškodila buňky lidského organismu. Peptidoglykan má u bakterií klíčovou roli, a tou je ochrana buňky před okolním prostředím. ATB nejsou schopná peptidoglykan rozkládat, tak jak tomu je například u enzymu lysozymu, který je fyziologicky v lidském těle, např. ve slinách, nosním hlenu či krevní plazmě. Jejich mechanismus spočívá v zábraně syntézy peptidoglykanu. Příkladem může být blokování klíčových metabolických reakcí pomocí falešných substrátů. Mezi ATB, která takto působí na bakterie, patří beta-laktamy, glykopeptidy, lipoglykopeptidy, fosfomycin a teixobaktin. (5,20)

#### **2.2.1.1 Beta-laktamová antibiotika**

Beta-laktamová ATB jsou jednou z nejvýznamnějších a nejčastěji předepisovaných skupinou ATB. Existuje pět různých tříd, mezi které patří peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktramy a některé inhibitory beta-laktamázy. Z biochemického hlediska mají všechny tyto podskupiny společný základ čtyřčlenného beta-laktamového kruhu (Obr. 9), který je vysoce reaktivní. Připojuje často další kruhové formace. (21)

**Obrázek 9 – Beta-laktamový kruh**



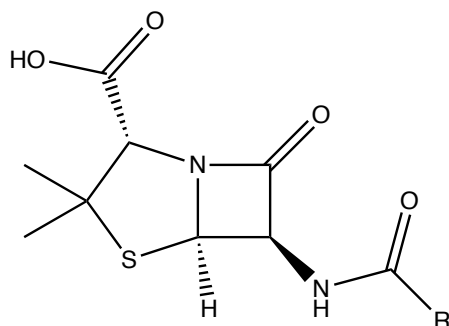
Mechanismem beta-laktamů je interakce s transpeptidázami a jejich následná inaktivace. Transpeptidázy jsou enzymy, které tvoří v molekule peptidoglykanu příčné vazby mezi řetězci peptidů. Bakterie tyto enzymy využívá pro správnou výstavbu buněčné stěny. Beta-laktamová ATB napodobují svojí strukturou koncové části peptidových řetězců a působí jako falešné substráty, které blokuje funkci enzymů. (5)

Rezistence vůči beta-laktamům je alarmující. Nejčastější formou rezistence je enzym beta-laktamáza. Tyto bakteriální enzymy ATB inaktivují tak, že rozkládají molekuly beta-laktamů. Beta-laktamázy svou strukturou napodobují důležitý stavební prvek buněčné stěny, a tím je transpeptidáza. ATB se pak mylně váže na beta-laktamázy a dojde ke štěpení peptidické vazby. (5,21)

#### 2.2.1.1.1 Peniciliny

Nejstaršími ATB jsou právě peniciliny, které jsou klinicky stále hojně používané, nejčastěji k léčbě streptokokových infekcí. Obsahují beta-laktamový kruh, na který je napojen thiazolidinový kruh. K tomuto jádru se dále váží různé postranní řetězce (Obr. 10). (21)

**Obrázek 10 – Obecný vzorec penicilinu**



Objevitel penicilinu Alexandr Fleming nebyl schopen účinnou látku z filtrátu kultury *Penicillium notatum* chemicky identifikovat. Až několik let po objevu se podařila látka izolovat. Následně byl uskutečněn první terapeutický pokus a brzy poté byla zahájena



průmyslová výroba penicilinu. Až v 50. letech minulého století se v laboratoři podařila totální syntéza penicilinu. To umožnilo vývoj nových vylepšených penicilinových ATB. (5) Jsou to netoxická léčiva, takže jsou vhodné pro děti, gravidní ženy i seniory. Většina penicilinů musí být podávána parenterálně, jelikož jejich vstřebávání v GIT je omezené. Lékové interakce se vyskytují pouze výjimečně. Mezi nejznámější penicilinová ATB patří penicilin G, penicilin V, oxacilin, kloxacilin, ampicilin, amoxicilin a mnoho dalších. (5,22)

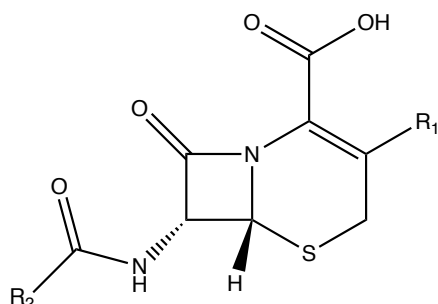
#### 2.2.1.1.2 Cefalosporiny

Cefalosporiny obsahují beta-laktamový kruh a postranní dihydrothiazinový kruh, a spolu tvoří jádro, na které se váží postranní řetězce (Obr. 11). (21)

Tato třída ATB byla objevena v roce 1945 jako produkt plísně *Cefalosporium acremonium*. Výhodou cefalosporinů je velká přístupnost různých substitucí na cefalosporinovém skeletu. Byla tak vytvořena veliká skupina ATB dělená nyní do 5 generací na základě antimikrobiálních vlastností. (5)

Stejně jako peniciliny působí baktericidně, ale slouží spíše pro léčbu závažných infekcí způsobených gramnegativními aerobními bakteriemi. Z GIT se vstřebávají cefalosporiny omezeně, ale pomocí esterové vazby a připojením postranních řetězců byly cefalosporiny upraveny i pro orální podání. Podmínkou je však užívání spolu s jídlem. Cefalosporiny nevykazují žádnou orgánovou toxicitu a nežádoucí účinky bývají minimální. (5,22)

#### **Obrázek 11 – Obecný vzorec cefalosporinu**



#### 2.2.1.1.3 Karbapenemy

Chemická struktura karbapenemů se skládá z beta-laktamového kruhu, který je spojen s dihydropyrrolovým kruhem (Obr. 8). Tato struktura poskytuje ochranu proti většině beta-laktamáz. Mají silnou širokospektrální antibakteriální aktivitu. Prvním

identifikovaným karbapenemem byl thienamycin. Byl silným účinným ATB, ale kvůli své chemické nestabilitě nemohl být využit k léčebným potřebám. Molekula byla proto modifikována a vznikly tak polosyntetické karbapenemy jako je imipenem, meropenem, ertapenem a doripenem. (21,22)

### **2.2.1.2 Glykopeptidy**

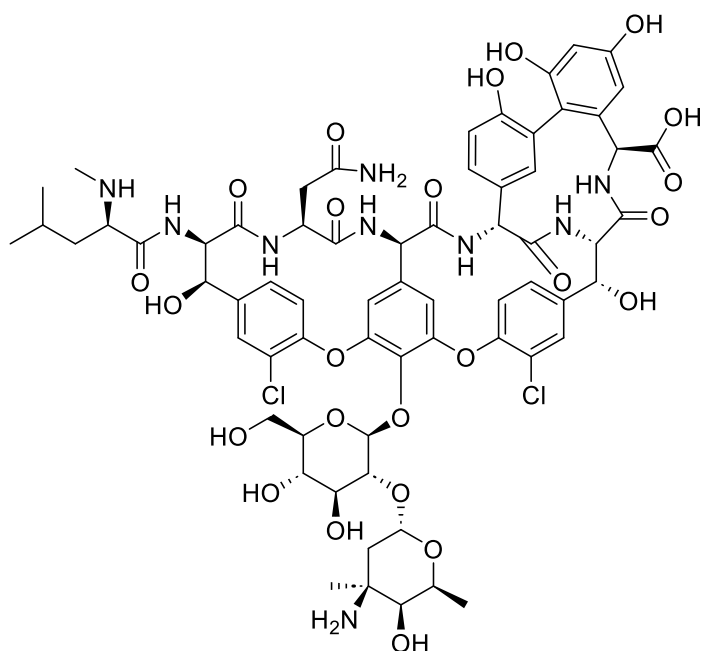
Glykopeptidová ATB hrají v boji proti rezistentním kmenům významnou roli. Využívají se k léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi. Semisyntetické deriváty umožňují léčbu infekcí rezistentních na vankomycin, který byl uveden na trh jako první. Teikoplanin je zástupce první generace a byl izolován z aktinomycety *Actinoplanes teichomyceticus*. Do druhé generace zařazujeme semisyntetická ATB jako jsou dalbavancin, telavancin a oritavancin. (23)

Tato ATB jsou tvořena z velkých rigidních molekul, která inhibují pozdní fázi syntézy peptidoglykanů bakteriální buněčné stěny. Molekuly glykopeptidů se skládají ze tří hlavních částí. První část je peptidový řetězec tvořený sedmi aminokyselinami (AMK). Druhá část je tvořena pěti až sedmi vzájemně propojenými aromatickými kruhy, které tvoří okolo peptidové kostry několik cyklických formací. Poslední část se nachází na obvodu molekuly a je tvořena dvěma až třemi cukry nebo aminocukry. Tyto trojrozměrné struktury glykopeptidů obsahují štěrbinu, do které se vejdou peptidy s vysoce specifickou konfigurací, které se nacházejí pouze v bakteriálních buněčných stěnách. ATB interagují s těmito peptidy vodíkovou vazbou a tvoří stabilní komplexy. Vznik rezistence vůči těmto ATB je obtížnější. (5,24)

#### **2.2.1.2.1 Vankomycin**

Nejznámějším zástupcem glykopeptidových ATB je právě vankomycin (Obr. 12). Působí pomalu baktericidně. Užívání vankomycinu stoupl s nárůstem MRSA v nemocnicích. Byl tedy součástí parenterální terapie infekcí MRSA do doby, dokud nebyla hlášena vysoká úroveň rezistence na VRE. (23)

**Obrázek 12 – Vankomycin**



### 2.2.2 Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií

Buněčná membrána, nazývaná též jako cytoplazmatická membrána, je důležitou bariérou pro bakterie. Ohraničuje hlavní hranici vymezující buněčnou cytoplazmu a zajišťuje spolu s buněčnou stěnou oddělení od okolního prostoru. Je složena ze zhruba stejných podílů proteinů a lipidů. Lipidy tvoří dvouvrstvou strukturu. (25)

Hlavní dvě funkce buněčné membrány jsou především bariérová funkce a místo ukotvení důležitých enzymů. Mezi bariérové funkce patří regulace transportu látek ven a dovnitř buňky. Nejdůležitějšími enzymy zakotvenými v buněčné membráně jsou enzymy dýchacího řetězce, které tvoří velké množství ATP. Energie je potřebná pro řadu enzymatických reakcí. (5)

ATB této skupiny působí především na aerobní bakterie, které získávají energii právě z dýchacího řetězce. Tento oxidačně-redukční děj se odehrává na buněčné membráně a tvoří se protonový gradient. Specifické je pro tuto skupinu i to, že je jejich účinek rychlý. Působí baktericidně a bez ohledu na fázi množení či na klidový stav, jelikož bakterie není schopná bez správné funkce membrány udržet protonový gradient. Důležitá je koncentrace těchto ATB, jelikož na ní závisí účinek. Pro větší destruktivní účinek je zapotřebí větší množství molekul ATB. Menší poškození nemusí bakterii úplně zabít.

Nevýhodou těchto ATB je toxicita vůči lidským eukaryotním buňkám, které mají podobnou strukturu cytoplazmatické membrány. Mnoho ATB z této skupiny se pro celkovou léčbu nepoužívá kvůli své toxicitě. Často se podávají jen v případech, kdy je to nutné a jiné bezpečnější léky nezabírají. (5)

### **2.2.2.1 Cyklické lipopeptidy**

Skupina cyklických lipopeptidů tvoří největší skupinu, která byla objevena z přírodních produktů, které vykazují užitečné biologické aktivity. Skládá se z acylových postranních řetězců a různých neobvyklých AMK. Různorodá struktura antibiotické molekuly umožňuje širokou škálu biologických aktivit a strukturní diverzitu. Často však strukturní podobnosti neodrážejí podobnost biologických aktivit v cyklických lipopeptidech. (26)

Jelikož se jedná o peptidová ATB, působí toxicky na membrány eukaryotických buněk, pokud jsou podávána ve vysoké koncentraci. Dalším specifickým nežádoucím účinkem je nefrotoxicita. Velmi často se lipopeptidová ATB užívají k lokální léčbě. (5)

Mezi nejznámější zástupce cyklické lipopeptidové skupiny patří daptomycin, kolistin a bacitracin. Kolistin a daptomycin jsou používány pro léčbu multirezistentních kmenů. Jednotlivě se liší ve spektru účinku. (27)

#### **2.2.2.1.1 Daptomycin**

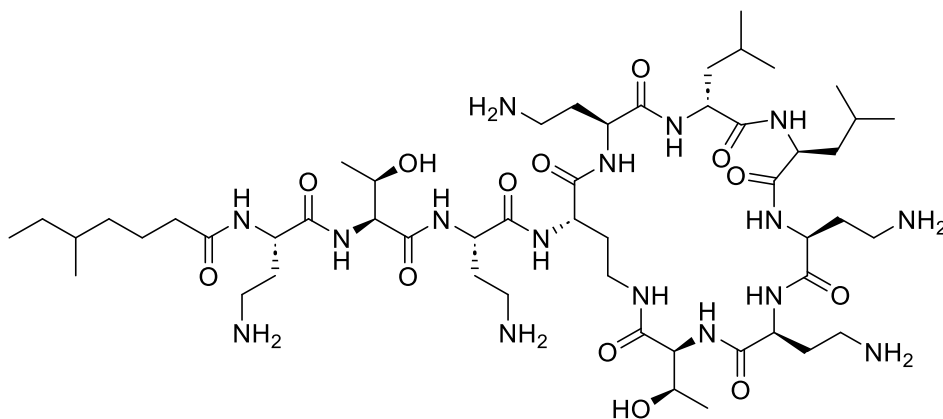
Molekula daptomycinu se skládá z cyklického polypeptidového jádra o 13 AMK, z nichž 10 AMK tvoří kruh uzavřený esterovou vazbou (Obr. 5). ATB bylo objeveno jako produkt bakterie *Streptomyces reeseosporus*. Spektrum účinku se omezuje pouze na grampozitivní bakterie. Většina kmenů streptokoků, stafylokoků a pneumokoků je na toto ATB citlivá. ATB je účinné i proti oxacilin-rezistentním a vankomycin-rezistentním stafylokokům. Získaná rezistence u grampozitivních bakterií je vzácná. (28)

#### **2.2.2.1.2 Kolistin**

Molekula kolistinu je složena z 11 AMK. Na acylový konec je připojena větvená MK a tento konec je tedy na rozdíl od peptidové hydrofilní části hydrofobní (Obr. 13). MK je nezbytná pro vysokou antimikrobiální aktivitu. Kolistin je vyráběn ve dvou formách. Kolistin-sulfát je však toxický a využívá se proto spíše lokálně. Pro celkové podání se používá kolistin-methansulfonát. Kolistin působí na většinu gramnegativních aerobně

rostoucích bacilů. Proti gramnegativním kokům a grampozitivním bakteriím je neúčinný. Od roku 2010 se zvyšuje rezistence na kolistin. Řešením může být například kombinace kolistinu s dalším ATB. Míra toxicity kolistinu je v dnešní době jednoznačně v menší míře oproti 60. let minulého století, kdy byl významně nefrotoxický a neurotoxický v důsledku přítomných nečistot. (5,27)

### **Obrázek 13 – Kolistin**



### **2.2.2.2 Aminoglykosidy**

Aminoglykosidová ATB jsou širokospektrální a rychle působící baktericidní látky. Jedná se o přírodní nebo polysyntetická ATB odvozena z aktinomycet. Jsou účinná proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Zvláště účinné jsou proti *Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae* a členům čeledi *Enterobacteriaceae*. Kromě toho jsou účinné i proti *Yersinia pestis*, tedy proti původci moru, proti SA, včetně MRSA a proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum* a dalším. Naopak neúčinné jsou proti anaerobním bakteriím a rodům *Streptococcus* a *Enterococcus*. (29)

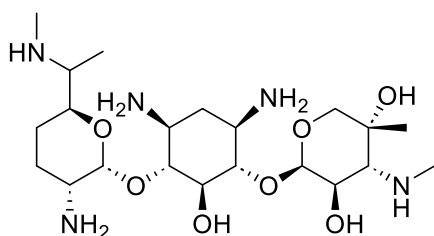
Strukturálně se jedná o cyklické aminopolyalkoholy, na které se glykosidickou vazbou pojí molekuly aminocukrů. Na základě aminocykloalkoholové skupiny se aminoglykosidy dělí do podtříd. (29)

Aminoglykosidy mají dvojí antibiotický účinek. Prvním je inhibice proteosyntézy probíhající na ribozomech a druhým je poškození buněčné membrány. Na ribozomy působí vazbou na menší 30S podjednotku ribozomu. Podporuje chybnou translaci tím, že indukuje chybné čtení kodonů při dodání aminoacyl transferové ribonukleové

kyseliny (RNA). Účinek na buněčnou membránu vždy předchází účinek na ribozomy. Pravděpodobně je proto významnější. (5,29)

Mezi nejužívanější aminoglykosidová ATB patří gentamicin, amikacin, tobramycin, streptomycin a neomycin. Gentamicin (Obr. 14) je z vyjmenovaných nejpoužívanější. Jeho antibakteriální účinek je intenzivní, další výhodou je nízká cena. Nevýhodou gentamicinu jsou místa, na které bakterie útočí modifikacemi exoenzymů a tím ATB inaktivují. Amikacin má širší spektrum účinku než gentamicin, ale antimikrobiální účinek je slabší. Tobramycin je využíván především u pseudomonádových a topických infekcí. Streptomycin je oproti ostatním aminoglykosidům nejméně nefrotoxický, naopak je silně ototoxický. (5,29)

**Obrázek 14 – Gentamicin**



### 2.2.3 Antibiotika působící na nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny, DNA a RNA obsahují genetickou informaci, kterou přenáší. Struktura DNA je tvořena dvoušroubovicí a RNA je tvořena jedním vláknem nukleotidů. Jejich klíčovou funkcí je syntéza proteinů, kde se překládá genetický kód do AMK sekvence. (30)

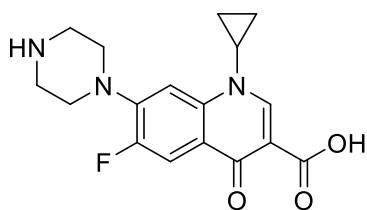
ATB tohoto typu mohou působit tak, že inhibují syntézu nukleových kyselin, modifikují jejich konformaci nebo způsobují nevratné stavy. ATB působící na bakteriální DNA jsou baktericidní. (31)

#### 2.2.3.1 Fluorochinolony

Jedná se o širokospektré antibakteriální látky, které jsou účinné proti aerobním grampozitivním i gramnegativním organismům. Jsou široce používány při léčbě infekcí dýchacích cest a močových cest. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA topoisomeráz typu II. (32)

Základem chemické struktury jsou dva kondenzované aromatické kruhy, většinou jsou přípravky odvozeny od 4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylové kyseliny. Umístěním různých substituentů na tento skelet se mění antibakteriální účinnost, farmakokinetické vlastnosti i výskyt nežádoucích účinků. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří gastrointestinální poruchy, bolesti hlavy, kožní vyrážka a alergické reakce. Mezi používaná fluorochinolonová ATB patří ciprofloxacin (Obr. 15), levofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, ofloxacin, moxifloxacin a další. (5,32)

**Obrázek 15 – Ciprofloxacin**



### 2.2.3.2 Rifamyciny

Rifamycinová ATB inhibují RNA polymerázu u většiny bakteriálních rodů. Váží se specificky na beta podjednotku RNA polymeráz, přičemž proti lidským RNA polymerázám vykazují malou nebo žádnou aktivitu. Jsou tedy širokospektrá a baktericidní antibiotika. První rifamyciny byly izolovány z půdní bakterie *Ammycolatopsis mediterranei*. Problémem těchto ATB je vznik rezistence u všech rifamycinů, kvůli mutacím, které modifikují RNA polymerázu. ATB se používají ve speciálních indikacích, zejména pro léčbu tuberkulózy a dalších mykobakteriálních infekcí. Schválenými rifamycinovými ATB pro klinické použití jsou: rifampicin, rifabutin, rifapentin a rifaximin. Vykazují podobná spektra účinnosti, ale podstatně se liší ve farmakokinetických vlastnostech. V jejich spektru účinku jsou grampozitivní bakterie, mykobakterie a některé gramnegativní patogeny. (33)

### 2.2.4 Antibiotika působící na ribozomy

Ribozomy jsou v prokaryotní a eukaryotní buňce rozdílné. Proto mohou ATB selektivně působit na bakterie inhibicí jejich ribozomů. Bakteriální ribozomy se skládají ze dvou podjednotek stejně jako u eukaryot, ale jsou menší. Jsou tvořeny podjednotkami 30S a 50S. Na menší podjednotce je čtena informace z vlákna messengerové RNA (mRNA).

Ribozom se posouvá po mRNA a ke každému kodonu připojuje odpovídající transferovou RNA (tRNA). Větší podjednotka spojuje AMK nesené tRNA do jednoho peptidového řetězce. (5)

#### **2.2.4.1 Makrolidy, azalidy**

Makrolidová a azalidová ATB jsou bakteriostatická a inhibují bakteriální proteosyntézu. První makrolid užitý k antimikrobiální terapii byl erythromycin. Byl izolován z půdní bakterie *Streptomyces erythreus*. Makrolidy jsou složené z makrocyclického laktonu s připojenými deoxycukry. Některé mají i antifungální vlastnosti. Působí proti většině grampozitivním bakteriím, včetně anaerobních druhů. U gramnegativních bakterií jsou citlivé hlavně kultivačně náročné druhy, jako jsou bordetely, legionely, kampylobaktery a helikobaktery. Působí též na mykoplasmata, chlamydie, spirochety a některé (zejména atypické) mykobakterie. Přirozeně rezistentní jsou enterobakterie. Makrolidy jsou netoxická ATB a mají nízký alergizační potenciál. Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení či bolesti břicha. Dalším nežádoucím účinkem může být ovlivňování srdečního převodního systému v repolarizační fázi. Mezi zástupce makrolidů patří klaritromycin, roxitromycin a spiramycin. Azalidy jsou podskupinou makrolidových ATB. Jediným klinicky používaným zástupcem je azitromycin, který je odvozen od erytromycinu. (5,34)

#### **2.2.4.2 Kyselina fusidová**

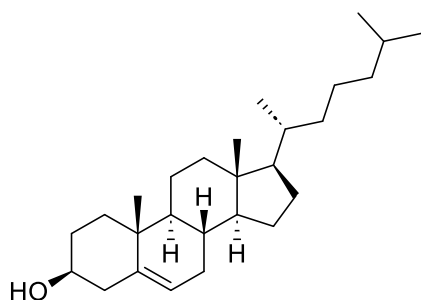
Kyselina fusidová (Obr. 16) je bakteriostatická látka s úzkým spektrem účinku. Inhibuje proteosyntézu pomocí inhibice ribozomálního elongačního faktoru. Kyselina fusidová působí především na stafylokoky, včetně kmenů rezistentních na jiné třídy ATB. Dále je aktivní proti grampozitivním anaerobním bakteriím. Proti gramnegativním druhům je aktivita velice omezená. (35)

Toto ATB je produktem houby *Fusidium coccineum*, která byla původně izolována z opičího trusu. V roce 1962 byla uvedena na trh, ale následně zájem o tuto látku upadl. Zájem znovu vzrostl po roce 2000 v souvislosti s narůstajícím výskytem rezistentních stafylokoků. Zlepšila se i biologická dostupnost s výhodnější lékovou formou. Kyselina fusidová je v dnešní době jediným představitelem steroidních ATB. Doposud se nepodařilo vyvinout ATB s podobnou chemickou strukturou, které by mělo vyšší





**Obrázek 17 – Cholesterol**



### 2.3.1 Steroidní hydrazonové deriváty

Hydrazony jsou syntetizovány kondenzací aldehydu či ketonu s hydrazinem. Mohou být také syntetizovány kopulační reakcí aryldiazoniových solí se sloučeninami aktivního vodíku. Hydrazony jsou známy svou širokou škálou biologických aktivit včetně antibakteriálních, antifungálních, protizánětlivých, antimalarických či antituberkulotických účinků. Kromě těchto aktivit se používají i jako meziprodukty při syntéze dalších látek. To se týká i steroidních hydrazonů. (38)

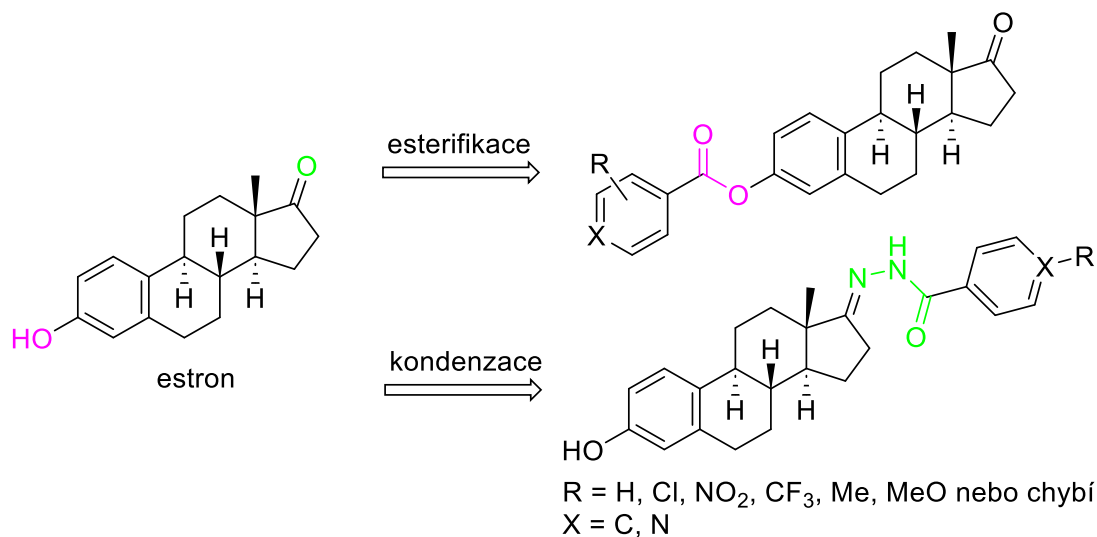
### 3. CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce je shrnout současnou problematiku antibiotické rezistence, popsat její mechanismy, způsoby šíření, rezistentní kmeny a možnosti léčby dostupnými antibiotiky.

V praktické části práce je cílem syntéza patnácti nových sloučenin vycházejících ze steroidní sloučeniny estronu. Estron bude vzhledem k přítomnosti dvou funkčních skupin (ketonická, fenolická) dvěma různými chemickými reakcemi modifikován za vzniku esterů a hydrazonů (Obr. 18). U jednotlivých sloučenin bude ověřena jejich čistota a budou otestovány na antimikrobiální, antifungální a antimykobakteriální aktivitu, dále pak na inhibici vybraných enzymů.

Přínosem této práce je vznik nových steroidních sloučenin, který by mohl vést k nalezení nových účinných antimikrobiálních či jinak biologicky aktivních sloučenin, které by mohly být přínosné v léčbě infekčních onemocnění vyvolaných rezistentními organismy, případně jiných onemocnění.

**Obrázek 18 – Schéma designu cílových molekul**



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemie

#### 4.1.1 Obecné metody

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

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC; thin layer chromatography). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byly používány soustavy hexan/ethyl-acetát v poměru 4:1 (v/v) a dichlormethan/methanol v poměru 93:7 (v/v), detekce byla prováděna UV lampou (UV Lamp 4, Camag, Muttenz, Švýcarsko) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

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

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

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 126 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro  $^1\text{H}$  a 151 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ ) a chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ). Hodnoty chemického posunu  $\delta$  (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy nepřímo k tetramethylsilanu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (DMSO- $d_6$  při  $\delta = 39,5$  ppm,  $\text{CDCl}_3$  77,0 ppm). Interakční konstanta

(J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Vypočtené i změřené hodnoty jsou udány v procentech.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

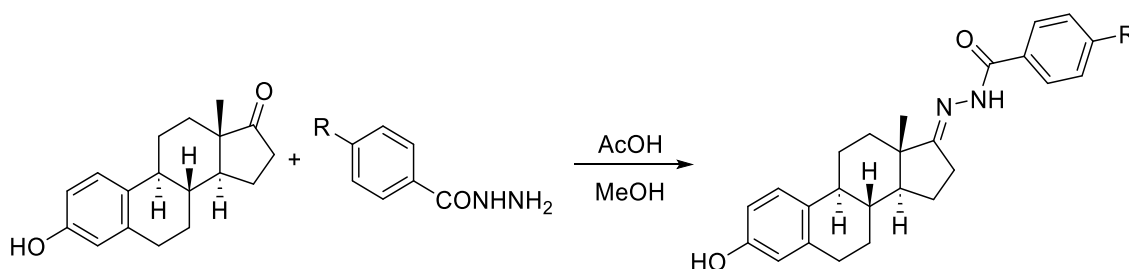
## 4.1.2 Příprava cílových steroidních sloučenin

### 4.1.2.1 Obecný postup přípravy

#### 4.1.2.1.1 Příprava hydrazonů

0,001 mol estronu (270,37 mg) bylo rozpuštěno v 8 ml methanolu a za stálého míchání byl přidán v jednom podílu 1 ekvivalent hydrazidu (0,001 mol) a 2 kapky ledové kyseliny octové. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout za míchání stáním volně na vzduchu a následně ponechána 12 hod míchat při laboratorní teplotě. Poté byla krystalizována při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Získaný precipitát byl promyt diethyletherem a krystaly byly vysušeny. Připravená sloučenina byla charakterizována pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot  $R_f$  (Obr. 19).

#### Obrázek 19 – Obecné schéma přípravy hydrazonů

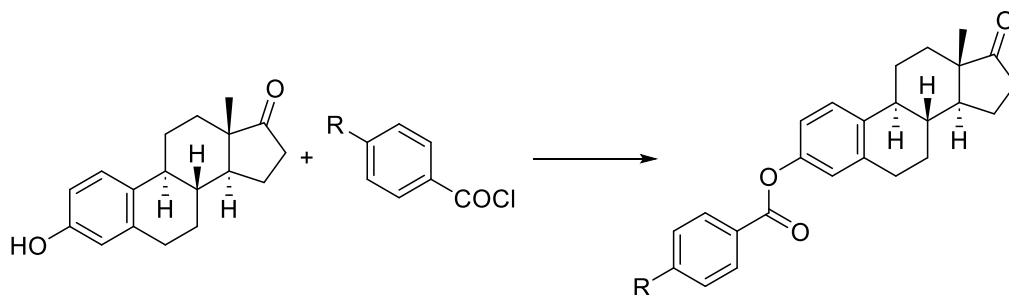


Tímto způsobem byly syntetizovány deriváty PaP-1, 3, 5, 7 a 9. V případě syntézy PaP-11 jsme vycházeli opět z estronu, avšak místo derivátu kyseliny benzoové byl k estronu přidán derivát pyridinu.

#### 4.1.2.1.2 Příprava esterů

1 mmol estronu (270,37 mg) a 1,5 mmol triethylaminu ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) (151,79 mg; 209,08  $\mu\text{l}$ ) byly rozpuštěny v 8 ml dichlormethanu. Reakční směs se míchala 5 min za laboratorní teploty a poté bylo přidáno 1,3 ekvivalentu chloridu kyseliny (1,3 mmol). Reakce se ponechala míchat 2 hod do kompletní konverze na produkt (monitorováno pomocí TLC; soustava *n*-hexan/ethyl-acetát 4:1). Následně byla reakční směs odpařena do sucha, přidán ethyl-acetát, nerozpustný podíl byl odfiltrován, filtrát vytřepán s 10% roztokem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1M HCl, 5% roztokem NaCl a vysušen stáním nad bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , který byl následně odfiltrován. Produkt byl ponechán dostatečný čas krystalizovat. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot  $R_f$  (Obr. 20).

#### Obrázek 20 – Obecné schéma přípravy esterů



Tímto způsobem byly připraveny deriváty PaP-2, 4, 6 a 10.

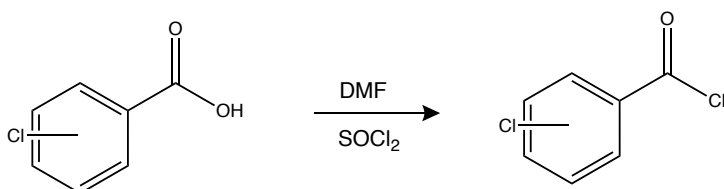
Pro sloučeninu PaP-12 byl zvolen jiný postup přípravy. Syntéza probíhala Steglichovu esterifikací. 1,1 mmol isonikotinové kyseliny (135,42 mg), 1 mmol estronu (270,37 mg) a 0,1 mmol 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP; 12,22 mg) byly rozpuštěny v 35 ml dichlormethanu, směs byla chlazena ledem na 0 °C, a pak bylo najednou přidáno 1,3 mmol hydrochloridu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDAC) (249,21 mg). Po 4 hodinách bylo chlazení přerušeno a směs byla ponechána reagovat dalších 12 hod za laboratorní teploty. Monitorování reakce probíhalo za pomoci TLC, soustava *n*-hexan/ethyl-acetát 4:1. Reakční směs byla odpařena do sucha, byl přidán ethyl-acetát s následným vytřepáním 10% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 M HCl, 5% roztoku NaCl

a vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Připravená sloučenina byla charakterizována pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R<sub>f</sub>.

#### 4.1.2.2 Příprava výchozích chloridů kyseliny

Při přípravě výchozích chloridů kyselin jsme pracovali v bezvodém prostředí a před samotnou syntézou jsme baňku a magnetické míchadlo dokonale vysušili. 1,5 mmol chlorbenzoové kyseliny (234,86 mg) bylo rozpuštěno v 10 ml thionylchloridu a byly přidány 2 kapky *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Reakce se ponechala míchat 2 hod při 60 °C do kompletní konverze na produkt. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce a použita bez dalšího čištění do reakce (Obr. 21).

**Obrázek 21 – Obecné schéma přípravy výchozího chloridu**

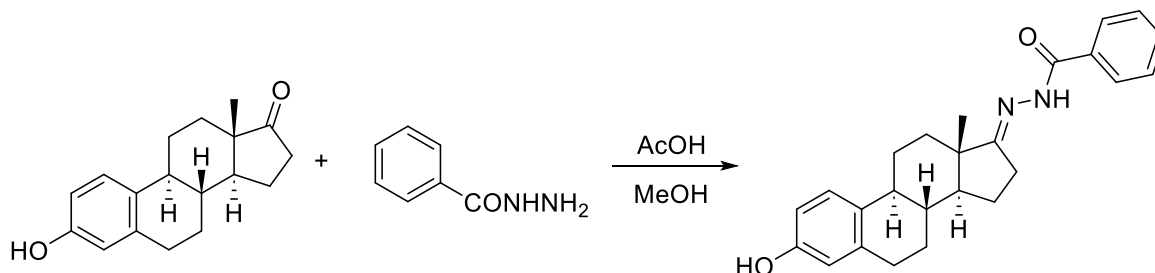


Tímto způsobem bylo potřeba nasyntetizovat výchozí chloridy pro sloučeniny PaP-8, 13, 14 a 15. V případě PaP-15 byl však výchozí látkou PaP-5 místo estronu.

### 4.1.3 Syntézy a charakterizace jednotlivých sloučenin

*N'*-((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-3-Hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-17-yliden)benzohydrazid [PaP-1]

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**

C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Popis krystalů:**

bílé

**Výtěžek:**

0,2660 g (68 %)

**Teplota tání:**

198,0 °C

**TLC:**

DCM/MeOH 93/7

R<sub>f</sub> = 0,64

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 10.18 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.77 – 2.60 (m, 2H), 2.44 – 2.27 (m, 1H), 2.13 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 1.97 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 1.88 – 1.80 (m, 2H), 1.56 – 1.30 (m, 5H), 0.87 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 174.97, 163.86, 155.53, 137.62, 134.86, 131.73, 130.66, 128.80, 128.17, 126.57, 115.50, 113.33, 52.37, 45.39, 44.12, 38.53, 34.62, 29.63, 27.41, 27.30, 26.50, 23.21, 17.45.

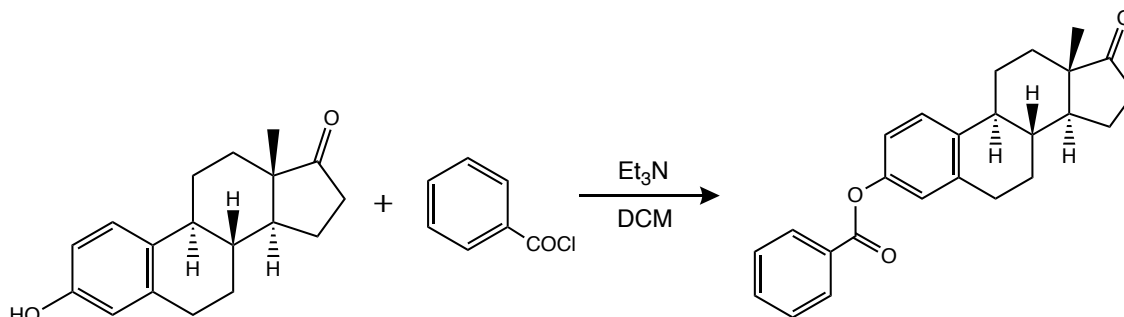
**Elementární analýza:** teorie: C 77.29, H 7.26, N 7.21; nalezeno: C 77.33, H 7.21, N 7.26.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1663, 1647, 1611, 1580, 1525, 1508, 1487, 1445, 1373, 1357, 1287, 1277, 1267, 1229, 1218, 1188, 1159, 1137, 1123, 1103, 1082, 1050, 1033, 1002, 973, 935, 919, 898, 879, 866, 852, 843, 822, 798, 786, 771, 753, 731, 718, 701, 693, 682, 677, 658, 652, 646, 636, 632, 625.



**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-benzoát [PaP-2]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**

C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>

**Popis krystalů:**

bílé

**Výtěžek:**

0,1005 g (27 %)

**Teplota tání:**

222,5 °C (lit. 220-223 °C (39))

**TLC:**

*n*-hexan/EtOAc 4/1

R<sub>f</sub> = 0,41

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ 8.23 – 8.19 (m, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.98 – 2.93 (m, 2H), 2.53 (dd, *J* = 19.1, 8.7 Hz, 1H), 2.45 (dd, *J* = 12.7, 3.9 Hz, 1H), 2.34 (td, *J* = 10.9, 4.1 Hz, 1H), 2.23 – 1.95 (m, 4H), 1.74 – 1.44 (m, 6H), 0.94 (s, 3H).

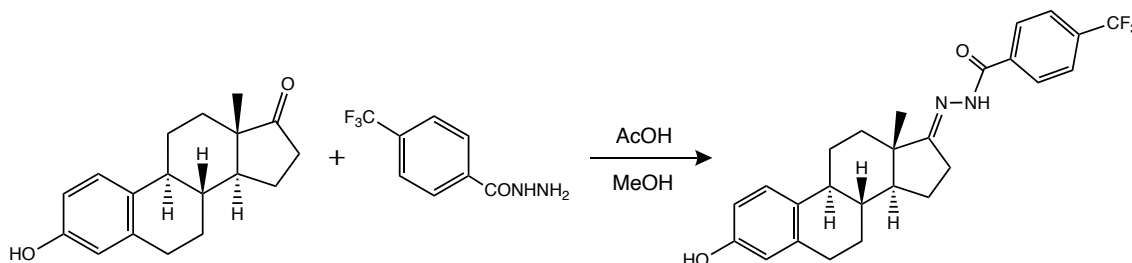
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 219.58, 165.21, 149.15, 138.49, 138.00, 134.31, 130.16, 129.88, 129.40, 126.72, 121.90, 119.30, 50.41, 47.81, 44.18, 38.24, 35.89, 32.00, 29.36, 26.34, 25.98, 21.68, 14.13.

**Elementární analýza:** teorie: C 80.18, H 7.00; nalezeno: C 80.07, H 6.68.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1732, 1697, 1682, 1670, 1647, 1622, 1602, 1584, 1542, 1507, 1494, 1451, 1434, 1417, 1405, 1372, 1339, 1314, 1266, 1220, 1209, 1176, 1150, 1103, 1080, 1063, 1025, 1008, 928, 913, 895, 819, 802, 783, 709, 685, 650, 644, 638, 629, 619, 611.

***N'*-((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-3-Hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-17-yliden)-4-(trifluormethyl)benzohydrazid [PaP-3]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{26}H_{27}F_3N_2O_2$

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,4346 g (95 %)

**Teplota tání:** 265,5 °C

**TLC:** DCM/MeOH 93/7  $R_f = 0,69$

**NMR:**

$^1H$  NMR (500 MHz, dmsó)  $\delta$  10.46 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.98 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.85 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J = 8.4, 2.7$  Hz, 1H), 6.45 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 2.78 – 2.62 (m, 3H), 2.47 – 2.30 (m, 1H), 2.16 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H), 2.05 – 1.82 (m, 3H), 1.57 – 1.25 (m, 6H), 0.91 (s, 3H).

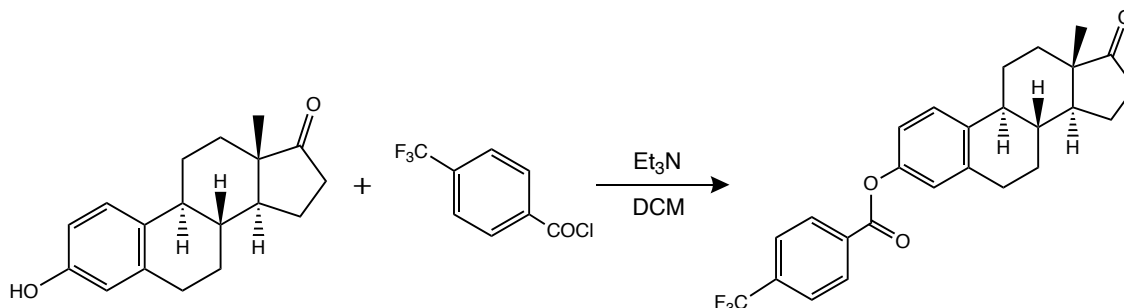
$^{13}C$  NMR (126 MHz, dmsó)  $\delta$  175.49, 162.60, 155.20, 138.44, 137.30, 131.28 (q,  $J = 31.9$  Hz), 130.64, 130.30, 128.83, 126.27, 125.45 (q,  $J = 4.0$  Hz), 124.17 (q,  $J = 272.8$  Hz), 115.16, 113.00, 52.00, 45.16, 43.77, 38.18, 34.25, 29.30, 27.27, 26.96, 26.16, 22.86, 17.10.

**Elementární analýza:** teorie: C 68.41, H 5.96, N 6.14; nalezeno: C 68.49, H 6.01, N 6.06.

**IR [ $cm^{-1}$ ]:** 1753, 1736, 1720, 1701, 1671, 1653, 1641, 1618, 1578, 1560, 1530, 1500, 1438, 1407, 1326, 1287, 1168, 1115, 1067, 1017, 914, 877, 860, 816, 788, 767, 704, 681, 675, 670, 660, 654, 643, 636, 628, 621, 610.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-(trifluormethyl)benzoát [PaP-4]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,2408 g (54 %)

**Teplota tání:** 207,8 °C

**TLC:** *n*-hexan/EtOAc 4/1  $R_f = 0,44$

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.87 – 2.83 (m, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H), 2.26 (td, *J* = 11.3, 3.8 Hz, 1H), 2.05 (dt, *J* = 18.3, 8.7 Hz, 1H), 1.99 – 1.92 (m, 2H), 1.78 (dt, *J* = 12.5, 3.1 Hz, 1H), 1.61 – 1.34 (m, 6H), 0.83 (s, 2H).

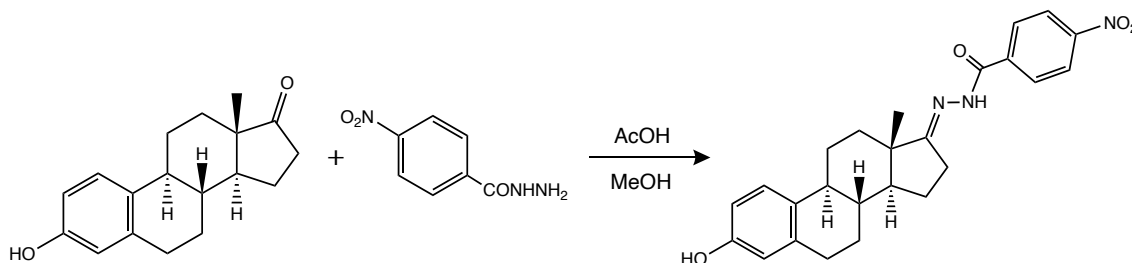
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 219.67, 164.17, 148.92, 138.59, 138.27, 133.95 (q, *J* = 31.9 Hz), 133.61, 131.08, 126.83, 126.40 (q, *J* = 3.8 Hz), 124.25 (q, *J* = 272.1 Hz), 121.83, 119.22, 50.34, 47.81, 44.17, 38.17, 35.90, 31.97, 29.37, 26.32, 25.96, 21.67, 14.10.

**Elementární analýza:** teorie: C 70.58, H 5.70; nalezeno: C 70.48, H 5.75.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1790, 1744, 1728, 1587, 1510, 1496, 1411, 1373, 1323, 1265, 1221, 1177, 1123, 1115, 1072, 1009, 915, 897, 859, 844, 819, 770, 748, 694, 680, 657, 649, 633, 627, 608.

***N'*-((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-3-Hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-17-yliden)-4-nitrobenzohydrazid [PaP-5]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{25}H_{27}N_3O_4$

**Popis krystalů:** žluté

**Výtěžek:** 0,2751 g (63 %)

**Teplota tání:** 261,5 °C

**TLC:** DCM/MeOH 93/7  $R_f = 0,82$

**NMR:**

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  10.53 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.28 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.99 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.41 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 2.76 – 2.58 (m, 3H), 2.44 – 2.27 (m, 2H), 2.17 – 2.09 (m, 1H), 2.04 – 1.94 (m, 1H), 1.91 – 1.79 (m, 2H), 1.57 – 1.23 (m, 4H), 0.88 (s, 3H).

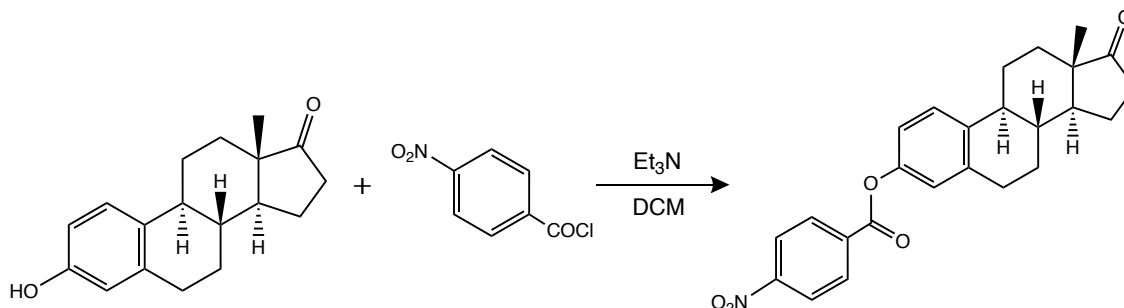
$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  176.34, 162.39, 155.53, 149.49, 140.67, 137.61, 130.62, 129.75, 126.58, 123.94, 115.50, 113.33, 52.33, 45.54, 44.09, 38.52, 34.56, 29.62, 27.69, 27.29, 26.48, 23.17, 17.43.

**Elementární analýza:** teorie: C 69.27, H 6.28, N 9.69; nalezeno: C 69.29, H 6.34, N 9.75.

**IR [cm $^{-1}$ ]:** 1730, 1676, 1634, 1604, 1584, 1524, 1516, 1499, 1488, 1467, 1454, 1429, 1374, 1347, 1323, 1299, 1288, 1253, 1189, 1168, 1155, 1138, 1125, 1113, 1086, 1053, 1031, 1013, 981, 936, 918, 901, 868, 853, 839, 814, 786, 741, 731, 718, 701, 677, 664, 647, 629, 611, 605.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-nitrobenzoát [PaP-6]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:** C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,0608 g (15 %)

**Teplota tání:** 229,7 °C (lit. 231-234 °C (40))

**TLC:** *n*-hexan/EtOAc 4/1  $R_f = 0,33$

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.87 – 2.82 (m, 2H), 2.39 (ddd, *J* = 21.7, 17.8, 6.1 Hz, 1H), 2.44 – 2.34 (m, 1H), 2.04 (dt, *J* = 18.4, 8.8 Hz, 1H), 1.97 – 1.89 (m, 2H), 1.75 (dd, *J* = 11.9, 4.0 Hz, 1H), 1.60 – 1.32 (m, 5H), 0.82 (s, 3H).

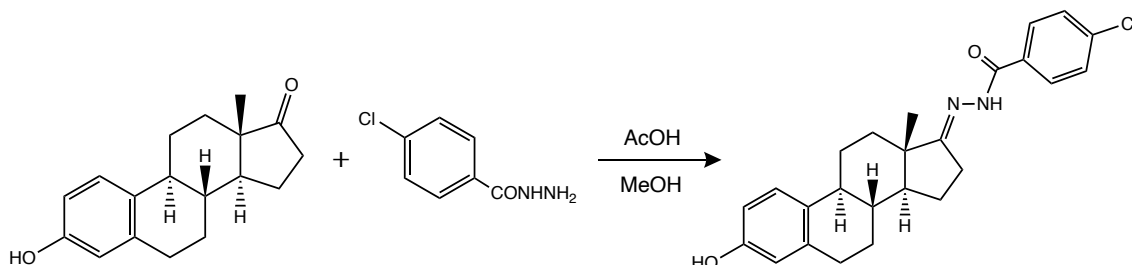
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 220.09, 163.84, 151.08, 148.75, 138.56, 138.25, 135.10, 131.75, 127.01, 124.53, 121.95, 119.33, 50.13, 47.82, 44.15, 38.01, 35.90, 31.87, 29.43, 26.33, 25.89, 21.69, 14.04.

**Elementární analýza:** teorie: C 71.58, H 6.01, N 3.34; nalezeno: C 71.49, H 6.03, N 3.29.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1791, 1738, 1697, 1681, 1657, 1647, 1621, 1606, 1519, 1495, 1472, 1454, 1433, 1410, 1376, 1348, 1323, 1268, 1221, 1208, 1184, 1149, 1104, 1075, 1014, 985, 905, 870, 856, 846, 819, 782, 743, 713, 670, 657, 650, 635, 622.

**4-Chlor-*N'*-((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-17-yliden)benzohydrazid [PaP-7]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{25}H_{27}ClN_2O_2$

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,2618 g (62 %)

**Teplota tání:** 253,8 °C

**TLC:** DCM/MeOH 93/7  $R_f = 0,58$

**NMR:**

$^1H$  NMR (500 MHz, dmsO)  $\delta$  10.30 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.51 (dd,  $J = 8.4, 2.6$  Hz, 1H), 6.44 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 2.80 – 2.60 (m, 3H), 2.47 – 2.30 (m, 1H), 2.16 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 1.99 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 1.94 – 1.81 (m, 3H), 1.59 – 1.27 (m, 4H), 0.90 (s, 3H).

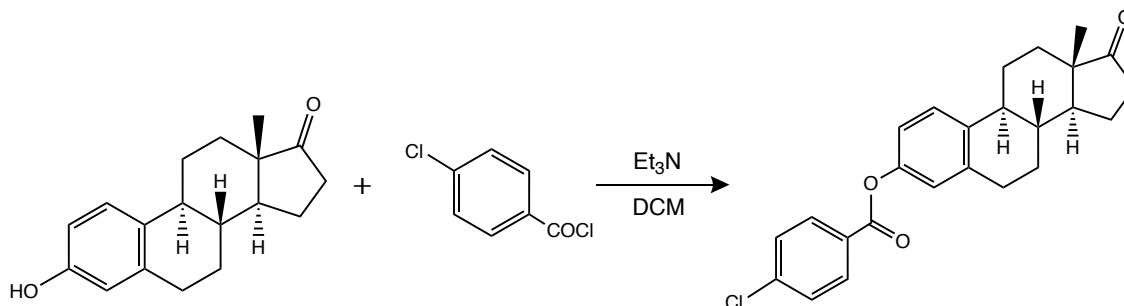
$^{13}C$  NMR (126 MHz, dmsO)  $\delta$  175.08, 162.54, 155.18, 137.29, 136.20, 133.21, 130.30, 129.82, 128.52, 126.25, 115.15, 112.99, 52.00, 45.11, 43.76, 38.17, 34.25, 29.29, 27.18, 26.95, 26.15, 22.85, 17.09.

**Elementární analýza:** teorie: C 70.99, H 6.43 N 6.62; nalezeno: C 71.02, H 6.40, N 6.64.

**IR [ $cm^{-1}$ ]:** 1716, 1697, 1688, 1660, 1645, 1622, 1590, 1569, 1558, 1541, 1517, 1501, 1484, 1455, 1429, 1417, 1395, 1386, 1374, 1363, 1339, 1320, 1288, 1269, 1254, 1192, 1179, 1158, 1136, 1124, 1105, 1088, 1053, 1037, 1014, 945, 935, 917, 901, 867, 839, 820, 790, 757, 746, 732, 698, 684, 675, 665, 651, 638, 634, 628, 620, 605.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-chlorbenzoát [PaP-8]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**

C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClO<sub>3</sub>

**Popis krystalů:**

bílé

**Výtěžek:**

0,1435 g (35 %)

**Teplota tání:**

214,5 °C (lit. 215-217 °C (40))

**TLC:**

*n*-hexan/EtOAc 4/1

R<sub>f</sub> = 0,44

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 8.13 – 8.10 (m, 2H), 7.48 – 7.43 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.96 – 2.90 (m, 2H), 2.54 – 2.49 (m, 1H), 2.42 (dq, *J* = 12.2, 3.4 Hz, 1H), 2.37 (dt, *J* = 14.2, 3.7 Hz, 1H), 2.31 (td, *J* = 11.1, 4.3 Hz, 1H), 2.13 (dt, *J* = 18.8, 9.4 Hz, 1H), 2.07 – 1.92 (m, 2H), 1.66 – 1.42 (m, 6H), 0.92 (s, 3H).

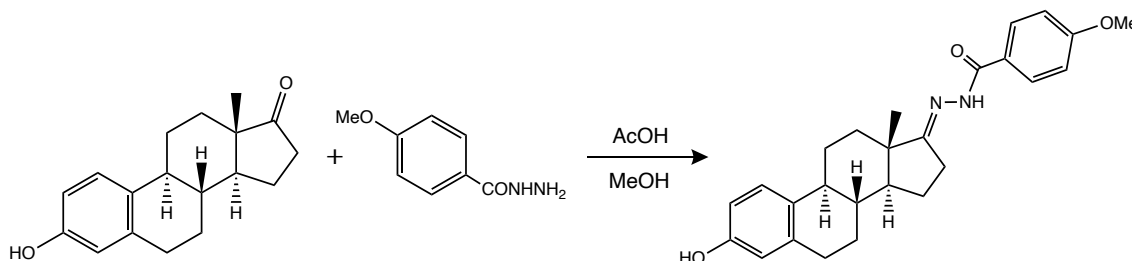
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 220.98, 164.71, 153.71, 148.75, 140.16, 131.61, 129.01, 126.60, 121.68, 118.84, 115.38, 112.93, 50.54, 48.06, 44.27, 38.11, 35.96, 31.65, 29.51, 26.43, 25.86, 21.68, 13.93.

**Elementární analýza:** teorie: C 73.43, H 6.16; nalezeno: C 73.49, H 6.07.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1730, 1697, 1594, 1493, 1473, 1454, 1433, 1400, 1373, 1338, 1276, 1264, 1222, 1211, 1172, 1151, 1135, 1090, 1076, 1012, 983, 964, 930, 912, 898, 850, 820, 789, 758, 749, 714, 683, 630.

***N'*-((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-3-Hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-dekahydro-17*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-17-yliden)-4-methoxybenzohydrazid [PaP-9]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{26}H_{30}N_2O_3$

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,3214 g (77 %)

**Teplota tání:** 268,1 °C

**TLC:** DCM/MeOH 93/7  $R_f = 0,51$

**NMR:**

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  10.02 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 7.77 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.48 (dd,  $J = 8.4, 2.6$  Hz, 1H), 6.41 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.77 – 2.58 (m, 3H), 2.44 – 2.35 (m, 1H), 2.30 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 2.14 (td,  $J = 11.1, 4.1$  Hz, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.89 – 1.79 (m, 2H), 1.55 – 1.24 (m, 6H), 0.86 (s, 3H).

$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  174.37, 163.24, 162.17, 155.53, 137.62, 130.68, 130.01, 126.84, 126.57, 115.50, 114.03, 113.33, 55.91, 52.39, 45.33, 44.13, 38.53, 34.62, 29.63, 27.30, 27.18, 26.50, 23.23, 17.46.

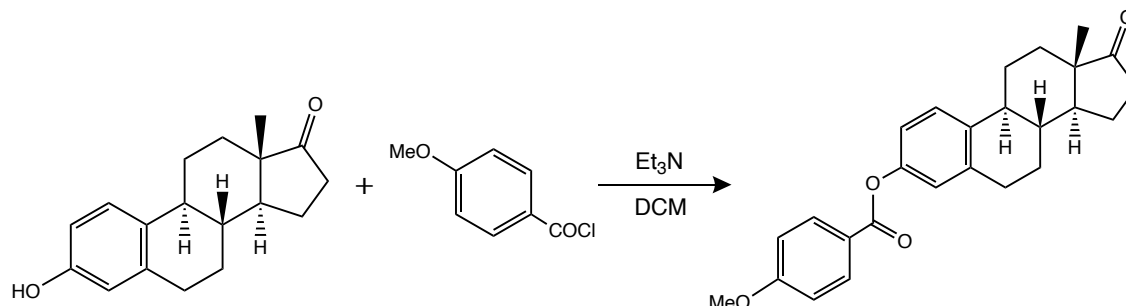
**Elementární analýza:** teorie: C 74.61, H 7.23, N 6.69; nalezeno: C 74.61, H 7.20, N 6.72.

**IR [cm $^{-1}$ ]:** 1748, 1716, 1657, 1638, 1607, 1587, 1575, 1527, 1499, 1471, 1441, 1417, 1364, 1281, 1252, 1180, 1158, 1137, 1113, 1079, 1050, 1028, 947, 936, 918, 902, 867, 839, 823, 790, 765, 706, 669, 663, 655, 636, 628, 614.



**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-methoxybenzoát [PaP-10]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,0752 g (19 %)

**Teplota tání:** 242,5 °C (lit. 229-231 °C (40))

**TLC:** *n*-hexan/EtOAc 4/1 R<sub>f</sub> = 0,32

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.04 – 8.00 (m, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.94 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 2.86 – 2.81 (m, 2H), 2.43 – 2.42 (m, 2H), 2.37 (dt, *J* = 14.2, 3.7 Hz, 1H), 2.28 – 2.17 (m, 1H), 2.12 – 2.07 (m, 1H), 2.07 – 1.92 (m, 2H), 1.50 – 1.30 (m, 6H), 0.81 (s, 3H).

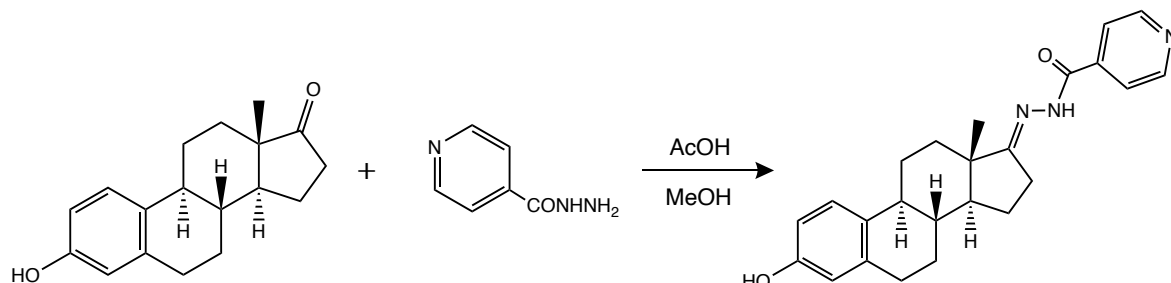
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 220.22, 164.20, 155.56, 137.64, 132.45, 130.44, 126.60, 122.20, 119.57, 115.50, 114.79, 113.33, 56.17, 50.12, 47.82, 43.98, 38.50, 35.91, 31.90, 29.59, 26.67, 26.09, 21.68, 14.06.

**Elementární analýza:** teorie: C 77.20, H 6.98; nalezeno: C 77.18, H 6.95.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1735, 1718, 1621, 1606, 1584, 1513, 1498, 1465, 1436, 1424, 1396, 1377, 1360, 1320, 1286, 1261, 1250, 1209, 1184, 1170, 1155, 1138, 1102, 1077, 1055, 1018, 1008, 946, 933, 920, 899, 877, 851, 819, 788, 767, 733, 710, 692, 681, 671, 650, 642, 634, 627, 615, 605.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-methoxybenzoát [PaP-11]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{24}H_{27}N_3O_2$

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,3187 g (82 %)

**Teplota tání:** 278,0 °C (lit. 267-269 °C (41))

**TLC:** DCM/MeOH 93/7  $R_f = 0,33$

**NMR:**

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  10.47 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.70 – 8.67 (m, 2H), 7.69 – 7.65 (m, 2H), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J = 8.4, 2.7$  Hz, 1H), 6.41 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 2.78 – 2.58 (m, 4H), 2.41 (dt,  $J = 18.2, 8.7$  Hz, 1H), 2.35 – 2.27 (m, 1H), 2.14 (td,  $J = 11.2, 4.1$  Hz, 1H), 1.97 (dt,  $J = 12.7, 3.3$  Hz, 1H), 1.85 (dtd,  $J = 15.9, 8.0, 4.5$  Hz, 1H), 1.56 – 1.24 (m, 6H), 0.87 (s, 3H).

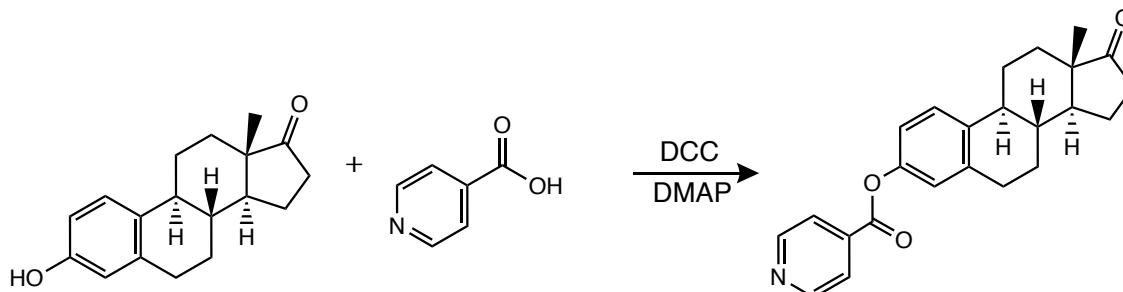
$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  176.49, 162.35, 155.53, 150.59, 141.91, 137.61, 130.62, 126.58, 122.27, 115.49, 113.33, 52.32, 45.54, 44.08, 38.52, 34.55, 29.62, 27.67, 27.28, 26.48, 23.16, 17.42.

**Elementární analýza:** teorie: C 74.01, H 6.99, N 10.79; nalezeno: C 74.05, H 7.10, N 10.78.

**IR [cm $^{-1}$ ]:** 1670, 1644, 1605, 1582, 1555, 1526, 1495, 1470, 1435, 1412, 1372, 1361, 1283, 1249, 1228, 1186, 1169, 1154, 1141, 1101, 1061, 1031, 1008, 936, 922, 899, 872, 849, 814, 786, 754, 713, 680, 665, 646, 634, 621.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-isonikotinát [PaP-12]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**  $C_{24}H_{25}NO_3$

**Popis krystalů:** bílé

**Výtěžek:** 0,0997 g (27 %)

**Teplota tání:** >400 °C

**TLC:** *n*-hexan/EtOAc 4/1  $R_f = 0,08$

**NMR:**

$^1H$  NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  8.98 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 8.13 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 8.5, 2.6$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 2.97 – 2.91 (m, 2H), 2.51 (dd,  $J = 19.2, 8.9$  Hz, 1H), 2.44 – 2.39 (m, 1H), 2.32 (t,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.20 – 1.95 (m, 3H), 1.68 – 1.42 (m, 7H), 0.92 (s, 3H).

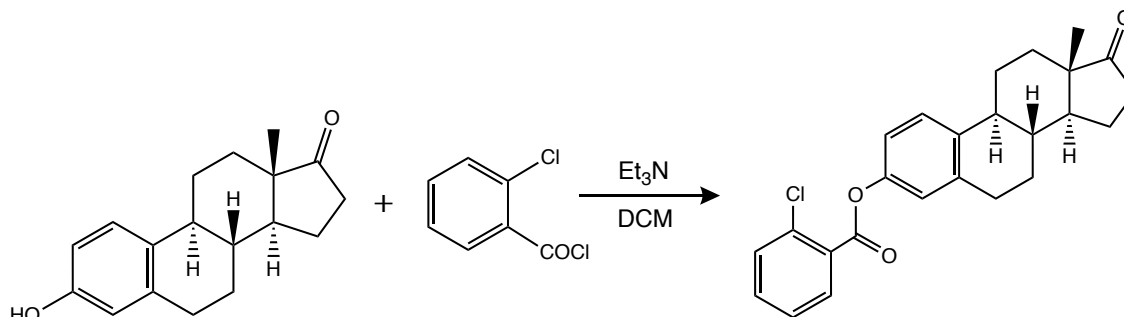
$^{13}C$  NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  220.72, 163.13, 150.36, 148.27, 139.07, 138.57, 138.40, 126.81, 124.51, 121.31, 118.45, 50.51, 48.02, 44.26, 38.05, 35.93, 31.62, 29.54, 26.38, 25.86, 21.69, 13.93.

**Elementární analýza:** teorie: C 76.77, H 6.71, N 3.73; nalezeno: C 76.69, H 6.63, N 3.77.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1739, 1697, 1606, 1563, 1493, 1453, 1407, 1379, 1325, 1279, 1271, 1262, 1242, 1220, 1209, 1183, 1154, 1091, 1062, 1008, 942, 930, 912, 893, 850, 823, 785, 755, 745, 705, 683, 664, 644, 638, 630, 620, 612.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-2-chlorbenzoát [PaP-13]**

Reakční schéma:



**Sumární vzorec:**

C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>ClO<sub>3</sub>

**Popis krystalů:**

bílé až lehce nažloutlé

**Výtěžek:**

0,0766 g (19 %)

**Teplota tání:**

209,8 °C (lit. 214-216 °C (40))

**TLC:**

*n*-hexan/EtOAc 4/1

R<sub>f</sub> = 0,42

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.62 – 7.59 (m, 2H), 7.50 (ddd, *J* = 8.2, 5.7, 2.9 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.90 – 2.86 (m, 2H), 2.46 – 7.45 (m, 2H), 2.27 (td, *J* = 11.1, 4.1 Hz, 1H), 2.08 – 2.00 (m, 1H), 1.98–1.92 (m, 2H), 1.78 (dt, *J* = 12.7, 3.0 Hz, 1H), 1.62 – 1.34 (m, 6H), 0.84 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 219.57, 164.30, 148.85, 138.66, 138.33, 134.11, 132.78, 131.87, 131.42, 130.20, 127.99, 126.84, 121.74, 119.15, 50.40, 47.81, 44.18, 38.21, 35.90, 31.99, 29.36, 26.32, 25.98, 21.68, 14.12.

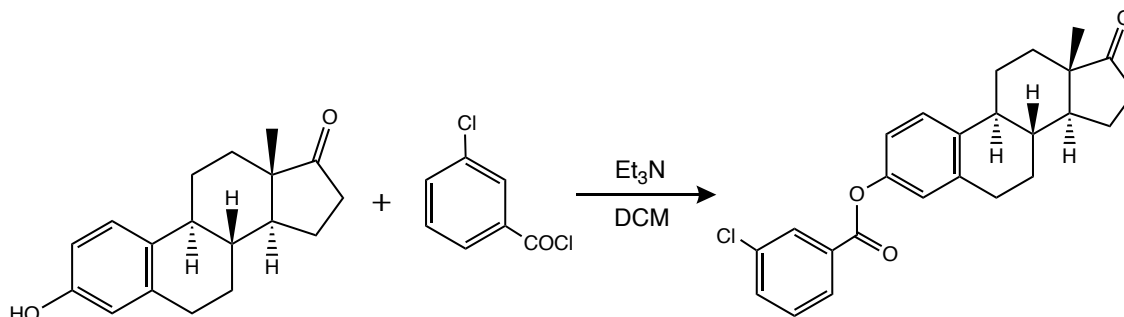
**Elementární analýza:** teorie: C 73.43, H 6.16; nalezeno: C 73.41, H 6.19.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1736, 1697, 1681, 1699, 1607, 1590, 1508, 1493, 1472, 1452, 1436, 1406, 1374, 1338, 1294, 1271, 1249, 1218, 1207, 1183, 1162, 1152, 1104, 1094, 1082, 1054,

1036, 1007, 966, 928, 915, 904, 892, 819, 788, 756, 716, 697, 674, 653, 646, 640, 626,  
604.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*)-13-Methyl-17-oxo-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-  
cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-3-chlorbenzoát [PaP-14]**

Reakční schéma:



<b>Sumární vzorec:</b>	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>3</sub>
<b>Popis krystalů:</b>	bílé až lehce nažloutlé
<b>Výtěžek:</b>	0,0786 g (19 %)
<b>Teplota tání:</b>	204,6 °C (lit. 212-214 °C (40))
<b>TLC:</b>	<i>n</i> -hexan/EtOAc 4/1      R <sub>f</sub> = 0,52

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.76 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.90 – 2.82 (m, 2H), 2.45 – 2.35 (m, 2H), 2.30 – 2.23 (m, 1H), 2.05 (dt, *J* = 18.5, 8.7 Hz, 1H), 1.98 – 1.93 (m, 2H), 1.78 (dt, *J* = 12.6, 3.1 Hz, 1H), 1.60 – 1.36 (m, 6H), 0.84 (s, 3H).

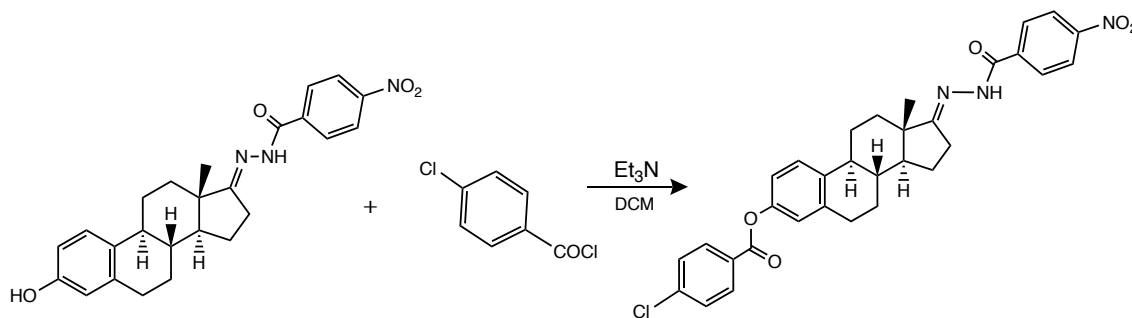
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 219.57, 164.04, 148.99, 138.55, 138.22, 134.28, 134.15, 131.94, 131.42, 129.70, 128.81, 126.76, 121.81, 119.20, 50.40, 47.81, 44.18, 38.22, 35.89, 31.99, 29.36, 26.32, 25.97, 21.68, 14.12.

**Elementární analýza:** teorie: C 73.43, H 6.16; nalezeno: C 73.37, H 6.13.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1737, 1697, 1603, 1574, 1494, 1470, 1455, 1425, 1372, 1339, 1282, 1250, 1222, 1213, 1185, 1154, 1107, 1080, 1052, 1008, 981, 966, 943, 930, 909, 901, 870, 842, 823, 807, 783, 767, 743, 725, 703, 673, 653, 644, 636, 626, 604.

**(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,*E*)-13-Methyl-17-[2-(4-nitrobenzoyl)hydrazinyliden]-  
7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-cyklopenta[*a*]fenanthren-3-yl-4-  
chlorbenzoát [PaP-15]**

Reakční schéma:



<b>Sumární vzorec:</b>	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
<b>Popis krystalů:</b>	světle žluté
<b>Výtěžek:</b>	0,0445 g (8 %)
<b>Teplota tání:</b>	195,0 °C
<b>TLC:</b>	DCM/MeOH 93/7 <span style="float: right;">R<sub>f</sub> = 1</span>
<b>NMR:</b>	

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, dmsO) δ 10.58 (s, 1H), 8.31 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 2H), 8.10 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 2H), 8.05 – 8.01 (m, 2H), 7.70 – 7.60 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.90 – 2.83 (m, 2H), 2.69 (dd, *J* = 18.9, 9.0 Hz, 1H), 2.49 – 2.41 (m, 1H), 2.31 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 2.05 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 1.94 – 1.87 (m, 2H), 1.65 – 1.30 (m, 6H), 0.94 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, dmsO) δ 176.12, 164.38, 162.33, 149.41, 148.75, 140.59, 139.37, 138.35, 138.10, 132.03, 129.69, 129.61, 128.40, 126.84, 123.87, 121.96, 119.34, 52.24, 45.41, 44.16, 37.96, 34.46, 29.37, 27.62, 26.86, 26.20, 23.11, 17.31.

**Elementární analýza:** teorie: C 67.19, H 5.29, N 7.35; nalezeno: C 67.23, H 5.21, N 7.26.

**IR [cm<sup>-1</sup>]:** 1730, 1645, 1597, 1566, 1524, 1493, 1456, 1425, 1407, 1346, 1318, 1262, 1254, 1217, 1182, 1171, 1154, 1141, 1092, 1077, 1050, 1015, 982, 964, 942, 913, 896, 884, 871, 857, 843, 822, 797, 780, 755, 744, 727, 697, 684, 661, 636, 627, 620.

## 4.2 Biologie

### 4.2.1 Hodnocení antibakteriální aktivity

*In vitro* antibakteriální aktivita byla stanovována vůči dvěma grampozitivním kokům a dvěma gramnegativním tyčkovitým bakteriím. Jednalo se o kmeny *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, CCM (Czech Collection of Microorganisms) 4223, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, CCM 4224, *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955.

Pro testování antimikrobiální aktivity připravených sloučenin byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardu EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Každá jamka v mikrodiluční destičce obsahovala 200  $\mu$ l media a 10  $\mu$ l suspenze inokula. Kultivace byla provedena na Müller-Hintonově bujónu č. 2 (CAMHB). Velikost inokula byla 0,5 podle McFarlandovy stupnice ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml), pH bylo upraveno na hodnotu 7 ( $\pm 0,2$ ). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a následně v médiu tak, aby finální koncentrace byly v rozmezí 0,49-500  $\mu$ mol/l. Výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % a neovlivnila růst bakterií. Hodnoty MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 °C ( $\pm 2$ ).

MIC je definována jako minimálně 95% redukce růstu bakterií ve srovnání s kontrolou. Inhibice růstu byla stanovena vizuální metodou. Jako referenční léčivo pro srovnání byl zvolen jednak výchozí estron, jednak beta-laktamové antibiotikum piperacilin (PIP).

Antibakteriální aktivita byla stanovena paní Idou Dufkovou na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### 4.2.2 Hodnocení antifungální aktivity

*In vitro* antimykobakteriální aktivita byla stanovena vůči čtyřem patogenním houbám. Testovanými kmeny byly dvě kvasinky: *Candida albicans* (CA) ATCC 24433, CCM 8320, *Candida krusei* (CK) ATCC 6258, CCM 8271; a dva kmeny vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* (AF) ATCC 204305, *Absidia corymbifera* (AC) CCM 8077.

Ke stanovení antifungální aktivity byla opět použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách dle standardů EUCAST, každá jamka s obsahem 200  $\mu$ l média a 10  $\mu$ l



suspenze inokula. Jako médium byl použit RPMI-1640 s glutaminem a 2% glukózou a pH bylo upraveno na 7,0 za použití 3-(*N*-morfolino)propansulfonové kyseliny o 0,165M koncentraci. Výsledné inokulum mělo velikost  $0,5-2 \times 10^5$  CFU/ml. Teplota inkubace byla  $35 \pm 2$  °C a probíhala 24–48 h, staticky, ve tmě a při humidní atmosféře. S testovanými sloučeninami bylo naloženo podobně jako u antibakteriální aktivity. Jako standard bylo použito triazolové antimykotikum flukonazol (FLU). Inhibice růstu hub byla odečtena vizuálně.

Hodnoty MIC stanovila Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### 4.2.3 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Aktivita proti mykobakteriím byla stanovena proti pěti kmenům, konkrétně *Mycolicibacterium smegmatis* ATCC 607 (DSM 43465), *Mycolicibacterium aurum* ATCC 23366 (DSM 43999), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 9431 (ITM-M006710).

Ke stanovení aktivity byla použita opět mikrodiluční bojónová metoda na 96-jamkové mikrotitrační destičce. V každé jamce bylo kultivační médium, kterým byl Middlebrook agar 7H9 s 0,4 % glycerolu a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC. Suspenze inokula byla upravena na hodnotu 1,0 dle stupnice McFarlanda a zředěna bujónem 1:10 (pro *M. tuberculosis*) neb 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie). Jednotlivé sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a následně byl přidán Middlebrookův bujón tak, aby koncentrace testovaných sloučenin činila 2000 µg/ml. Finální koncentrace byly získány dvojkovým ředěním a odpovídaly 3,91-2000 µg/ml. Koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % a neovlivnila růst mykobakterií. Jako standard byli použity: isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CIP), které byly rozpuštěny v demineralizované vodě.

Podmínky inkubace byly definovány při 37 °C, statická inkubace ve tmě. Čas inkubace se pro jednotlivé kmeny lišil: *M. smegmatis* 48 hodin, *M. tuberculosis* 120 hodin, ostatní kmeny 72 hodin, po této době inkubace bylo do všech jamek destičky přidáno barvivo, připravené rozpuštěním sodné soli resazurinu v deionizované vodě (0,01 %) a 10 % vodného roztoku Tweenu 80. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 2,5-24 hod podle druhu patogenu. MIC byla po této době inkubace odečtena vizuálně na

základě změny barvy jamek. Růžově zbarvená jamka značí neaktivní sloučeninu, modré zbarvení znamená aktivní sloučeninu. Zahrnuty byly i pozitivní a negativní růstové kontroly. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech.

Antimykobakteriální aktivitu stanovil PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D., z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

#### **4.2.4 Hodnocení inhibice cholinesteráz**

Hodnocení inhibice acetylcholinesteráz (AChE) a butyrylcholinesteráz (BChE) bylo hodnoceno pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody. Hodnocení metody bylo provedeno podle dostupné studie. (42) Jako standard byl použit rivastigmin.

Hodnota  $IC_{50}$  byla stanovena Mgr. Šárkou Štěpánkovou, Ph.D., z Katedry biologických a biochemických věd fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Z výchozí látky estronu jsme nasyntetizovali 15 nových sloučenin. Sloučeniny byly připraveny několika způsoby. Primárně jsme vycházeli ze dvou hlavních postupů. V prvním případě jsme k estronu přidávali hydrazidy za katalýzy ledovou kyselinou octovou a v druhém případě jsme přidávali k estronu chlorid kyseliny v přítomnosti báze. Těmito základními jednokrokovými syntézami jsme připravili sloučeniny: PaP-1, PaP-2, PaP-3, PaP-4, PaP-5, PaP-6, PaP-7, PaP-9, PaP-10. PaP-11 byla syntetizována podobným způsobem, ale byl zde zaměněn benzohydrazid za isoniazid, tedy pyridinový derivát. U sloučenin PaP-8, PaP-13, PaP-14 a PaP-15 jsme museli před samotnou syntézou připravit výchozí chloridy, jelikož nebyly k dispozici. Byly připravovány reakcí příslušné kyseliny s thionylchloridem v bezvodých podmínkách za přídavku DMF jako katalyzátoru. U syntézy derivátu PaP-15 jsme připravovali ještě PaP-5, která byla výchozí látkou místo estronu. Odlišný postup syntézy byl zvolen u sloučeniny PaP-12, která byla syntetizována Steglichovou esterifikací. Syntézy sloučenin PaP-2, PaP-3 a PaP-4 jsme museli opakovat z důvodu malého výtěžku nebo znečištěného produktu, který se nám nedařilo přechytit rekrystalizací.

Poslední tři dodatečné deriváty (PaP-13, PaP-14, PaP-15) byly připraveny na základě aktivit vůči cholinesterázám. Deriváty PaP-13 a PaP-14 jsou polohové isomery látky PaP-8, která vykazovala nejlepší aktivitu. V případě PaP-15 se jedná o kombinaci dvou nejučinnějších látek, a to esteru PaP-8 a hydrazonu PaP-5.

Výtěžek se u jednotlivých syntéz lišil. Největší výtěžky měly sloučeniny připravené základní syntézou estronu s hydrazidem, kde se výtěžky pohybovaly v rozmezí 62-95 %. Nejnižší výtěžek (8 %) byl u derivátu PaP-15, který byl syntetizován z připravovaných výchozích látek. Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány spektrálními a fyzikálními metodami. Čistota sloučenin byla dostatečná pro biologické hodnocení.

Pomocí mikrodiluční bujónové metody byla u všech nasyntetizovaných látek otestována jejich biologická aktivita – antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální.

Výsledky testování antimikrobiální aktivity jsou shrnuty v tabulce 1). Látky byly testovány na čtyřech bakteriálních kmenech, z nichž dva byly grampozitivní a dva gramnegativní. Jako zástupci grampozitivních koků byli zvoleni: *Staphylococcus aureus*

(SA) a *Enterococcus faecalis* (EF) a jako gramnegativní tyčky byly použity kmeny: *Escherichia coli* (EC) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Z výsledků je patrné, že antibakteriální aktivitu nevykazovala ani jedna ze syntetizovaných látek. Testování PaP-8 nebylo možné, jelikož pro testování bakterií byla použito médium CAMHB, ve kterém se látka vysrážela.

**Tabulka 1 – Výsledky testování antibakteriální aktivity**

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol/l}$ )							
(kód)		estron	PaP-1	PaP-2	PaP-3	PaP-4	PaP-5	PaP-6	PaP-7
SA	24 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
	48 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
EF	24 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
	48 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
EC	24 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
	48 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
PA	24 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
	48 h	>500	>500	>125	>500	>125	>500	>125	>125
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ( $\mu\text{mol/l}$ )							
(kód)		PaP-9	PaP-10	PaP-11	PaP-12	PaP-13	PaP-14	PaP-15	PIP
SA	24 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	3,7
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	
EF	24 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	3,7
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	
EC	24 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	7,41
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	
PA	24 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	29,66
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	

Výsledky testování antifungální aktivity jsou shrnuté v další tabulce (Tabulka 2). Antifungální aktivita byla stanovena vůči čtyřem patogenním houbám. Z nichž dva

testované kmeny byly kvasinky: *Candida albicans* (CA) a *Aspergillus fumigatus* (AF) a dva zástupci vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* (AF) a *Absidia corymbifera* (AC). I u tohoto testování nedošlo k žádné aktivitě. Opět měření aktivity látky PaP-8 nebylo možné. Ale dá se předpokládat, že by zde k žádné aktivitě nedošlo, podobně jako u ostatních látek.

**Tabulka 2 - Výsledky testování antifungální aktivity**

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)							
(kód)		estron	PaP-1	PaP-2	PaP-3	PaP-4	PaP-5	PaP-6	PaP-7
CA	24 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
CK	24 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
AF	24 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
AC	24 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
	48 h	>500	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125
KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)							
(kód)		PaP-9	PaP-10	PaP-11	PaP-12	PaP-13	PaP-14	PaP-15	FLU
CA	24 h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	3,3
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	-
CK	24 h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>104,5
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	-
AF	24 h	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>104,5
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	-
AC	24 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>104,5
	48 h	>125	>125	>500	>125	>125	>125	>125	-

Posledním prováděným antimikrobním testováním bylo testování na antimykobakteriální aktivitu. V tabulce jsou shrnuty výsledné hodnoty (Tabulka 3). Opět je zde uvedena hodnota aktivity estronu, testovaných látek, ale také tři léčiva: isoniazid, rifampicin a ciprofloxacin, která byla použita jako standardy. Aktivity byly testovány na těchto kmenech: *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycolicibacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra.

Výchozí látka estron opět neprojevuje žádnou aktivitu, avšak v tomto případě se objevuje aktivita u nově syntetizovaných derivátů. Nejvíce se projevují aktivity vůči kmenu *Mycobacterium kansasii*, na které působí všechny syntetizované látky kromě PaP-4 a PaP-11, které nevykazují žádnou aktivitu. Naopak žádná aktivita se neprojevila u kmenu *Mycobacterium avium*. Nejnižší hodnoty MIC vykazuje 4-chlorbenzohydrazon s označením PaP-7 (3,91 µg/ml pro *M. kansasii* a 31,25 µg/ml pro *M. tbc.*). 4-(Trifluormethyl)benzhydrazidový derivát PaP-3 projevuje jako jediná látka aktivitu proti *Mycolicibacterium smegmatis* a *Mycolicibacterium aurum*, avšak ve hraniční inhibiční koncentraci. Proti *M. kansasii* má ale příznivě nízkou hodnotu (15,625 µg/ml). Druhou nejnižší hodnotu vykazuje analog 4-methoxybenzohydrazidu PaP-9 (7,81 µg/ml). Vyplývá nám tedy, že hydrazony mají lepší aktivitu než korespondující estery. Rozdíl však není tolik výrazný. V případě PaP-5 a PaP-6 obě látky obsahují nitro skupinu vykazují stejnou aktivitu (31,25 µg/ml). Testování látek PaP-13, PaP-14 a PaP-15 je v procesu.

V porovnání se standardy vykazují nově vzniklé deriváty nižší biologickou aktivitu. Pouze derivát PaP-7 je v porovnání s INH účinnější vůči *M. kansasii*.

**Tabulka 3 – Výsledky testování antimykobakteriální aktivity**

TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (µg/ml)								
Označení	estron	PaP-1	PaP-2	PaP-3	PaP-4	PaP-5	PaP-6	PaP-7
<i>M. smegmatis</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 250	<b>500</b>	≥ 125	≥ 500	≥ 250	≥ 500
<i>M. aurum</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 250	<b>500</b>	≥ 125	≥ 500	≥ 250	≥ 500
<i>M. avium</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	≥ 500
<i>M. kansasii</i>	≥ 500	<b>15,625</b>	<b>125</b>	<b>15,625</b>	≥ 125	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>3,91</b>
<i>M. tbc. H<sub>37</sub>Ra</i>	≥ 500	≥ 500	≥ 250	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	<b>31,25</b>
Označení	PaP-8	PaP-9	PaP-10	PaP-11	PaP-12	INH	RIF	CIP
<i>M. smegmatis</i>	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	<b>31,25</b>	<b>25</b>	<b>0,125</b>
<i>M. aurum</i>	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	<b>3,91</b>	<b>0,78</b>	<b>0,015625</b>
<i>M. avium</i>	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	<b>1000</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>
<i>M. kansasii</i>	<b>125</b>	<b>7,81</b>	<b>62,5</b>	≥ 500	<b>62,5</b>	<b>6,25</b>	<b>0,05</b>	<b>0,25</b>
<i>M. tbc. H<sub>37</sub>Ra</i>	≥ 125	≥ 500	≥ 125	≥ 500	≥ 250	<b>0,125</b>	<b>0,0015625</b>	<b>0,25</b>

Hodnocení cholinesteráz je shrnuto v poslední tabulce (Tabulka 4). Jedná se o výsledky na základě tří měření a jsou uvedeny se směrodatnou odchylkou. Zde se jako účinné projeví všechny deriváty, které také vykázaly duální inhibici obou enzymů s hodnotami  $IC_{50}$  36,31–108,78  $\mu\text{mol/l}$  pro AChE a od 14,15–166,19  $\mu\text{mol/l}$  pro BChE. Nejúčinnějším derivátem pro obě cholinesterázy se projevil 4-chlorfenyl ester estronu s označením PaP-8. Pro enzym AChE tato hodnota byla  $IC_{50}$  36,31  $\mu\text{mol/l}$  a pro BChE  $IC_{50}$  31,88  $\mu\text{mol/l}$ . Jako ještě více účinný inhibitor BChE se projevil PaP-15. Tato látka byla syntetizována kombinací dvou nejlepších látek PaP-5 a PaP-8.

**Tabulka 4 - Výsledky testování inhibice cholinesteráz**

Označení	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	AChE	BChE
Estron	83,29±6,79	65,99±2,36
PaP-1	73,27±4,65	38,65±0,41
PaP-2	51,83±0,41	65,98±0,86
PaP-3	108,78±8,49	81,60±3,88
PaP-4	68,39±0,89	116,22±4,03
PaP-5	49,65±0,47	44,24±1,32
PaP-6	52,28±2,30	82,67±4,45
PaP-7	44,66±2,36	59,09±0,49
PaP-8	<b>36,31±2,10</b>	<b>31,88±0,87</b>
PaP-9	75,64±0,54	166,19±5,86
PaP-10	83,98±1,78	127,34±4,01
PaP-11	87,37±6,48	79,95±3,66
PaP-12	74,58±3,77	51,24±1,63
PaP-13	98,24±1,59	64,91±9,04
PaP-14	47,48±0,39	90,31±2,49
PaP-15	93,36±5,36	<b>14,15±0,52</b>
Rivastigmin	56,10±1,41	38,40±1,97

## 6. ZÁVĚR

Problém antibiotické rezistence představuje vážnou hrozbu pro lidské zdraví. K rozvoji vede nespočet faktorů, které nelze zastavit. Je proto důležité se zaměřit na výzkum a vývoj nových léčiv, která by byla citlivá k rezistentním kmenům.

V této práci bylo připraveno patnáct nových steroidních sloučenin vycházejících z estronu. Látky byly syntetizovány s výtěžkem dostatečným pro charakterizaci a biologické testování.

Připravené sloučeniny neprojevily žádnou antibakteriální ani antifungální aktivitu. Účinnost látek se projevila při testování antimykobakteriální aktivity, kde vykazaly aktivitu téměř všechny sloučeniny alespoň na jeden z testovaných kmenů. Nejúčinnější látkou proti *Mycobacterium kansasii* se jevil hydrazon získaný z 4-chlorbenzohydrazidu (PaP-7). Všechny připravené sloučeniny také vykazaly duální aktivitu vůči AChE a BChE s hodnotami  $IC_{50}$  od 14,15  $\mu\text{mol/l}$ . Zde byl souhrnně nejúčinnější 4-chlorfenyl ester estronu pro obě cholinesterázy. A primárně na BChE vykázal vysoce účinnou aktivitu derivát PaP-15.

Připravené sloučeniny budou dále otestovány na jejich cytotoxicitu.



## 7. POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	ABC transportér; ATP-binding cassette
AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AChE	acetylcholinesteráza
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AMK	aminokyseliny
ATB	antibiotikum, antibiotika
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosin-trifosfát
ATR	zeslabená úplná reflektance; attenuated total reflectance
BChE	butyrylcholinesteráza
CA	<i>Candida albicans</i>
CAMHB	Müeller-Hintonův bujón
CA-MRSA	komunitní methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CFU	jednotky tvořící kolonie; colony forming units
CK	<i>Candida krusei</i>
DCM	dichlormethan
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí; European Centre for Disease Prevention and Control
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESBL	beta-laktamázy s rozšířeným spektrem; Extended Spectrum Beta-Lactamases
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FLU	flukonazol
GIT	gastrointestinální trakt
HA-MRSA	nozokomiální methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
IČ	infračervená spektroskopie
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> odolná vůči karbapenemům
LA-MRSA	zvířecí methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
LPS	lipopolysacharidy
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MDR	multirezistence; multiple drug resistance
MIC	minimální inhibiční koncentrace; minimum inhibitory concentration
MK	mastná kyselina
mRNA	messengerová RNA
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MHB	Mueller-Hinton Broth
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	protein vázající penicilin; penicillin-binding protein
PIP	piperacilin
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie; thin layer chromatography
tRNA	transferová RNA
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky
WHO	Světová zdravotnická organizace; World Health Organization

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Grampozitivní bakterie – struktura stěny.....	14
Obrázek 2 – Gramnegativní bakterie – struktura stěny.....	14
Obrázek 3 – Selekční tlak antibiotik.....	17
Obrázek 4 – Linezolid.....	19
Obrázek 5 – Daptomycin .....	19
Obrázek 6 – Methicilin.....	20
Obrázek 7 – Oxacilin .....	20
Obrázek 8 – Obecná struktura karbapenemů .....	21
Obrázek 9 – Beta-laktamový kruh .....	24
Obrázek 10 – Obecný vzorec penicilinu.....	24
Obrázek 11 – Obecný vzorec cefalosporinu .....	25
Obrázek 12 – Vankomycin .....	27
Obrázek 13 – Kolistin .....	29
Obrázek 14 – Gentamicin .....	30
Obrázek 15 – Ciprofloxacin.....	31
Obrázek 16 – Kyselina fusidová .....	33
Obrázek 17 – Cholesterol .....	34
Obrázek 18 – Schéma designu cílových molekul .....	35
Obrázek 19 – Obecné schéma přípravy hydrazonů.....	37
Obrázek 20 – Obecné schéma přípravy esterů.....	38
Obrázek 21 – Obecné schéma přípravy výchozího chloridu.....	39

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Adedeji WA. The treasure called antibiotics. *Ann Ib Postgrad Med*. 2016 Dec;14(2):56–7.
2. Bairán G, Rebollar-Pérez G, Chávez-Bravo E, Torres E. Treatment Processes for Microbial Resistance Mitigation: The Technological Contribution to Tackle the Problem of Antibiotic Resistance. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 28;17(23).
3. Žemličková H. Antibiotická rezistence u původců komunitních infekcí. *Pediatric pro praxi* [Internet]. 2015;296–8. Available from: [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz)
4. Krejčí E. Vzrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. *Praktické lékařství*. 2019;196–9.
5. Beneš J. *Antibiotika: systematika, vlastnosti a použití*. 1st ed. Vol. 600. Praha: Grada Publishing; 2018.
6. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008 Feb 17;3(2):163–75.
7. Hazirolan G. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Archives of health science and research*. 2020;221–6.
8. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482–501.
9. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*. 2006 Jun;34(5):S3–10.
10. Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect*. 2012 Aug;120(8):1100–6.
11. Kolář M, Štrbová P. Vývoj rezistence invazivních bakterií v souvislosti se spotřebou antibiotik. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2015;29(2):49–52.
12. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Jun 17;33(3).
13. Levitus M, Rewane A, Perera TB. [Internet]. *StatPearls*. 2023 [cited 2024 May 15]. Vancomycin-Resistant Enterococci. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
14. Giersing BK, Dastgheyb SS, Modjarrad K, Moorthy V. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2016 Jun;34(26):2962–6.
15. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. Vol. 25, *Molecules*. MDPI AG; 2020.

16. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016 Sep;80(3):629–61.
17. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*. Virulence. 2012 May 27;3(3):243–50.
18. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier; 2015. p. 753–67.
19. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Sep 18;32(4).
20. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 2020 Dec;208:112829.
21. Pandey N, Cascella M. [Internet]. StatPearls; 2023 [cited 2024 May 15]. Beta-Lactam Antibiotics. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424895/>
22. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Aug 1;6(8).
23. Blaskovich MAT, Hansford KA, Butler MS, Jia Z, Mark AE, Cooper MA. Developments in Glycopeptide Antibiotics. *ACS Infect Dis*. 2018 May 11;4(5):715–35.
24. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1989 Nov;8(11):943–50.
25. Strahl H, Errington J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71(1):519–38.
26. Hashizume H, Nishimura Y. Cyclic Lipopeptide Antibiotics. In 2008. p. 693–751.
27. Jensen SK, Thomsen TT, Oddo A, Franzyk H, Løbner-Olesen A, Hansen PR. Novel Cyclic Lipopeptide Antibiotics: Effects of Acyl Chain Length and Position. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 13;21(16):5829.
28. Heidary M, Khosravi AD, Khoshnood S, Nasiri MJ, Soleimani S, Goudarzi M. Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Jan 1;73(1):1–11.
29. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Jun 1;6(6):a027029.
30. Minchin S, Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem*. 2019 Oct 16;63(4):433–56.
31. Cambau E, Guillard T. Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 2012 Apr 1;31(1):77–87.

32. Fluoroquinolones [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 [cited 2024 Apr 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547840/>
33. Rothstein DM. Rifamycins, Alone and in Combination. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Jul;6(7):a027011.
34. Patel PH, Hashmi MF. Macrolides [Internet]. StatPearls; 2024 [cited 2024 Apr 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/>
35. Collignon P, Turnidge J. Fusidic acid in vitro activity. *Int J Antimicrob Agents.* 1999 Aug;12:S45–58.
36. Vollaro A, Esposito A, Antonaki E, Iula VD, D'Alonzo D, Guaragna A, et al. Steroid derivatives as potential antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* planktonic cells. *Microorganisms.* 2020 Apr 1;8(4).
37. Doğan A, Otlu S, Çelebi Ö, Aksu Kiliçle P, Gülmez Sağlam A, Doğan A, et al. An investigation of antibacterial effects of steroids. *Turk J Vet Anim Sci.* 2017;41:302–5.
38. Mistry S, Singh AK. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of new steroidal hydrazone derivatives. *Futur J Pharm Sci.* 2022 Dec;8(1).
39. Xiaoxue C, Bo L, Tianzhen L, Chunbao L. A practical solution for aqueous reactions of water-insoluble high-melting-point organic substrates. *Green Chemistry.* 2012;14(3):668–72.
40. Gardi R, Vitali R, Falconi G, Ercoli A. 1,3,5(10)-Estratrien-17.β-enol ethers and acetals. New classes of orally and parenterally active estrogenic derivatives. *J Med Chem.* 1973 Feb 1;16(2):123–7.
41. El-Khawass; Mohsen; Omar; et al. Steroidal derivatives. Part 2: Synthesis and endocrinologic properties of novel acylhydrazone derivatives of steroids. *Pharmazie.* 1980;(3):143–5.
42. Hougbedji NH, Štěpánková Š, Pflégr V, Svrčková K, Švarcová M, Vinšová J, et al. Novel Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase Derived from Benzohydrazides: Synthesis, Evaluation and Docking Study. *Pharmaceuticals.* 2023 Jan 24;16(2):172.