

DERIVÁTY PYRAZINU
JAKO POTENCIÁLNÍ
LÉČIVA VII.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VEDOUcí DIPLOMOVÉ PRÁCE: doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Ondřej Jandourek



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, <http://www.faf.cuni.cz>
tel. +420495067111, fax +420495518002

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Na akademický rok: 2010/2011

Jméno příjmení:

Ondřej Jand'ourek

Studijní program:

Farmacie

Vedoucí diplomové práce:

doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Název diplomové práce:

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva VII.

Název diplomové práce v angličtině:

Pyrazine derivatives as potential drugs VII.

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je syntetizovat sérii na jádře substituovaných derivátů pyrazinu s předpokládanou antimykobakteriální, antibakteriální resp. antifungální aktivitou.

Student nejprve provede literární rešerši, soustředí se na perspektivní látky a na metody přípravy derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny. Těžištěm jeho činnosti bude experimentální práce.

Dosažené výsledky předloží v písemné podobě. Rozsah a členění práce musí odpovídat zásadám platným pro diplomové práce syntetického zaměření.

Seznam odborné literatury:

Chemical Abstracts (CA)

Beilsteins Handbuch der organischen Chemie

Houben I., Weyl Th.: Die Methoden der organischen Chemie

Pharmazeutische Stoffliste

počítačové databáze (Web of Science, Medline, Beilstein, CA)

literatura farmaceuticko-chemického charakteru, např. Current Medicinal Chemistry,

Eur. J. Med. Chem., Drug Discovery Today, J. Med. Chem., Drugs Fut., Farmaco,

Bioorg. Med. Chem. Lett. apod.

Datum zadání diplomové práce: 30. 11. 2009

Termín odevzdání diplomové práce: 15. 5. 2011

doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

vedoucí katedry

Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

děkan fakulty

V Hradci Králové dne: 30. 11. 2009

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za mnoho cenných rad a pomoci během zpracovávání této práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Janu Zítkovi za pomoc během praktické části a všem dalším, kdo se nějak na této práci podíleli.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2011-263-001.

.....

Ondřej Jandourek

15. 5. 2011

OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1.1 Tuberkulóza.....	9
1.2 Historie a současnost.....	12
1.3 Původce onemocnění, diagnostika.....	18
1.4 Očkování, tuberkulinový test, chemoprophylaxe.....	23
1.5 Léčba, léčebné režimy.....	26
1.5.1 Léčiva.....	26
1.5.2 Léčebné režimy.....	34
1.6 Deriváty pyrazinamidu s publikovanou antimykobakteriální aktivitou.....	36
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	39
3. METODICKÁ ČÁST.....	40
3.1 Chemická část.....	40
3.2 Biologické hodnocení.....	43
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
4.1 Přístroje a chemikálie.....	46
4.2 Příprava 5-hydroxy-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu.....	48
4.3 Příprava 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu.....	49
4.4 Obecný postup přípravy konečných produktů.....	50
4.5 Analytická data konečných produktů.....	51
4.5.1 5-methyl-6-(fenylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril.....	51
4.5.2 5-methyl-6-((3-(trifluormethyl)fenyl) amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril.....	52
4.5.3 5-((3-fluorfenyl) amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	53
4.5.4 5-((3-chlorfenyl) amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	54
4.5.5 5-((3-hydroxyfenyl) amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	55
4.5.6 5-((2-hydroxyfenyl) amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	56
4.5.7 5-((4-hydroxyfenyl) amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	57

4.5.8 5-((3-bromfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril.....	58
4.5.9 4-((5,6-dikyano-3-methylpyrazin-2-yl)amino)-2-hydroxybenzoová kyselina	59
4.5.10 5-methyl-6-((3-nitrofenyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril.....	60
4.5.11 5-((3-methoxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	61
4.6 Výsledky biologického hodnocení	62
5. DISKUSE.....	65
6. ZÁVĚR.....	68
ABSTRAKT.....	70
ABSTRACT.....	71
POUŽITÁ LITERATURA.....	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TBC - tuberkulóza
ISBT - Informační Systém Bacilární Tuberkulózy
WHO - World Health Organisation
MDR-TB - multi-drug resistant tuberculosis
XDR-TB - extreme-drug resistant tuberculosis
IUATLD - International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases
AT - antituberkulotikum, antituberkulotický
MbT - *Mycobacterium tuberculosis*
TDM - dimykolátu-trehalosy
IFN- γ - interferon gama
PCR - Polymerase Chain Reaction
BCG - Bacillus Calmette-Guerin
DOTS - Directly Observed Therapy Short course
ATB - antibiotikum
CNS - Centrální Nervová Soustava
PAD - Perorální AntiDiabetika
FK - farmakokinetika, farmakokinetický
NÚ - Nežádoucí Účinky
ATP - adenosintrifosfát
TRN - oddělení Tuberkulózy a Respiračních Nemocí
FAS-1 - Fatty Acid Syntethasa
t. t. - teplota tání
 R_f - retenční faktor
IČ - infračervené spektrum
MIC - minimální inhibiční koncentrace
TLC - tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
m. h. - molekulová hmotnost

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekční bakteriální onemocnění způsobené mikroorganismy z rodu *Mycobacterium*. A to především takzvaným *Mycobacterium tuberculosis* komplexem, do kterého se řadí 4 základní druhy - *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*, z nichž nejčastějším agens vyvolávajícím tuberkulózu přibližně v 95% je první jmenovaná mykobakterie - *M. tuberculosis*.¹ Ve většině případů se jedná o onemocnění postihující plíce. Existují však i mimoplicní lokalizace této nemoci, i když tato forma tvoří jenom přibližně asi 10% celkového počtu TBC onemocnění.²

Samotná plicní tuberkulóza má mnoho příznaků, které jsou však dost nespecifické a proto dochází často k určení diagnózy pozdě, kdy už infekce vypukla naplno. Mezi hlavní symptomy patří únava, pokles výkonnosti, nechutenství spolu s úbytkem hmotnosti (v minulosti byl proto jedním z názvů pro toto onemocnění „oubytě či úbytě“ nebo také řecké označení phthisis, které znamenalo úbytek životní energie či hmoty), nadměrné pocení během spánku, kolísavost teplot, kašel, hemoptýza (tento příznak je v dnešní době poměrně vzácný) a nakonec to může být i pleurální bolest na hrudi, kterou je ale pacient schopný sám přímo lokalizovat.¹

Zdrojem nákazy je dnes především nakažený člověk. Od něj poté dochází k přenosu infekce kapénkovou cestou přímo nebo například vdechováním mykobakterií přítomných ve vzduchu bez přítomnosti bacilonosiče. Dalším, i když v současnosti již poměrně vzácným způsobem nakažení, je přímý kontakt s biologickým agens. Jedná se tedy hlavně o pracovníky, kteří přijdou do přímého styku s infekčním materiálem - patologové, veterináři, ...

V současnosti se rozlišují dvě fáze onemocnění. A to primární infekce a postprimární infekce.

U primární tuberkulózy se jedná o infekci, kdy se organismus s patogenním původcem onemocnění setkává poprvé. Dochází k inhalaci kapének, které by měly obsahovat alespoň 5000 mykobakterií v jedné kapénce. Dále se bakterie množí v plicní tkáni bohatě zásobené kyslíkem (horní plicní laloky) do té doby, než se v organismu vyvine tzv. buněčná imunita. Poté vzniká centrální nekrotické ložisko obklopené granulační tkání a následuje šíření mykobakterií mízními cestami do místních lymfatických uzlin. Tento jev tak dává vzniknout tzv. primárnímu tuberkulóznímu komplexu. Následný průběh pak může mít několik variant. V tom lepším případě dochází díky vzniklé imunitě k potlačení infekce a spontánnímu zhojení. V místě nekrózy pak dochází ke kalcifikaci. V horším případě pak vlivem přecitlivělosti dochází k rozvoji zánětu a ke kaseifikaci (nebo také „zesýrovatění“) napadené plicní tkáně a následně i k možné kavernizaci. To pak dojde k vyprázdnění obsahu nekrotického ložiska i s živými bakteriemi a zánět se tak rozšíří dále v organismu. Při vyprázdnění do plic se pacient stává infekčním pro své okolí. Při přestupu mikroorganismů do krve dochází k šíření infekce do dalších míst v plicích, anebo může dojít k šíření krevní cestou. Nejhorší forma asi je, když se kaverna vyprázdní či se provalí do plicnice. Pak dochází k již zmiňované hemoptýze. Bakterie se poté usidlují v dalších orgánech a dávají tak vzniknout výše zmíněné mimoplicní TBC (například tuberkulózní meningitidě, postižení urogenitálního systému, kloubů, dlouhých kostí nebo mízního systému - místa s vysokou kyslíkovou tenzí).

Tato primární infekce ve většině případů proběhne v dětském věku, u dospělého jedince je výskyt minimální.

Postprimární infekce vzniká u osob, které již přišly do kontaktu s mikroorganismem v minulosti, a prodělali tak

primární fázi. Ke vzniku onemocnění může dojít dvěma způsoby. Za prvé se může jednat o další exogenní infekci, kdy organismus napadnou nové mykobakterie po masivní expozici zdroji nákazy. Za druhé pak progresí či reaktivací primární tuberkulózy, ať už v plicích či jiných postižených orgánových soustavách.

Postprimární infekce probíhá u dospělých jedinců.¹

1.2 Historie a současnost

(situace ve světě a v ČR)

Označení tuberkulóza poprvé použil v roce 1834 Schönlein. A to proto, že při onemocnění pozoroval v plicní tkáni tvorbu uzlíku jako charakteristický rys této nemoci.

Původce nemoci byl objeven ale až skoro o padesát let později a to v roce 1882 díky slavnému vědci Robertu Kochovi (podle něj nese původce i jedno ze svých jmen – Kochův bacil).¹

I přes to, že původce onemocnění byl objeven až v 19. století, tuberkulóza provází lidstvo od nepaměti. Na některých tělech, objevených historiky po celém světě, byly patrné stopy po kostní formě tuberkulózy. A bylo jedno, jestli se jednalo o pozůstatky lidí z doby kamenné, mumie z Egypta či osoby z dob starého Řecka a Říma. Jako příklad lze uvést jména jako Václav II., Jiří Wolker, Božena Němcová, Anders Celsius, Ludvík XIII., Simon Bolívar.³

V českých zemích byl boj proti TBC zahájen na počátku 20. století, kdy v roce 1905 bylo otevřeno první české sanatorium v Žamberku. Během první světové války byla situace špatná. Na tuberkulózu umíralo až 400 lidí z 100.000 obyvatel. O nemocné se staraly především charitativní organizace. Jednou z nejdůležitějších byla Masarykova liga proti tuberkulóze, založená v roce 1919.

Zlom však nastal v roce 1948. V tomto roce došlo k uzákonění povinnosti hlásit nákazu tuberkulórou a zároveň začala i éra „moderní“ chemoterapie (streptomycin a paraaminosalicylová kyselina). O pět let později byla zavedena i povinná kalmetizace, čímž bylo docíleno snížení četnosti těžkých forem tuberkulózy u dětí.

Dalším krokem byla eliminace jednoho z původců onemocnění – *Mycobacterium bovis*. V roce 1960 to začalo usnesením vlády o likvidaci tuberkulózy skotu a používáním trojkombinace antituberkulotik v rámci terapie.

Od 80. let bylo do terapie zavedeno ansamycinové antibiotikum rifampicin (ve světě již v 60. letech), což opět významně přispělo k další eliminaci onemocnění na naší půdě.

Poté už následovalo testování čtyřkombinací léčiv a zavedení krátkodobých léčebných režimů. Nakonec byl zaveden Registr tuberkulózy a Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT).¹

Aktuální situace ve světě není zrovna příznivá. TBC patří mezi infekční choroby s největší úmrtností a zároveň se jedná o 2. - 3. nejrozšířenější infekční chorobu (1. malárie, 2. - 3. lepra). Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation, WHO) odhaduje, že ročně dochází ke vzniku onemocnění až u osmi milionů lidí, z tohoto počtu jich asi tři miliony umírají. A většinu těchto případů tvoří obyvatelé rozvojových zemí - až 95%.

Dalším pozorováním WHO zjistila, že docházelo meziročně k nárůstu počtu onemocnění až o 0,4%.⁴

Od roku 2007 se počet onemocnění již ale stabilizoval a má tendence pomalu klesat.⁵

Dalším, nepříliš pozitivním údajem je to, že až 1/3 populace je mykobakteriemi infikovaná a u 5 - 10% z tohoto počtu většinou dochází k rozvoji aktivního onemocnění.²

Jelikož je tuberkulóza především nemocí sociálně slabých lidí, bezdomovců a drogově závislých, vyvstal v posledních letech i další problém. A tím je souvislost mezi infekcí HIV a onemocněním TBC.

WHO opět uvádí, že mezi umírajícími na TBC je až dvakrát více lidí nakažených virem HIV. V roce 2007 uvádí statistiky, že 1,37 milionu nových případů tuberkulózy je mezi HIV pozitivními lidmi. Proto je třeba sledovat incidenci tohoto onemocnění u lidí s HIV a to nejen z důvodů jejich snížené imunity, ale i možnosti dalšího šíření.⁵ HIV pozitivní jedinci jsou totiž až 70krát náchylnější k TBC infekci a ti, u kterých se rozvine AIDS až 170krát.²

Jelikož jedním z největších rezervoárů infekcí HIV a TBC

je především Afrika, bylo jen logickým krokem založení výzkumného centra pro obě nemoci právě v Jihoafrické republice. Jedná se o projekt amerického Lékařského institutu Howarda Hughese (Howard Hughes Medical Institute, HHMI). Je to vlastně první výzkumné středisko svého druhu v Africe a pravděpodobně i na světě. Lokalizací centra je Durban, přímořské letoviště v JAR, v kampusu univerzity KwaZulu - Natal. Přední vědci se tu zabývají studiem rychlé diagnostiky rezistentní tuberkulózy, imunitní odpovědi HIV pozitivních pacientů na infekci mykobakteriemi, či vzory, kterými se řídí latence a reinfekce tuberkulózy.⁶

Dalším, stále se zvětšujícím problémem jsou, jak už jsem naznačil výše, rezistentní kmeny *M. tuberculosis*. Dle WHO bylo v roce 2007 identifikováno až půl milionu jedinců, kteří byli rezistentní k běžné léčbě.⁵

Zatím se označují dva druhy rezistence.

Prvním z nich jsou tzv. Multi - drug rezistentní kmeny (MDR - TB). Výskyt tohoto typu rezistence je asi 5,3% všech diagnostikovaných onemocnění TBC.⁷ U těchto kmenů většinou selhává léčba antituberkulotiky první řady (hlavně isoniazidem a rifampicinem). Při léčbě je třeba nasazovat látky druhé linie, které jsou dražší a mají i více nežádoucích účinků (i toto je jedním z problémů v rozvojových zemích, kde na tento typ léčby nejsou prostředky a dochází tak k dalšímu nežádoucímu šíření rezistence).

Tím druhým typem jsou pak kmeny extrémně rezistentní (XDR - TB, nebo také extensively - drug resistant). U těchto kmenů je problém ještě větší. Nejen, že mají vyvinutou rezistenci jako kmeny MDR - TB, ale zároveň jsou rezistentní minimálně ke třem skupinám antituberkulotik druhé linie.⁸ Jedním z hlavních ohnisek těchto kmenů byla vesnice v jižní Africe, kde vzniklo výše zmíněné centrum.

Vzhledem k této situaci přikročila Světová zdravotnická organizace spolu s Mezinárodní unií proti tuberkulóze a

plicním nemocem (IUATLD) k úpravě pokynů pro léčbu MDR - TB a XDR - TB. Ale asi i přes tento krok dojde pravděpodobně k ohrožení splnění cílů WHO, a to ke globálnímu omezení TBC do roku 2015.

Pro co největší kontrolu výskytu a vývoje rezistence je samozřejmě i její předcházení. Je nutno přímo kontrolovat a nepřerušovat podávání kombinací antituberkulotik alespoň po dobu 6 - 12 měsíců. Dále provádět testy citlivosti apod. Při výskytu MDR - TB pak právě podle testů citlivosti na daná léčiva v délce 18 měsíců do kultivační negativity. V případě XDR - TB musí být léčba ještě důkladnější.

Z tohoto důvodu vypracovala WHO nové rozdělení antituberkulotik do pěti skupin, viz tabulka.

P. O. AT první řady	ISONIAZID, RIFAMPICIN, ETHAMBUTOL, PYRAZINAMID, RIFABUTIN
Inj. AT	KANAMYCIN, AMIKACIN, KAPREOMYCIN, STREPTOMYCIN
Fluorochinolony	MOXIFLOXACIN, LEVOFLOXACIN, OFLOXACIN
P. O. AT druhé řady	ETHIONAMID, PROTHIONAMID, CYKLOSERIN, TERIZIDON, PAS
AT nejasné účinnosti	THIACETAZON, KLARITHROMYCIN, KLOFAZIMIN, LINEZOLID

Tab. 1 - Rozdělení AT dle WHO

Při léčbě se poté sestupuje v tabulce směrem dolů dle citlivosti organismů.⁷

Důvodem ke vzniku rezistence je většinou špatná a nedůsledná léčba probíhající infekce. Dochází pak k různým genovým mutacím, které vedou ke změnám cílových struktur, na které by právě antituberkulotika měla působit.⁹

Situace v ČR je poměrně stabilní a dobrá. Už od roku 1999 počet onemocnění meziročně klesá. Je to určitě také tím, že

dohled nad TBC po prvních sníženích nemocnosti nepolevil. Systém funguje na několika úrovních:⁸

- 1) Terénní pracoviště spolu s okresními a krajskými konzultanty - sběr dat do registru tuberkulózy
- 2) Národní jednotka kontroly a dohledu nad tuberkulózním onemocněním
- 3) Referenční laboratoře
- 4) Povinná, kontrolní a změnová hlášení do registru tuberkulózy
- 5) Provádění preventivních prohlídek ve vybraných skupinách obyvatel, depistáž (sekundární prevence - vyšetřování kontaktů), kontrola osob z rizikových skupin v rámci dispenzárních prohlídek
- 6) Očkování (kalmetizace), chemoprophylaxe u latentní formy tuberkulózy

Stav a vývoj nemocnosti v ČR shrnují následující tabulky^{10,11,12}. Z nich je patrné, že se zvyšuje počet onemocnění u cizinců. To je způsobeno poměrně velkou migrací a zároveň také tím, že po cizích státních příslušnících není při delším pobytu na našem území požadováno vyšetření.

Rok	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
TBC	1162	1057	1007	905	871	835	710
Incidence (na 100000 obyv.)	11,4	10,4	9,4	8,5	8,4	8,1	6,8

Tab. 2 - Celkový výskytu TBC v České republice

Rok Země	2007	2007 - procenta	2008	2008 - procenta	2009	2009 - procenta
ČR	718	82,4	659	78,9	574	80,8
SR	31	3,6	22	2,5	26	3,7
Vietnam	28	3,2	30	3,4	30	4,2
Ukrajina	27	3,1	33	3,8	34	4,8
Mongolsko	22	2,5	59	6,7	?	?
Cizinci	153	17,6	176	21,1	136	19,2
Celkem	871	100	835	100	710	100

Tab. 3 - Zastoupení cizinců z celkového počtu onemocnění

Zvyšující se incidence u cizinců by se měla podle mého názoru sledovat. Tím, že ČR tvoří hranici mezi státy s dobře kontrolovanou situací TBC a státy, kde je kontrola značně zanedbávána či je mizivá (především státy bývalého Sovětského svazu), je třeba dalšímu rozšiřování aktivně bránit. A to například, jak už jsem uvedl výše, pomocí povinného vyšetření prováděného českými lékaři.

Samozřejmě ani České republice se celosvětový problém s rezistentní tuberkulózou nevyhnul. A ačkoliv vydaná doporučení WHO a IUATLD, která byla přeložena i do českého odborného tisku, určují směr terapie, tak výsledky u nás ve srovnání s ostatními vyspělými zeměmi nejsou příliš pozitivní. Jedním z důvodů může být i nepoužívání všech antituberkulotik 2. linie. A to ať z důvodu chybějící registrace či obtížné dostupnosti. Proto by se měla informovanost lékařů neustále prohlubovat.⁹

1.3 Původce onemocnění, diagnostika

Původce onemocnění - *M. tuberculosis* (MbT) a ostatní dříve vyjmenované bakterie, se taxonomicky řadí do řádu Actinomycetales, čeledi Mycobacteriaceae ve které se nachází právě jediný rod - Mycobacterium.

Jedná se o mikroorganismy morfoloogicky řazené mezi tyčinky (mohou být rovné, zahnuté, štíhlé a různě dlouhé). Typické pro tyto patogeny je, že se nebarví Gramovou metodou. Díky své typické stavbě buněčné stěny, která obsahuje mnoho struktur (lipidy a vysokomolekulární vosky) včetně kyseliny mykolové (C60 - C90 dlouhé řetězce, které se jinde v přírodě skoro nevyskytují), jsou tyto patogeny acidorezistentní a alkoholrezistentní. Za tuto odolnost a hydrofobicitu je zodpovědná právě kyselina mykolová. Ta se nachází ve formě dimykolátu-trehalosy (TDM), který se k buněčné stěně váže kovalentně nebo nekovalentně.¹³ Na druhou stranu při její extrakci se acidorezistence neztrácí.

Jelikož jde o bakterie aerobní, je jejich výskyt typický v orgánech se zvýšeným obsahem kyslíku (horní laloky plic, dlouhé kosti, ledviny, ...).

MbT je zároveň i lehce rezistentní vůči zvýšeným teplotám, proto při pasterizaci je třeba teplotu zvýšit nebo prodloužit dobu působení.

Antigenní struktura je velice složitá. Buněčná stěna všech mykobakterií obsahuje polysacharidový antigen, který je společný všem druhům (jedná se o takzvaný α -hemosensitin). Pro *M. tuberculosis* jsou pak dále typické komplexy proteinových struktur, které jsou vysoce antigenní a cytotoxické. Směs těchto struktur se získává za účelem přípravy tuberkulinu, ze kterého se postupným čištěním zhotovují látky pro zjišťování imunity vůči mykobakteriím (viz dále). Další významnou složkou jsou lipidické antigeny. Většinou platí, že čím více jich daný kmen má, tím vyšší je virulence,

a zároveň jsou odpovědné za buněčné reakce probíhající při onemocnění. Nejvýznamnější jsou:¹⁴

- vosk D (mykolová kyselina + polysacharid + sulfolipidy), který je zodpovědný za granulomatózní změny a kaseózní nekrózu
- povrchový lipopolysacharid (cord-factor), faktor virulence, cytotoxicity a leukocidní aktivity
- mykolová kyselina

Mykobakterie je také možno rozdělit do skupin dle jejich metabolické aktivity:²

	Metabolická aktivita	Výskyt	pH prostředí	
1	vysoká	extracelulárně	zásadité	} PERZISTOŘI
2	střídající se	extracelulárně, v kaseu	neutrální	
3	nízká	extracelulárně i intracelulárně	kyselé	
4	spící bacily, dormant forms, dormanti			

Tab. 3 - Rozdělení mykobakterií dle aktivity

Na poslední uvedenou skupinu v tabulce nepůsobí skoro žádná antituberkulotika.

Diagnostiku přítomnosti patogenu je možno provádět několika způsoby. Nejprve je však nutné získat vzorek materiálu, u kterého se očekává výskyt bakterie. U plicní formy se jedná především o sputum, indukované sputum, tekutinu z bronchoalveolární laváže, případně výtěr z hrtanu při nemožnosti odběru výše uvedených. Při mimoplicní infekci se pak odebírá moč a menstruační krev (infekce urogenitálu), krev, likvor (tuberkulózní

meningitida), hnis, pleurální výpotek, kloubní výpotek, ...
Poté se provádí vyšetření.

Prvním z nich je mikroskopický průkaz přítomnosti mykobakterií. Nejčastěji se provádí barvení dle Ziehl - Neelsena. Jedná se o barvení na základě acidorezistence patogenu. Preparát se obarví kyselým karbolfuchsinem, což dá bakteriím typickou červenou barvu. Poté se oplachuje kyselým alkoholem, vůči kterému je mykobakteriální stěna rezistentní a červenou barvu si tak zachovají. Následuje už pouze dobarvení pozadí (většinou modrá barva).²

Další možností je použití fluorochromů s následným odečtem pomocí fluorescenčního mikroskopu. Zde se Mycobacterium jeví jako zářící žlutozelená až stříbrná tyčinka na tmavě červeném pozadí.

Tyto metody mají 2 nevýhody. K průkazu infekce je třeba, aby množství bacilů v 1 ml sputa bylo asi 50.000 - 100.000. Při tomto množství už je jasné, že pacient je silně infekční a je třeba okamžité izolace a léčby. Druhou nevýhodou je nemožnost bližší identifikace a posouzení životaschopnosti mykobakterií.¹

Další metodou je kultivace. Tato metoda je citlivější, ale zároveň poměrně zdoluhavá z důvodu dlouhého generačního času mikroorganismů (klidně i 48 hodin oproti desítkám minut u ostatních bakterií). Nejprve je vzorek třeba dekontaminovat od ostatních patogenů, což díky rezistenci není takový problém. Dále se postupuje očkováním na vaječné půdy, z nichž se nejčastěji používá Löwenstein-Jensenova nebo z tekutých pak půda Šulova. Inkubace probíhá při 37°C a výsledky se odečítají po 3, 6, 9 a případně 12 týdnech. Hodnotí se vzhled a počty narostlých kolonií či vzhled tekutého média (sediment, povlak).

Následující, i když dnes už obsoletní metodou, je pokus na morčeti. Při této metodě se morče naočkovalo suspektním

materiálem a po úhynu či 6 týdnech se provedlo mikroskopické vyšetření tkání a nátěr s mikroskopickým odečtem.¹

Tuto metodu dnes nahrazují moderní postupy. Ať už se jedná o metody imunologické, kdy se prokazují specifické antigeny pomocí monoklonálních protilátek, či radiometrické a molekulárně genetické.

V prvním případě, tedy u imunologického principu, může být jedním z názvů QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB Gold). Řadí se mezi nepřímé testy a zakládá se na principu reakce lymfocytů infikovaného pacienta s danými antigeny, následně dojde k uvolnění IFN- γ . Množství interferonu se poté kvantifikuje. Přínosem je, že většina netuberkulózních mykobakterií a kmeny používané k vakcinaci tyto antigeny neobsahují a lze tak rozlišit zda jde o reakci na předchozí očkování či na aktivně probíhající infekci.⁸

Druhou, výše zmiňovanou metodou je takzvaný BACTEC systém. Zde se jedná tedy o radiometrickou metodu, která měří intenzitu uvolňované radioaktivity. V substrátu je totiž zakomponovaná ¹⁴C radioaktivní kyselina palmitová jako zdroj energie pro mikroorganismy a jejímž metabolickým rozkladem vzniká radioaktivní ¹⁴CO₂, který uvolněný je měřitelný. Tato metoda je již poněkud rychlejší a výsledky lze odečítat již po 5 - 7 dnech (někdy je uváděno 14 dní). Tato metoda se dá využít například i při stanovování citlivosti na jednotlivá antituberkulotika. Protože právě nepřítomnost ¹⁴CO₂ svědčí o účinnosti na daný kmen.

Poslední z těchto metod jsou tedy postupy řazené mezi molekulárně genetické metody.

Mohou se používat genetické sondy, které jsou značené (v tomto případě ¹²⁵I) a vytvářejí páry s určitými úseky DNA či RNA. Procento shody se pak stanovuje gamakamerou.

Druhou častější metodou, je metoda PCR neboli polymerázové řetězové reakce. Při tomto postupu se namnoží DNA dané mykobakterie, kterou je možné už prokázat. Výhodou této metody

je její rychlost. Výsledek je možné získat již za 3 hodiny. Ale jsou tu i jisté nevýhody. Kromě finanční náročnosti to je zejména možnost falešné positivity, kdy k získání a namnožení DNA stačí i jediné a klidně i mrtvé *Mycobacterium*.^{1,2}

Jako poslední, i když stále významnou metodu, uvádím metodu nepřímou, a to skiagram hrudníku. Jedná se o rentgenové vyšetření hrudníku, které může na tuberkulózu rychle upozornit, a mělo by se provádět preventivně při každém plicním vyšetření (hlavně u cizinců) a u nejasných příznaků, které by mohly signalizovat probíhající onemocnění.

1.4 Očkování, tuberkulinový test, chemoprophylaxe

Jednou z možností, jak zvýšit odolnost proti TBC, je vakcinace. Při tomto očkování se jedná o vpravení živých atenuovaných mikroorganismů (oslabených kmenů. Které postupným „šlechtěním“ ztratily svou virulenci).

Název vakcíny BCG pochází od jejích tvůrců - Calmetta a Guerina, jedná se o bacilus Calmette-Guerin. Ti ho postupným pěstěním zbavili virulence a v roce 1922 byl poprvé aplikován u novorozence. Následně se očkování začalo šířit do celého světa a spadlo pod kontrolu WHO.

Od roku 1927 se očkuje intradermálně. A to 0,05 ml vakcíny do levého deltového svalu pomocí 30 - 40 vpichů diskem s malými jehličkami. V případech, kdy nelze očkovat do epidermis, je možné vakcínu podat perorálně.

Očkují se děti od 4. dne do 6. týdne života (při váze nad 2,5 kg). Při nižší porodní váze se očkuje individuálně.

3 - 4 dny po podání očkovací látky se v místě aplikace objeví malá papula a může dojít i ke zvětšení mízních uzlin. Tato reakce svědčí o úspěšnosti očkování a pozitivita či negativita je kontrolována kalmetizační sestrou.

Po 3 - 4 měsících dojde k tvorbě hladké jizvy. Při rychlejším zhojení je podezření na infekci mykobakteriemi.

V 11 letech po provedení tuberkulinového testu dochází při negativním výsledku k přeočkování.

Při vakcinaci může dojít i ke komplikacím, které však nejsou příliš časté (0,1 %). Mezi ně patří tvorba abscesu v místě vpichu, nadměrné zvětšení uzlin, kožní, podkožní či svalové komplikace (granulomy, lupoidní reakce, ...) a nakonec postižení orgánů jako při mimoplicní tuberkulóze.

Provádět kalmetizaci by se nemělo při horečnatých stavech, probíhající tuberkulóze, stavech se sníženou imunitou včetně lékově navozené imunodeficiencie, u HIV pozitivních jedinců,

těhotných žen (pokud to není nezbytně nutné), po jiném očkování, atd.

Důležité je také podotknout, že vlastní očkování nezabrání vzniku infekce, ale zabrání vzniku progresivních a závažných forem TBC.

V ČR se očkování provádí od roku 1948. O pět let později byla uzákoněna vakcinace novorozenců. V období let 1986 – 1993 některé kraje hromadné očkování novorozenců zrušili, jenomže došlo ke zvýšenému výskytu onemocnění. Z toho důvodu se od roku 1994 opět začalo očkovat plošně v celé ČR.¹

Bohužel od března roku 2009 ministerstvo zdravotnictví povinné přeočkování v 11 letech zrušilo. Důvodem je především vysoký výskyt komplikací (výše uvedené). Rodiče mají ale možnost na vlastní přání nechat potomka přeočkovat, vakcína je hrazená z veřejného zdravotního pojištění. Tento krok by ale mohl vést ke zvýšení výskytu TBC u lidí do 20 let, který byl v České republice doposud nízký.¹⁵

Dalším krokem ministerstva byla příprava vyhlášky v roce 2010, která by rušila i povinné očkování novorozenců. Důvodem je opět možnost poškození zdraví dítěte až jeho úmrtí. Tato vyhláška vešla v platnost 1. 11. 2010 a podle vyhlášky 537/2006 Sb. se povinnému očkování musí podrobit děti s vysokým rizikem nákazy (žijící v domácnosti s lidmi s či po TBC, s lidmi, kteří navštívili rizikovou oblast, ...). Toto se ale nelíbí především plicním lékařům, kteří navrhují, aby se plošné očkování zachovalo s tím, že by se posunulo na 7 až 12 měsíců věku dítěte, kdy už nehrozí takové nebezpečí vedlejších účinků¹¹.

Úspěšnost zmíněného očkování se ověřuje pomocí takzvané tuberkulinové zkoušky. Jedná se vlastně o alergickou reakci v místě vpíchnutí čištěné proteinové frakce tuberkulinu, připravené z kmene MbT RT 23. Vyrábí se v několika ředěních a pojmenované jsou podle jednoho z průkopníků – Mantouxův test či test dle Mantoux. Ve většině případů se aplikuje 0,1 ml

Mantoux II (2 jednotky PPD RT 23) na dorsální stranu levého předloktí (některá literatura uvádí pravé předloktí²). Jelikož se jedná o alergickou reakci opožděného typu, výsledky se odečítají až po 72 hodinách (reakci zprostředkovávají buňky imunitního systému a je třeba počkat, než jich do místa reakce infiltruje dostatek). Prvotní erytém a zduření se nepočítají jako projev alergie.

Po uvedených třech dnech dojde k odečtu a hodnotí se při tom velikost pupence. Většinou při průměru nad 5 mm je reakce hodnocena jako pozitivní. To značí, že se daný jedinec s patogenem setkal, ať už očkováním nebo primární infekcí. Nadměrné reakce by měly být důvodem k dalšímu vyšetření kvůli možnosti probíhajícího onemocnění.

Výsledky tuberkulinových testů je také možné použít jako podklady pro epidemiologické studie na výskyt infekce a úspěšnost v boji proti TBC.¹

Provedení testu je kontraindikováno ve stejných případech jako u BCG vakcinace. Při užívání antihistaminik a imunopreparátů je třeba tyto léky vysadit určitou dobu před prováděním testu (2 dny - 3 týdny). A to z důvodu nežádoucího utlumení požadované alergické reakce.⁹

A dalším možným způsobem ochrany před infekcí či propuknutím choroby je chemoprofylaxe. Většinou se jedná o monoterapii isoniazidem, a to hlavně u osob se zvýšeným rizikem nákazy nebo u osob nakažených s dosud neprobíhající chorobou (kojenci přicházející do styku s bacilonosičem - imunita vzniká až po 3 - 6 měsících po kalmetizaci; při zvýšené tuberkulinové reakci; imunodeficitní jedinci; ...), po dobu 6 měsíců. Před zahájením léčby je však nutné vyloučit aktivní onemocnění TBC.¹ Dále je třeba sledovat jaterní testy a spolu s isoniazidem podávat preventivně pyridoxin.

Tento režim by podle některých odborníků měl být přehodnocen a upraven kvůli některým toxickým účinkům isoniazidu.⁹

1.5 Léčba, léčebné režimy

Terapie tuberkulózy je poměrně náročná. To je dáno především vlastnostmi mykobakterií, které mají dlouhý cyklus dělení. Z tohoto důvodu se délka léčby prodlužuje z řádu dní a týdnů (jako u normálních bakterií) na měsíce a roky. Existuje také systém DOTS (Directly Observed Therapy Short course) vydaný WHO, který zajišťuje trvalou bakteriální negativizaci sputa (minimálně 85% nemocných léčených poprvé) a napomáhá zabránit rozvoji primární rezistence.

Léčbu lze definovat i několika principy:

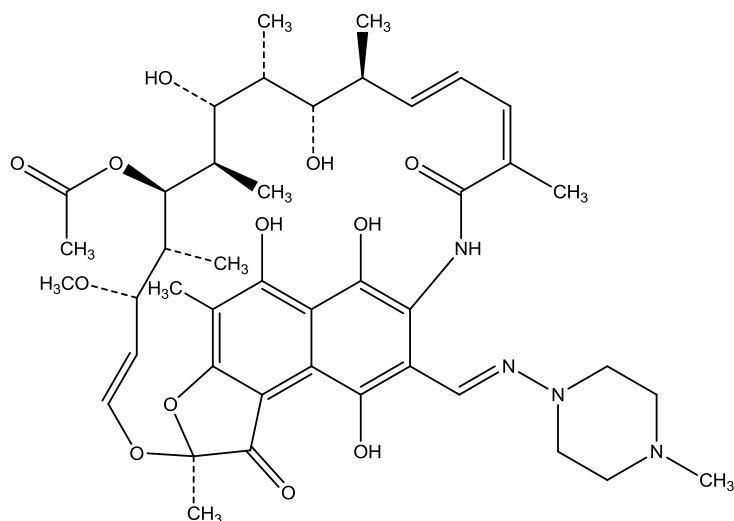
1. Kombinace AT - umožnění pokrytí různých typů mykobakterií v rámci jejich metabolické aktivity.
2. Dvoufázová terapie - Nejprve v iniciální fázi by mělo dojít během dvou měsíců především k debacilizaci nemocného pomocí kombinace 3 - 4 AT. Následuje pokračovací fáze trvající 4 -7 měsíců. Která by měla vést ke sterilizaci (úplné eradikaci) mykobakterií pomocí kombinace 2 AT.
3. Denní nebo intermitentní léčba - léky lze podávat denně nebo 2 - 3 x týdně s pravidelnou kontrolou.
4. Kontrolovaná léčba - podávání léčiv pod dohledem - prevence selhání léčby (možnosti vzniku sekundární rezistence.²

1.5.1 Léčiva

RIFAMPICIN

Jedná se o ansamycinové ATB a řadí se mezi AT 1. linie. Je to polosyntetický derivát rifamycinu B (z mikroorganismu *Nocardia mediteranei*).¹⁶ Působí baktericidně na intra- i

extracelulárně uložené mykobakterie a to inhibicí DNA-dependentní RNA polymerasy (na savčí enzym takto nepůsobí).¹



Z chemického hlediska se jedná o makrocykl obsahující laktamovou skupinu s aromatickými částmi molekuly (naftalenová jádra) v ansa-uspořádání. Dále jsou pro účinek důležité fenolické či karbonylové skupiny na již zmíněném naftalenovém jádře v polohách 6 a 9 a nakonec dvě polární kyslíkaté skupiny na makrocyklu. Substituce v poloze 8 a 9 příznivě ovlivní farmakokinetiku a účinek.¹⁶

Vstřebává se dobře a prostupuje i do tělesných tekutin (jeden z vedlejších účinků je, že barví moč, pot, sliny, slzy do oranžova až červená). Z dalších nežádoucích účinků jsou to zažívací obtíže, poškození ledvin či CNS. Je třeba dát pozor na lékové interakce, kterých je poměrně hodně (PAD, antikoagulancia, kontraceptiva, glukokortikoidy, ...). Lze ho podávat i v těhotenství.¹

RIFABUTIN

Jedná se taktéž o ansamycinové antibiotikum, které se v dnešní době dostává do popředí.⁷ Mechanismus účinku je stejný

disulfiramový efekt, je proto třeba během léčby vynechat alkohol.^{1,17}

PYRAZINAMID

Opět jde o léčivo první řady. Ačkoliv byl syntetizován již během třicátých let 20. století, jeho antituberkulotickou aktivitu se podařilo objevit až v roce 1952.¹⁸

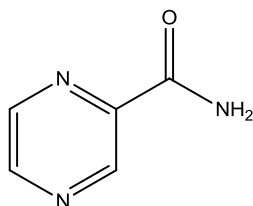
Působí baktericidně a to především na mykobakterie fagocytované s nízkou metabolickou aktivitou (perzistory), aktivita je tedy vázaná na kyselé pH (5 - 6). Proto je výhodné ho podávat ihned od začátku léčby, čímž se sníží doba do negativizace sputa.

Nevýhodou je hepatotoxicita, proto je třeba hlídat jaterní funkce a pravidelně je kontrolovat.¹

Syntéza této látky vychází z kondenzace glyoxalu a o-fenylendiaminu. Následně dojde k oxidaci produktu (chinoxalinu) na pyrazin-2,3-karboxylovou kyselinu.

V přítomnosti mědi ve formě bronzu dochází k dekarboxylaci. Posledním krokem je esterifikace a aminolýza.¹⁹

Modifikací struktury s cílem zlepšit vlastnosti není tolik. Pyrazinové jádro je pro účinek nezbytné. Dá se však jádro substituovat (halogenace, alkylace, ...).¹⁶



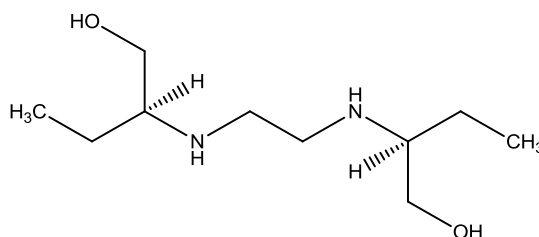
Mechanismus účinku spočívá v transportu pyrazinamidu jako proléčiva do bakterie, kde dojde pomocí enzymu nikotinamidasy k hydrolýze a vzniku aktivního metabolitu - kyseliny pyrazinkarboxylové. Ta snižuje intracelulární pH, což vede k narušení protonového gradientu, který je nezbytný pro syntézu ATP. Buňka tak nemá dostatek energie pro život a

odumírá. Jak bylo zmíněno výše, pro účinek je důležité kyselé pH. A to proto, že do buňky pasivním transportem proniká pouze neionizovaná molekula kyseliny pyrazinkarboxylové. Při pH vyšším dojde k ionizaci a takto vzniklá nabitá molekula do buňky již nepronikne.¹⁸

ETHAMBUTOL

Je to syntetické AT, které má bakteriostatický účinek. Je poměrně dobře snášené s minimem nežádoucích účinků a zároveň je vhodné jako lék volby u různých hepatopatií. Akorát je třeba dbát na řádnou kontrolu očí a barvocitu (jak před začátkem podávání, tak i v průběhu), kterou může účinná látka poškodit.¹

Pro účinek je důležitá stereoizomerie, účinný je totiž pouze *S*, *S*-(+)-izomer (pravotočivý). Ty ostatní jsou neúčinné až toxické.



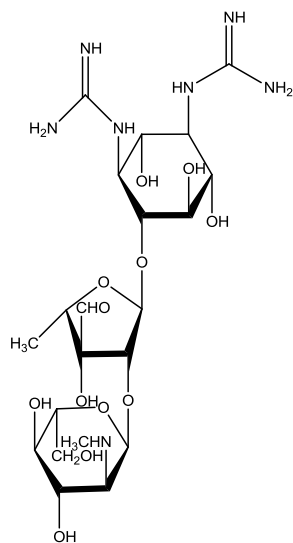
Mechanismus účinku spočívá v polymerizaci arabinosy v buněčné stěně, což vede k její desintegraci.

Dobře se vstřebává a působí i na mykobakterie rezistentní na isoniazid.¹⁷

STREPTOMYCIN

Jedná se o injekční ATB získané z aktinomycet rodu *Streptomyces griseus*, působící baktericidně na extracelulárně uložené mykobakterie. Při užívání je třeba dávat pozor na ototoxicitu a nefrotoxicitu a sledovat renální funkce.¹ Strukturně se jedná o silnou trojsytnou bázi a pro účinek je

v rámci struktury nezbytný aminocukr, který bývá také terčem možných obměn pro prodloužení doby působení (z toho důvodu, že toto místo napadají obranné mechanismy bakterií).

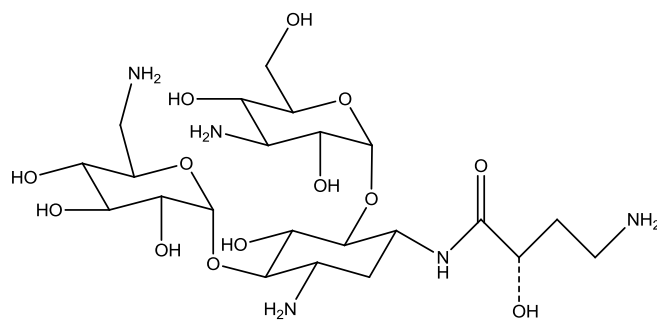


Mechanismus účinku je založen na inhibici proteosyntézy.¹⁶

Následující látky se obvykle řadí mezi antituberkulotika 2. linie, ale podle nejnovějšího doporučení Světové zdravotnické organizace by se některá z nich měla podávat i jako léčiva 1. řady (kanamycin, amikacin, kapreomycin, moxifloxacin, levofloxacin, ofloxacin).⁷

KANAMYCIN, AMIKACIN, KAPREOMYCIN

Jedná se o aminoglykosidová antibiotika, stejně jako je streptomycin. Jsou také oto- a nefrotoxická, ale ne tolik. Zároveň mezi nimi existuje zkřížená rezistence.¹



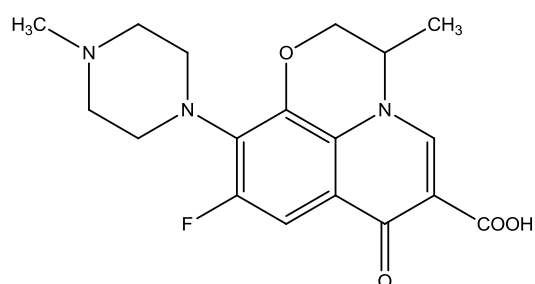
amikacin

OFLOXACIN, LEVOFLOXACIN

Zde se jedná o chinolony II. generace. Levofloxacin je levotočivý izomer, který je oproti ofloxacinu dvakrát účinnější a méně toxický.

Mechanismus účinku je dán inhibicí bakteriální DNA gyrazy (topoisomerasy II) a topoisomerasy IV. Což znemožňuje správné řetězení DNA během dělení a tím dojde k zastavení množení bakterií a jejich usmrcení.

Pro účinek je důležitá struktura.¹⁶

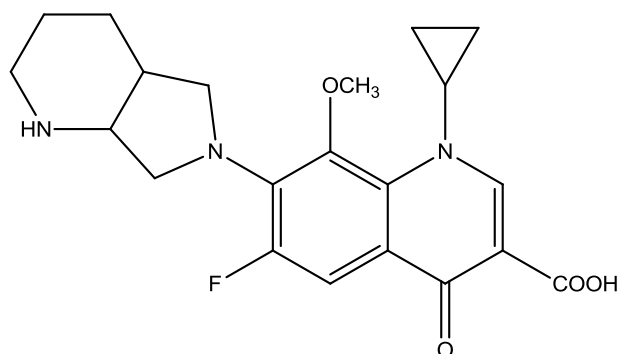


ofloxacin

Mezi nežádoucí účinky lze zařadit nauzeu, zvracení, bolesti hlavy, méně často pak křeče, halucinace a vyrážky.¹⁷

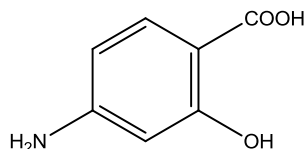
MOXIFLOXACIN

Tento chinolon IV. generace má podobné vlastnosti jako předchozí dva. Rozdílem pak je širší antibakteriální spektrum a vyšší účinnost. Jinak se řadí také mezi rezervní chemoterapeutika.¹⁶



PARAAMINOSALICYLOVÁ KYSELINA (PAS)

Jedno z prvních antituberkulotik vůbec.
Pro zachování antituberkulotického účinku je struktura nezbytná. Při pokusech o strukturní obměnu se nepodařilo získat látku účinnější.

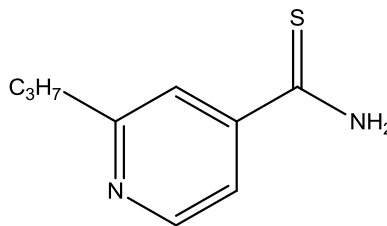
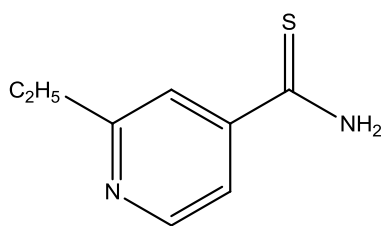


Mechanismus účinku není úplně jasný. Předpokládá se, že dochází k chelataci iontů železa, které jsou pro metabolismus bakterií nezbytné.

Výhodou je nízká cena, nevýhodou naopak nutnost vysokých dávek (12 - 16 gramů denně) a snadný vznik rezistence.¹⁶

ETHIONAMID, PROTHIONAMID

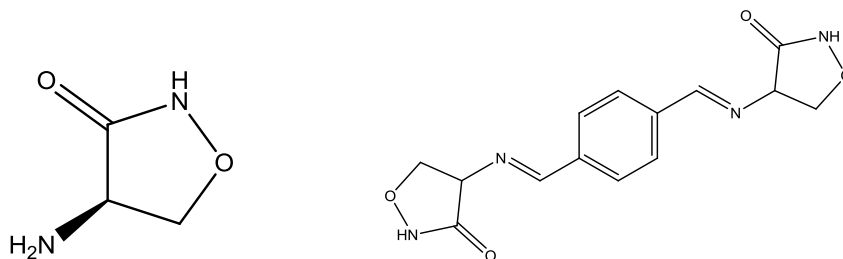
Tato mykobakteriostaticky působící léčiva patří mezi deriváty isonikotinové kyseliny.



Mechanismus účinku stojí na poškození syntézy kyseliny mykolové, která je esenciální pro správnou funkci buněčné stěny.¹⁶

Mezi NÚ patří především zažívací obtíže a neurotoxicita.¹

CYKLOSERIN, TERIZIDON



Jedná se o antibiotikum produkované aktinomycetami rodu *Streptomyces orchidaceus*, terizidon pak vlastně tvoří dvě molekuly cykloserinu. Jsou to bakteriostatické preparáty, které inhibují syntézu buněčné stěny. Nežádoucí účinky jsou především centrálně neurotoxické a jako prevence je vhodné podávat meprobamát.¹

1.5.2 Léčebné režimy

Většinou se léčba zahajuje 2 měsíci na uzavřeném oddělení TRN, kde se lékaři snaží o debacilizaci pacienta (negativizaci sputa). Této fázi se také říká iniciální. Poté, když už pacient není infekční pro okolí, tak léčba pokračuje ambulantně. Proto také název pokračovací fáze. Její délka pak závisí na závažnosti onemocnění a míře spolupráce pacienta. Při zjištění rezistence na nějaké antituberkulotikum první linie je nutné provést testy citlivosti a použít léčiva z druhé řady, které se vybírají individuálně dle konkrétního pacienta.

Příklady kategorií závažnosti onemocnění a režimů léčby ukazují následující tabulky^{1,4}:

1. kategorie	Nová onemocnění plicní TBC mikroskopicky pozitivní, závažné formy plicní a mimoplicní TBC (bakteriologicky ověřené)
2. kategorie	Recidivy, přerušení či neúspěch léčby
3. kategorie	Méně závažné formy
4. kategorie	Chroničtí pacienti s TBC (mikroskop. pozitivní i po ukončení léčby v 2. kategorii)

Tab. 4 - Kategorie pro určení typu režimu léčby

Iniciální fáze	Doba	Pokračovací fáze	Doba
STR, INH, PZA, RMP	2 měsíce	INH, RMP	4 měsíce
EMB, INH, PZA, RMP			

Tab. 5 - Krátkodobý režim (vhodný pro 1. kategorii)

Iniciální fáze	Doba	Pokračovací fáze	Doba
STR, INH, RMP, PZA	2 měsíce	STR, INH, PZA (intermitentně)	6 měsíců
EMB, INH, RMP, PZA		EMB, INH	
STR, INH, RMP		INH, RMP	7 měsíců

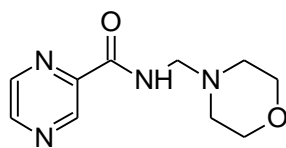
Tab. 6 - Zkrácený režim (vhodný pro 2. a 3. kategorii)

Iniciální fáze	Doba	Pokračovací fáze	Doba
STR, INH, EMB	2 měsíce	INH, EMB	10 měsíců
STR, INH, PZA		STR, INH	
EMB, INH, PZA			

Tab. 7 - Standardní režim

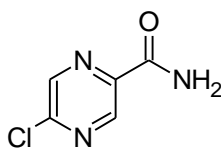
Zkratky: STR - Streptomycin, INH - Isoniazid, RMP - Rifampicin, PZA - Pyrazinamid, EMB - Ethambutol

1.6 Deriváty pyrazinamidu s publikovanou antimykobakteriální aktivitou



morfazinamid

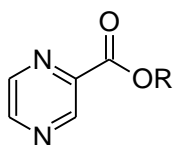
Na tomto místě je potřeba zmínit v první řadě morfazinamid. Tato látka je prekurzorem pyrazinamidu. V bakteriální buňce se rozkládá na pyrazinamid, formaldehyd a morfolin. Jeho antimykobakteriální aktivita je totožná s pyrazinamidem, nicméně je aktivní i v neutrálním prostředí, a též proti tzv. bakteriím jako je *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris* nebo *Staphylococcus aureus*. Tento jev je patrně způsoben uvolňováním toxického formaldehydu, jelikož morfolin tuto aktivitu postrádá. Zajímavý je fakt, že *in vitro* studie ukazují vyšší aktivitu morfazinamidu nežli pyrazinamidu²⁰, *in vivo* modely pak říkají pravý opak²¹. Pravděpodobné vysvětlení tohoto děje je patrně méně výhodná farmakokinetika než má pyrazinamid.



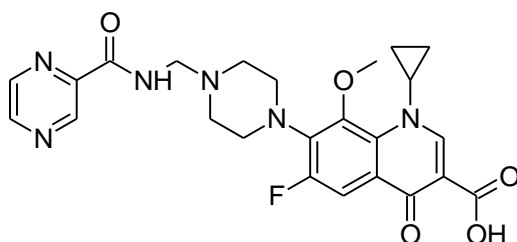
5-chloropyrazinamid

Druhým důležitým analogem, který přispěl k významnému posunu v popisu mechanismu účinku pyrazinamidu je 5-chloropyrazinamid. Bylo objasněno, že zmíněná látka působí nejspíše jako inhibitor enzymu FAS-1²², tedy odlišně od pyrazinamidu samotného. Důkazem je zachování antimykobakteriální aktivity proti pyrazinamid rezistentním kmenům. Zbývá ještě vysvětlit, zda dochází k metabolické

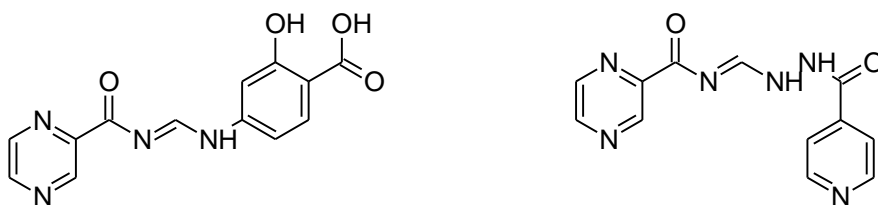
přeměně tohoto amidu na karboxylovou kyselinu stejně tak, jak tomu je u pyrazinamidu. Dalším povzbuzujícím zjištěním je fakt, že 5-chlorpyrazinamid je aktivní i proti *Mycobacterium smegmatis*, kdežto pyrazinamid samotný nikoliv²³.



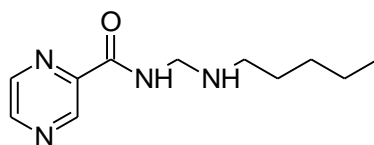
Další kapitolou aktivních derivátů pyrazinamidu jsou jeho estery. K jejich vývoji došlo na základě objevu aktivity pyrazinkarboxylové kyseliny proti pyrazinamid rezistentním kmenům. Ke tvorbě esterů bylo přistoupeno z důvodu zvýšení jejich biologické dostupnosti a jejich *in vitro* testování přineslo naději, že jejich aktivita bude dobrá²⁴. Nicméně selhaly *in vivo* experimenty, pravděpodobně díky špatné stabilitě těchto látek v organismu.



V nedávné době byla publikována skupina derivátů pyrazinamidu vzniklá Mannichovou kondenzační reakcí²⁵.

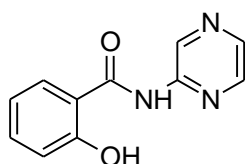


Slibnou aktivitu i relativně široké terapeutické okno při testování *in vitro* vykazují substituované pyrazinkarbonyliminomethyl deriváty²⁶.



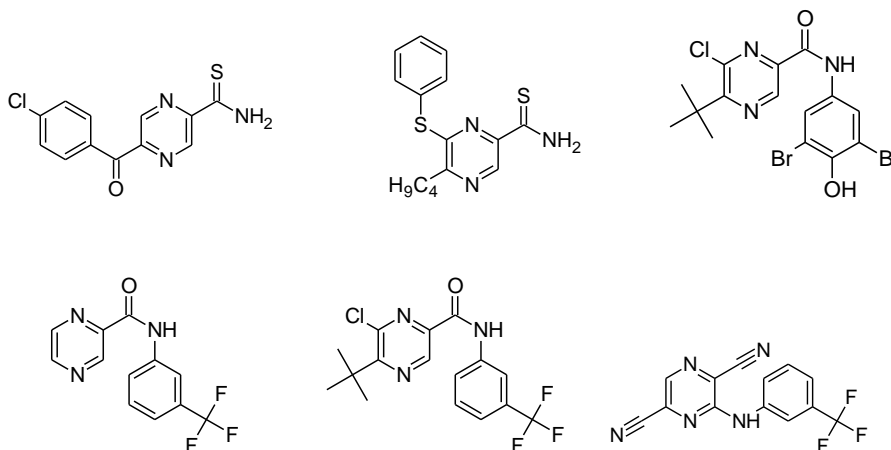
Podstatně horší aktivitu opublikoval Chung a kol. u substituovaných *N*-aminomethyl derivátů pyrazinamidu, respektive 5-methylpyrazinamidu²⁷.

Zajímavé je, že všechny publikované látky mají podobnou podstatnou část molekuly.



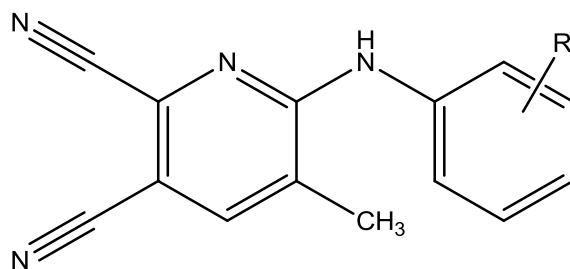
Místo v této kapitole najdou i deriváty salicylanilidů. U těchto látek je zajímavý fakt, že nejaktivnější ze série syntetizovaných derivátů mají v anilidové části molekuly substituci pyrazinylem. Tato analogie přivádí k otázce, zda je předpokládaným mechanismem účinku těchto látek právě inhibice signální kinasy, nebo zda nejde o analogii mechanismu účinku např. 5-chlorpyrazinamidu.

A posledními, nikoliv však vřak nejméně významnými jsou analoga pyrazinamidu připravená Doležalem a kol., ze kterých jsou vybrány látky se slibnou aktivitou^{28,29}.



2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem potencionálních biologicky aktivních sloučenin ze skupiny derivátů pyrazinu.^{30,31} Moje diplomová práce je součástí tohoto dlouhodobého úkolu.



Obecný vzorec syntetizovaných látek

- Syntéza derivátů pyrazinu, konkrétně na základě již nabytých znalostí o chemii pyrazinového jádra připravit sérii analog pyrazinamidu s obecnou strukturou arylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu
- Charakterizace látek pomocí dostupných analytických metod (t. t., R_f , $\log P$, NMR, IČ, elementární analýza)
- Předat připravené deriváty na testování účinnosti *in vitro*
- Pokusit se v případě pozitivních výsledků biologického hodnocení najít vztah mezi strukturou a účinkem

3. METODICKÁ ČÁST

3.1 Chemická část

V praktické části jsem se zaměřil na syntézu derivátů jednoho z antituberkulotik první linie, které má stálé využití především v iniciální fázi léčby TBC. Jedná se o pyrazinamid.

Zvolenou metodikou je aplikace v minulosti úspěšně provedených syntéz analogů pyrazinamidu, které obsahují kromě pyrazinového ještě další aromatické jádro.³²

Jako výchozí pro moji diplomovou práci byl vybrán 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril ze skupiny dikarbonitrilů, které syntetizovali T. Takematsu s kolegy jako potencionální herbicidy.³³

Jeho syntéza je podobná syntéze pyrazinamidu s tím rozdílem, že výchozí látky jsou různé a není třeba zde oxidovat benzenové jádro, to zde nahradily dvě nitrilové skupiny. Chlor v poloze 5 pak slouží jako místo pro substituce. V mém případě jsem použil jako substituenty aromatické aminosloučeniny, čímž vznikly sekundární aminy.

Syntéza produktů probíhala v mikrovlnném zařízení CEM Discover. Použití mikrovln, což je součást elektromagnetického vlnění s vlnovou délkou 1 cm až 1 m (hlavně se používá frekvence 2450 MHz), výrazně usnadní a urychlí průběh reakce. Mikrovlny totiž snadno a rychle mění polaritu elektromagnetického pole. Takto vzniklé oscilace působí na polární látku a rozkmitáváním jí dodávají energii. To se může projevit rozrušováním vazeb a zvyšováním pohybové energie molekul. Zvyšuje se tak vlastně i teplota. Použitý přístroj je vybaven takzvaným fokusovaným polem, což je výhodné, neboť mikrovlny jsou směřovány přímo do reakční směsi umístěné ve vlnovodu. Dalším pozitivním aspektem použité metody je i úspora energie a rozpouštědel.³⁴ A při použití autosampleru

(např. Explorer 24) je možné nechat běžet reakce i bez nutného dozoru - využití v kombinatoriální chemii.

Jako rozpouštědlo jsem používal metanol a do směsi jsem přidával ještě pyridin (vychytávání vznikajícího chlorovodíku). Směs jsem zahříval při teplotě 150°C, tlaku 15 kPa a výkonu 100 W po dobu 20 minut.

Nakonec následovalo dělení reakční směsi po mikrovlnné syntéze. Při tomto kroku bylo použito přístroje CombiFlash R_f. Jedná se o preparativní chromatograf založený na metodě „flash“ chromatografie. Je to metoda podobná klasické sloupcové chromatografii. Rozdíl je však v tom, že se používá menších plastových předplněných kolon a mobilní fáze prochází sloupcem pod tlakem. Tato metoda je tak mnohem rychlejší, úspornější a zdraví méně škodlivá. Flash chromatografie je rychlá forma preparativní kolonové chromatografie, která je založená na optimalizovaných již zabalených kolonách, skrz které je pumpováno rozpouštědlo vysokou rychlostí/ velkým průtokem. Jedná se o jednoduchý a ekonomický přístup v preparativní chromatografii. Technika byla publikována v časopise Organic Chemistry již v roce 1978 jako alternativa k jednoduché kolonové chromatografii. Pro čištění organických sloučenin je flash chromatografie rychlou a levnou technikou. Byla vyvinuta v roce 1978 W. C. Stillsem a v dnešní době se jedná o populární metodu čištění a separace. Stále více se otevírá širší možnost využití této metody pro separaci při použití reverzních fází. Flash chromatografie využívá plastové kolony naplněné nějakou formou pevného základu, obvykle se jedná o silikagel, a vzorku, který se dělí na povrchu silikagelu. Zbytek sloupce je naplněn mobilní fází, a s pomocí tlaku tak umožňuje vzorku projít kolonou a rozdělit se. Rychlost průtoku může být od 10 ml/min až po 300 ml/min (v závislosti na tlaku). Flash chromatografie zpočátku využívala tlaku vzduchu, ale dnes využívá pump k urychlení separace. Tato technika je považována za techniku využívající nízký až

střední tlak a může být určena pro separace od několika miligramů po mnoho desítek až stovky gramů.^{35, 36}

3.2 Biologické hodnocení

Antimikrobiální a antifungální testy provedeny na Katedře biologických a lékařských věd (paní Dufková), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

Připravené deriváty pyrazinu byly testovány na antibakteriální aktivitu *in vitro*, za použití mikrodilučního bujónového testu (metoda: mikrodiluční bujónová v destičkách - M27A-M1 (200 + 10)).

TESTOVANÉ KMENY (kód, číslo)	
1. SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08	5. EC <i>Escherichia coli</i> CCM4517
2. MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 Methicilin rezistentní	6. KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08
3. SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	7. KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL pozitivní
4. EF <i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	8. PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961

Tab. 8 - Kmeny bakterií použitých v testech

Použité médium: Mueller Hintonův bujon
Délka inkubace: 24 - 48 h
Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra
Odečítání: vizuální / fotometrické (OD 540 nm);
MIC = IC₈₀ (80 % inhibice kontroly)
Teplota: 35°C

Připravené deriváty pyrazinu byly testovány na antifungální aktivitu *in vitro*, za použití mikrodilučního bujónového testu.

TESTOVANÉ KMENY (kód, číslo)	
1. CA1 <i>Candida albicans</i> ATCC 44859	5. TA <i>Trichosporon asahii</i> 1188
2. CT <i>Candida tropicalis</i> 156	6. AF <i>Aspergillus fumigatus</i> 231
3. CK2 <i>Candida krusei</i> E28	7. AC <i>Absidia corymbifera</i> 272
4. CG <i>Candida glabrata</i> 20/I	8. TM <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445

Tab. 9 - Kmeny hub a plísňů použité pro testování

Použité médium: RPMI 1640 s glutaminem.

Délka inkubace: 24 - 48 h (u TM 72 h - 120 h)

Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra

Odečítání: vizuální / fotometrické (OD 540 nm);

MIC = IC₈₀, u vláknitých hub IC₅₀ (inhibice kontroly)

pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165 M)

Teplota: 35°C

Antituberkulotické testy provedeny v Krajské nemocnici v Pardubicích, Oddělení klinické mikrobiologie (MUDr. Svobodová).

Látky byly testovány *in vitro* na účinnost proti *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* I (divoký kmen), *M. kansasii* PKG 8, *M. avium* No. 80/72 a *M. avium* 152/73 na tekuté Šulově půdě zředovací metodou ve srovnání s pyrazinamidem (PZA) při pH 5,6. Testované látky byly rozpuštěny v

dimethylsulfoxidu v koncentracích 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 a 2 ug/ml. Výsledky byly odečítány po dvou a třech týdnech (viz Experimentální část).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a chemikálie

U použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty, rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna obvyklým způsobem (p. Věnceslava Hronová).

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck, Silica gel 60 F254, za použití vyvíjecí soustavy toluen - aceton (1:1), hexan - ethyl-acetát (1:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Pro syntézu sloučenin byl použit mikrovlnný reaktor CEM Discover s autosamplerm Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA). Pro nastavení podmínek, kontrolu průběhu reakcí a záznam procesu byl použit software CEM's Synergy™.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím a za použití preparativní chromatografie na přístroji CombiFlash® Rf (Teledyne Isco, Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Používali jsme kolony ručně plněné silikagelem 0.040-0.063 mm (Merck, DE). Jako mobilní fázi jsme používali směs ethyl-acetátu a hexanu, využívali jsme gradientovou eluci.

Teploty tání byly stanoveny v kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP3 (Bibby Sterling LTD, UK) a jsou nekorigované.

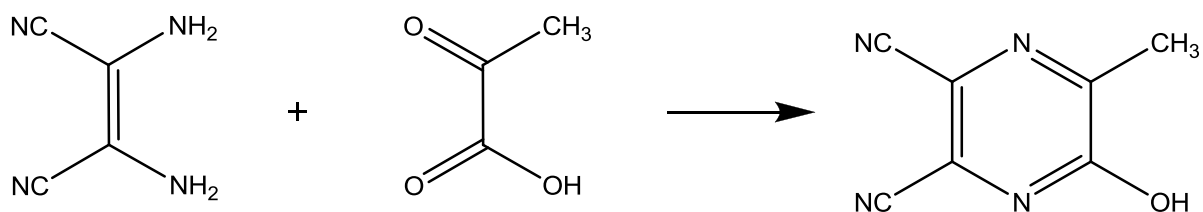
Elementární analýzy byly provedeny pomocí analyzátoru EA 1110 CHNS Analyzer (Carlo Erba) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (p. Věnceslava Hronová).

Infračervená spektra nově připravených sloučenin byla získána metodou zeslabené totální reflexe - ATR (Attenuated Total Reflectance). Spektra byla měřena pomocí spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Nicolet - Thermo Scientific, USA) na Katedře anorganické a organické chemie (p. Hana Jílková).

^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektra byla změřena pomocí spektrometru Varian Mercury-VxBB 300 spectrometer (299.95 MHz pro ^1H a 75.43 MHz pro ^{13}C ; Varian Corp., Palo Alto, CA, USA) na Katedře anorganické a organické chemie (doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc., interpretoval i získaná spektra). Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako signály rozpouštědla (2.49 pro ^1H , 39.7 pro ^{13}C v DMSO- d_6).

Log P a Clog P sloučenin byly vypočteny pomocí programu CS ChemBioOffice Ultra, verze 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

4.2 Příprava 5-hydroxy-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu



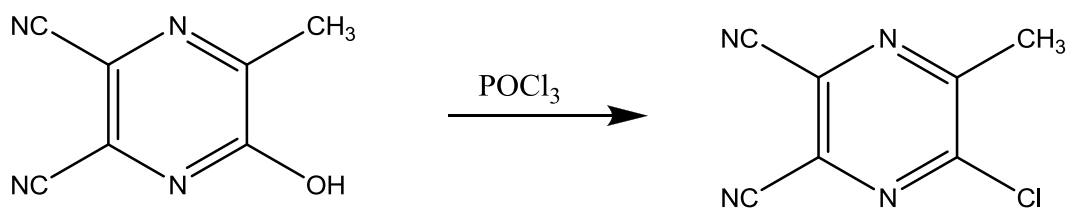
Jedná se o kondenzaci dvou výchozích látek a to kyseliny pyruvové a diaminomaleodinitrilu. Obě uvedené látky se rozpustily v metanolu a poté se postupně přidávala 15% kyselina chlorovodíková. Tato směs se nechala reagovat za stálého míchání po dobu tří hodin při laboratorní teplotě. Poté se nechaly odpařit 2/3 rozpouštědla a přidala se horká destilovaná voda v množství 80 ml. Nechal se doodpařit zbylý metanol a vodný roztok se poté nechal v lednici při nízké teplotě krystalizovat. Následovalo odsátí krystalů a sušení výsledného produktu.

Úspěšnost reakce se ověřila pomocí TLC s UV detekcí při vlnové délce 254 nm. Mobilní fází byla směs benzínu, ethyl-acetátu a kyseliny octové v poměru 4:2:1.³⁷

Reagencie: - 2,2 g kys. pyruvové (0,025 mol)
- 2,7 g diaminomaleodinitrilu (0,025 mol)
- 60 ml methanolu
- 10 ml 15% kys. chlorovodíkové

Produkt: - sumární vzorec - C₇H₄N₄O
- molekulová hmotnost - 160,14
- světlá, krystalická látka

4.3 Příprava 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu



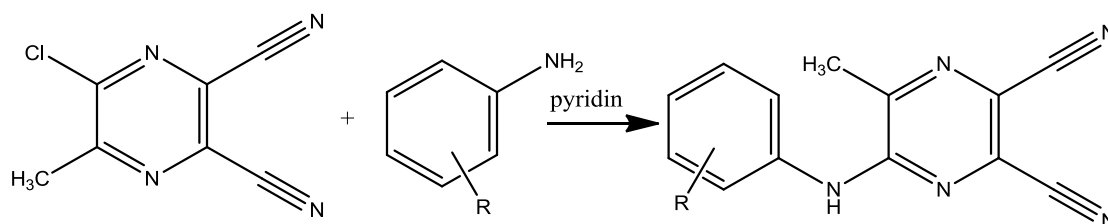
V této reakci dochází k záměně hydroxylové skupiny za chlor pocházející z chloridu fosforylu. K chloridu se v baňce postupně přimísil produkt vzniklý předchozí reakcí (5-hydroxy-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril) a celá reakční směs se ochladila na 0°C pomocí ledu smíšeného s chloridem sodným. Nakonec se do reakce po kapkách přidal pyridin. Po ukončení exotermní reakce se celá směs začala zahřívát a za stálého míchání se nechala reagovat při 90°C po dobu 2 hodin. Přebytečný POCl₃ se nechal odpařit a zbylá směs se 3 - 4 krát extrahovala toluenem. Spojené toluenové podíly se odpařily do sucha. Vzniklá krystalická látka se překrystalizovala z chloroformu. Úspěšnost reakce byla opět ověřena pomocí chromatografie na tenké vrstvě s UV detekcí. Jako mobilní fáze byla tentokrát použita směs benzínu a ethylesteru kyseliny octové v poměru 2:1.³⁷

Reagencie: - 2,33 g 5-hydroxy-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (0,015 mol)
- 8,94 g chloridu-fosforylu (0,060 mol)
- 1,60 g pyridinu (0,020 mol)

Produkt: - sumární vzorec - C₇H₃ClN₄
- molekulová hmotnost - 178,85
- světle hnědá krystalická látka

4.4 Obecný postup přípravy konečných produktů

Do speciální zkumavky určené pro přístroj CEM Discover se navážilo přibližně 0,2 g výchozí látky (5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu) a k tomu vybraný aromatický amin (v poměru 1:3 mmol). Přidalo se rozpouštědlo a pyridin (vychytání vznikajícího chlorovodíku) a celá směs se nechala za výše uvedených podmínek reagovat.



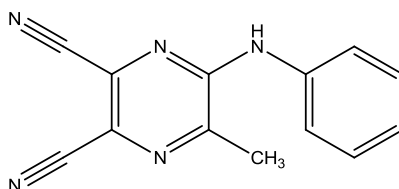
Po ukončení procesu se provedla TLC pro kontrolu úspěšnosti reakce a reakční směs v baňce byla naadsorbována na silikagel. Poté se odpařilo rozpouštědlo a ze silikagelu se připravila kolona k flash chromatografii.

Pro gradientovou eluci byl použit hexan a ethyl-acetát. Dělení začínalo na 100 % hexanu a postupně se zvyšoval poměr ethyl-acetátu.

Nakonec byla opět provedena tenkovrstvá chromatografie (vyvíjecí soustava benzín : ethyl-acetát v poměru 4:3) pro ověření produktu a odpařeno rozpouštědlo. Výtěžek se zvažil a použil pro další testy na ověření totožnosti a účinnosti.

4.5 Analytická data konečných produktů

4.5.1 5-methyl-6-(fenylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 585/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₉N₅

m. h. 235,24

t. t. = 167,0 - 172,2 °C (v lit. t. t. = 172,0 - 173,0 °C)³⁷

výtěžek - 0,06 g (32% teoretického výtěžku)

R_f = 0,25

IČ spektrum (cm⁻¹): 3370 (NH), 2924 (CH₃) 2241 (CN), 1621, 1550, 1490, 1403, 1370 (pyrazin)

CHN: % teor.: C: 66,37; H: 3,86; N: 29,77

% prakt.: C: 66,28; H: 3,69; N: 29,45

logP = 3,16

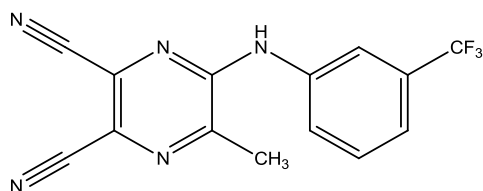
ClogP = 2,40

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.55 (1H, bs, NH), 7.63-7.56 (2H, m, H2', H6'), 7.46-7.37 (2H, m, H3', H5'), 7.24-7.16 (1H, m, H4'), 2.60 (3H, s, CH₃)

¹³H NMR (75 MHz, DMSO)

δ 151.2, 148.4, 137.8, 129.5, 128.9, 125.4, 123.2, 119.3, 115.5, 114.7, 21.7

4.5.2 5-methyl-6-((3-(trifluormethyl)fenyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 628/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₄H₈F₃N₅

m. h. 303,24

t. t. = 138,1 - 148,9 °C

výtěžek - 0,06 g (40% teoretického výtěžku)

R_f = 0,59

IČ neměřeno

CHN % teor.: C: 55,45; H: 2,66; N: 23,09; F: 18,80

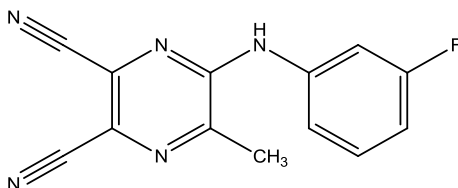
logP = 4,08

ClogP = 3,29

¹H NMR neměřeno

¹³C NMR neměřeno

4.5.3 5-((3-fluorfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 619/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{13}H_8FN_5$

m. h. 253,23

t. t. = 206,0 – 207,9 °C

výtěžek – 0,06 g (29% teoretického výtěžku)

$R_f = 0,24$

IČ spektrum (cm^{-1}): 3373 (NH), 2918 (CH_3) 2235 (CN), 1618, 1550, 1494, 1404, 1370 (pyrazin)

CHN: % teor.: C: 61,66; H: 3,18; N: 27,66 F: 7,50

% prakt.: C: 62,01; H: 3,41; N: 27,95

$\log P = 3,32$

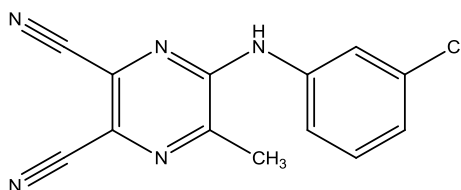
$Clog P = 2,54$

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.65 (1H, bs, NH), 8.43–7.65 (4H, m, H1', H4', H5', H3'), 2.60 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 154.8, 146.4, 130.5, 129.2, 128.8, 125.3, 123.1, 117.4, 115.7, 114.7, 21.2

4.5.4 5-((3-chlorfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 620/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₈ClN₅

m. h. 269,69

t. t. = 175,4 - 178,1 °C

výtěžek - 0,05 g (23% teoretického výtěžku)

R_f = 0,11

IČ spektrum (cm⁻¹): 3331 (NH), 2962 (CH₃) 2233 (CN), 1649, 1554, 1478, 1401 (pyrazin)

CHN: % teor.: C: 57,90; H: 2,99; N: 25,97; Cl: 13,15

% prakt.: C: 58,13; H: 3,45; N: 25,88

logP = 3,72

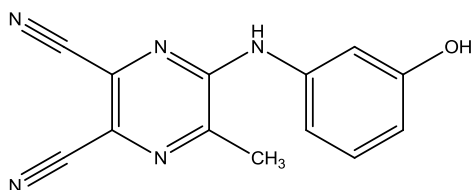
ClogP = 3,11

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.60 (1H, bs, NH), 7.93-7.05 (4H, m, H1', H4', H5', H3'), 2.60 (3H, s, CH₃), směs

¹³H NMR (75 MHz, DMSO)

δ 154.8, 146.4, 130.5, 129.2, 128.8, 125.3, 123.1, 117.4, 115.7, 114.7, 21.2

4.5.5 5-((3-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 621/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₉N₅O

m. h. 251,24

t. t. = 109,4 - 111,7 °C

výtěžek - 0,18 g (64% teoretického výtěžku)

R_f = 0,19

IČ spektrum (cm⁻¹): 3360 (NH), 2956 (CH₃) 2235 (CN), 1592, 1547, 1467, 1397, 1258 (pyrazin)

CHN % teor.: C: 62,15; H: 3,61; N: 27,87; O: 6,37

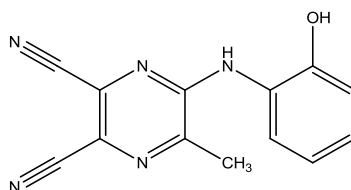
logP = 2,77

ClogP = 1,73

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.65 (1H, bs, NH), 7.92-6.81 (5H, m, H1', H3', H4', H5', H6'), 5.0 (1H, s, OH), 2.60 (3H, s, CH₃), směs produktu a výchozích látek

¹³H NMR (75 MHz, DMSO) neměřeno

4.5.6 5-((2-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 622/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₉N₅O

m. h. 251,24

t. t. = 214,9 - 218,0 °C

výtěžek = 0,14 g (50% teoretického výtěžku)

R_f = 0,33

IČ spektrum (cm⁻¹): 3401-3300 (NH, OH), 2954 (CH₃) 2234 (CN), 1613, 1550, 1520, 1459, 1399 (pyrazin)

CHN % teor.: C: 62,15; H: 3,61; N: 27,87; O: 6,37

logP = 2,77

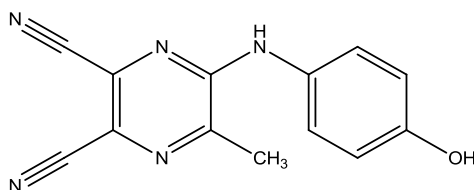
ClogP = 1,73

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.60 (1H, bs, NH), 7.20-7.01 (2H, m, H2', H6'), 6.86-6.57 (2H, m, H3', H5'), 5.96 (1H, m, H4'), 5.0 (1H, s, OH), 2.60 (3H, s, CH₃), směs

¹³H NMR (75 MHz, DMSO)

δ 158.2, 151.1, 149.7, 138.7, 129.6, 113.8, 112.5, 110.1, 105.6, 103.6, 101.3, 21.7

4.5.7 5-((4-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 623/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₉N₅O

m. h. 251,24

t. t. = 168,5 - 171,7 °C

výtěžek - 0,11 g (39% teoretického výtěžku)

R_f = 0,10

IČ spektrum (cm⁻¹): 3359 (NH), 2228 (CN), 1603, 1553, 1509, 1445, 1397 (pyrazin)

CHN % teor.: C: 62,15; H: 3,61; N: 27,87; O: 6,37

logP = 2,77

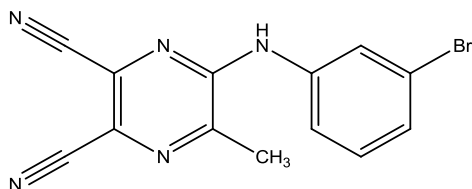
ClogP = 1,73

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.55 (1H, bs, NH), 7.26 (2H, d, H2', H6'), 6.86 (2H, d, H3', H5'), 6.20 (1H, m, OH), 2.60 (3H, s, CH₃), směs produktu a výchozích látek

¹³C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 155.4, 151.5, 149.8, 148.4, 147.8, 140.8, 129.7, 128.8, 125.3, 118.3, 115.7, 114.8, 21.6

4.5.8 5-((3-bromfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 624/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{13}H_8BrN_5$

m. h. 314,14

t. t. = 216,4 – 218,0 °C

výtěžek – 0,07 g (27% teoretického výtěžku)

$R_f = 0,28$

IČ spektrum (cm^{-1}): 3354 (NH), 2922 (CH_3), 2231 (CN), 1606, 1550, 1518, 1410, 1392 (pyrazin)

CHN: % teor.: C: 49,70; H: 2,57; N: 22,29; Br: 25,44

% prakt.: C: 50,09; H: 2,75; N: 22,71

logP = 3,99

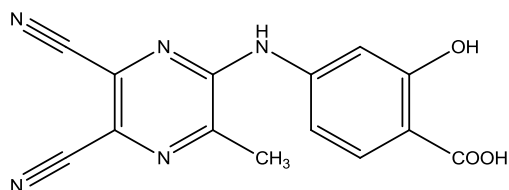
ClogP = 3,26

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.59 (1H, s, NH), 7.89–7.85 (1H, m, H2'), 7.71–7.64 (1H, m, H5'), 7.40–7.36 (2H, m, H4', H6'), 2.60 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 150.8, 148.7, 139.6, 130.9, 129.2, 127.7, 125.2, 121.6, 121.4, 120.0, 115.3, 114.6, 21.7

4.5.9 4-((5,6-dikyano-3-methylpyrazin-2-yl) amino) -2-hydroxybenzoová kyselina



Označení: MD 625/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₄H₉N₅O₃

m. h. 295,25

t. t. = 130,2 - 131,6 °C

výtěžek - 0,17 g (53% teoretického výtěžku)

R_f = 0,46

IČ spektrum (cm⁻¹): 3474 (OH), 3380 (NH), 2956 (CH₃) 2230 (CN), 1640, 1555, 1437, 1355 (pyrazin)

CHN % teor.: C: 56,95; H: 3,07; N: 23,72; O: 16,26

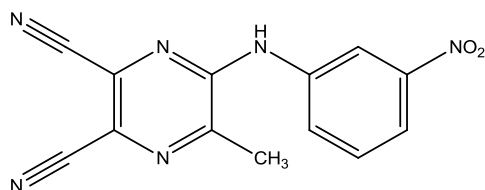
logP = 2,33

ClogP = 2,21

¹H NMR (300 MHz, DMSO) směs látek

¹³H NMR (75 MHz, DMSO) směs látek

4.5.10 5-methyl-6-((3-nitrofenyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 626/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₃H₈N₆O₂

m. h. 280,24

t. t. = rozkládá se

výtěžek - 0,11 g (35% teoretického výtěžku)

R_f = 0,11

IČ spektrum (cm⁻¹): 3403 (NH), 2231 (CN), 1650, 1558, 1445, 1398 (pyrazin)

CHN % teor.: C: 55,72; H: 2,88; N: 29,99; O: 11,42

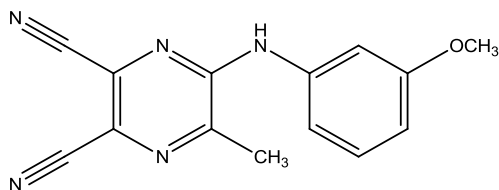
logP = 1,19

ClogP = 2,15

¹H NMR (300 MHz, DMSO) směs látek

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) směs látek

4.5.11 5-((3-methoxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



Označení: MD 627/II

Popis sloučeniny: krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₄H₁₁N₅O

m. h. 265,27

t. t. = 177,5 - 178,4 °C

výtěžek - 0,19 g (66% teoretického výtěžku)

R_f = 0,06

IČ spektrum (cm⁻¹): 3369 (NH), 2917 (CH₃), 2230 (CN), 1614, 1549, 1499, 1393 (pyrazin)

CHN: % teor.: C: 63,39; H: 4,18; N: 26,40; O: 6,03

% prakt.: C: 63,18; H: 4,05; N: 25,71

logP = 3,03

ClogP = 2,32

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.48 (1H, bs, NH), 7.32 (1H, t, J=8.2 Hz, H5'), 7.27-7.12 (2H, m, H2', H6'), 6.82-6.73 (1H, m, H4'), 3.76 (3H, s, OCH₃), 2.60 (3H, s, CH₃)

¹³H NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.6, 151.0, 148.4, 139.0, 129.7, 129.4, 119.4, 115.4, 115.2, 114.7, 110.7, 108.8, 55.3, 21.7

4.6 Výsledky biologického hodnocení

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)										
		MD 585	MD 628	MD 619	MD 620	MD 621	MD 622	MD 623	MD 624	MD 625	MD 626	MD 627
SA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	62,5	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
MRSA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	62,5	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
SE	24h	500	>500	>125	500	>125	62,5	125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
EF	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
EC	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
KP	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
KP-E	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
PA	24h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125

Tab. 10 - Výsledky testování antibakteriální aktivity

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)										
		MD 585	MD 628	MD 619	MD 620	MD 621	MD 622	MD 623	MD 624	MD 625	MD 626	MD 627
CA	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
CT	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
CK	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
CG	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
TB	24h	250	>125	>125	>125	>125	>125	125	>125	>125	>125	>125
	48h	500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AF	24h	500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AC	24h	500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
TM	72h	250	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	120h	250	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125

Tab. 11 - Výsledky testování antifungální aktivity

Látky	MIC ug/ml				
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis I</i> (klin. izolát)	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i> 80/72	<i>M. avium</i> 152/73
MD 585/II	32	32	>256	>256	>256
MD 620/II	>128	>128	>256	>256	>256
MD 621/II	>128	>128	>256	>256	>256
MD 622/II	>128	>128	>128	>128	>128
MD 623/II	>256	>256	>256	>256	>256
MD 624/II	16	16	>128	>128	>128
PZA	32	32	>128	>128	>128

Tab. 12 - Výsledky testování antimykobakteriální aktivity

5. DISKUSE

Cílem mé práce bylo připravit sérii sloučenin, jejichž základní struktura byla vybrána podle Nakamury³⁷. On tyto látky testoval pouze jako herbicidy, já jsem se zaměřil na aktivitu proti tuberkulóze. Jako výchozí látku jsem použil 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril (rozdíl oproti Nakamurovy je v postranním alkylovém řetězci, zde on použil ethyl- či propyl-1-amin). Jako substituenty byly zvoleny aromatické aminy substituované především v poloze 3 (podpora nukleofilní substituce).

Tímto postupem jsem tedy připravil řadu jedenácti látek. Každá byla přečištěna pomocí flash chromatografie a následně charakterizována NMR, R_f , IČ, elementární analýzou, molekulovou hmotností, lipofilitou a teplotou tání.

U látky, kde byl použit 3-(trifluormethyl)anilin jako substituent, nebyla struktura potvrzena. Pravděpodobně se ztratily vzorky na NMR analýzu a zbytek produktu na novou již nestačil. Není tak možné s jistotou určit vzniklý produkt. U látek s označením MD 585/II, MD 619/II, 624/II a 627/II byla struktura potvrzena jako u čisté látky. U zbytku se jednalo o směs produktu a výchozích látek, bylo by třeba je tedy ještě přečistit.

Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 23 - 66%, pro vyšší výtěžky by asi bylo třeba upravit podmínky reakce.

Hodnoty logP se nacházely v intervalu 1,19 - 4,08, což by odpovídalo i intervalu, který je určen jako ideální pro přestup látek přes membrány.

První část vzorků se v množství 5 mg odesílala do mikrobiologické laboratoře v Pardubické krajské nemocnici, kde se vzorky podrobily pod dohledem MUDr. Svobodové testování na antimykobakteriální aktivitu u několika kmenů mykobakterií včetně těch netuberkulózních. Opět se stanovovaly MIC.

Testování na antimykobakteriální aktivitu bylo provedeno jen částečně. První polovina vzorků, které byly odeslány na testování, se nepodařilo vyhodnotit. Důvodem byla kontaminace půdy díky přerostlým koloniím.

Druhou část se již podařilo otestovat. Největší slibnou aktivitu vykazala látka s označením MD 624/II. Jedná se o 5-((3-bromfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril. A to především proti oběma testovaným kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Látka byla za daných podmínek dvakrát účinnější než byl pyrazinamid, který byl brán jako standard. Lipofilita ve formě logP je rovna 3,99.

Poměrně dobrou aktivitu srovnatelnou s pyrazinamidem vykazala pak ještě sloučenina MD 585/II, tedy 5-methyl-6-(fenylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril. LogP je dle výpočtu 3,16.

Látky odeslané na katedru biologických a lékařských věd se testovali na antifungální a antibakteriální aktivitu. Bylo použito 8 kmenů hub a plísní a 8 kmenů bakterií. Navážka vypočítaná dle vzorce $nav. = \frac{m.h. \times 4}{100} [mg]$ se použila k přípravě roztoků o daných koncentracích v sestupné řadě, aby se zjistila minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Antimykotické testy nepřinesly žádné výrazné aktivity. Velmi slabou aktivitu vykazala opět látka MD 585/II (5-methyl-6-(fenylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril) a to u kmenů *Trichosporon beigelii*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Jako poslední z testů *in vitro* bylo provedeno testování na antibakteriální aktivitu proti výše uvedeným 8 kmenům bakterií. Mírnou aktivitu vykazala pouze látka s označením MD 622/II, tedy 5-((2-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril. A to proti všem kmenům testovaných stafylokoků (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* methicilin rezistentní, *S. epidermidis*). LogP je v tomto případě 2,77.

Z výše uvedeného vyplývá, že jako potencionální antituberkulotikum by se mohl jevit derivát 5-((3-bromfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril. U ostatních látek buď aktivita chybí nebo zatím nebylo provedeno testování.

Vztah mezi strukturou připravených látek a jejich biologickou aktivitou a lipofilitou není možné takto přímo předpovědět neboť antimykobakteriální aktivitu vykázaly pouze dvě látky. Je možné, že brom jako substituent aktivitu zvyšuje (je dvojnásobná oproti první syntetizované látce, jejíž aktivita odpovídala pyrazinamidu).

U ostatních testů byla účinná látka vždy jenom jedna, takže předpověď není možná.

6. ZÁVĚR

V mé diplomové práci jsem:

1) Shrnul současný stav a vývoj tuberkulózy ve světě a v rámci České republiky. Dále jsem se zabýval možnostmi ochrany a léčby této nemoci. Nakonec jsem uvedl i některá potencionální léčiva, která by v budoucnu mohla významně ovlivnit terapii. Vše na základě informací, které jsem získal v literatuře.

2) Dále se teoreticky seznámil s přípravou mé výchozí chemické látky, tedy 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Stejně tak i s principem pro přípravu produktů. Obecný postup přípravy byl vzat z chemické literatury.

3) Připravil následujících 11 látek, z nichž první byla již v literatuře popsána, ale testována pouze na herbicidní aktivitu³⁷. Ostatní jsou originální. Jedná se o:

- a. 5-methyl-6-(fenylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- b. 5-methyl-6-((3-(trifluormethyl)fenyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- c. 5-((3-fluorfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- d. 5-((3-chlorfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- e. 5-((3-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- f. 5-((2-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril

- g. 5-((4-hydroxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- h. 5-((3-bromfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- i. 4-((5,6-dikyano-3-methylpyrazin-2-yl)amino)-2-hydroxybenzoová kyselina
- j. 5-methyl-6-((3-nitrofenyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- k. 5-((3-methoxyfenyl)amino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril

U druhé látky struktura nebyla potvrzena.

4) Produkty byly charakterizovány pomocí NMR spekter, IČ, elementární analýzy, teploty tání, molekulové hmotnosti, R_f a lipofility ($\log P$ a $\text{Clog}P$).

5) Bylo provedeno biologické hodnocení *in vitro*. Jednalo se o testy na antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální aktivitu. Při testech proti mykobakteriím došlo ke kontaminaci Šulovy půdy, proto jsou výsledky pouze pro část syntetizovaných látek.

6) Snaha o nalezení vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou nebyla příliš úspěšná. Aktivní byly pouze tři sloučeniny, což neumožňuje příliš mnoho možností k předpovědi.

ABSTRAKT

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva VII.

Ondřej Jandourek

Tuberkulóza je jedním z největších zdravotnických problémů na světě. Počet nových onemocnění roste každým dnem, zvláště pak v rozvojových zemích. Dalším problémem je pak tuberkulóza rezistentní na používaná léčiva, která se objevuje častěji a častěji. Následkem toho vedou tyto okolnosti k jedinému řešení - nalezení nových sloučenin k léčbě této zákeřné nemoci.

Tato práce se zabývá syntézou originálních, v literatuře nedokumentovaných sloučenin. Výchozí sloučeninou byl 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril. Látky byly získávány aminodehalogenační reakcí s aromatickými substituovanými aminy.

Konečné produkty byly charakterizovány molekulovou hmotností, teplotou tání, TLC, logP, elementární analýzou, ^1H a ^{13}C NMR a IČ.

Sloučeniny se nechaly testovat *in vitro* na jejich biologickou aktivitu - antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální.

ABSTRACT

Pyrazin derivatives as potential drugs VII.

Ondřej Jandourek

Tuberculosis is one of the biggest health problems in the world. The number of new cases is rising every day, especially in less developed countries. The other problem is drug resistant tuberculosis which is occurring more and more frequently. Consequently these circumstances lead to one solution - to find new compounds to treat this greasy disease.

This work deals with synthesis of undocumented compounds in literature. The starting compound was 5-chloro-6-methylpyrazine-2,3-dicarbonitrile. The compounds were developed by aminodehalogenational reaction by substituted anilines.

Final compounds were characterized by molecular weight, melting point, TLC, logP, elemental analysis, ^1H and ^{13}C NMR and IR.

Compounds were tested *in vitro* testing on their biological activity - antimycobacterial, antifungal and antibacterial.

POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ HOMOLKA, J.; VOTAVA, V. Tuberkulóza. 3. vyd., *Nakladatelství Karolinum*, Praha, 2008, 79 s., ISBN 80-246-0630-5
- ² TEŘL, M.; KRÁKOROVÁ, G.; PEŠEK, M.; a kol. Plicní lékařství. 1. vyd., *Nakladatelství Karolinum*, Praha, 2004, s. 44-45, 123-134, ISBN 80-246-0820-0
- ³ TROUSILOVÁ, A. Tuberkulóza. NOVINKY [online]. Dostupný z WWW: <<http://tema.novinky.cz/tuberkuloza>>
- ⁴ MUSIL, J.; PETŘÍK, F.; TREFNÝ, M.; a kol. Pneumologie. 1. vyd., *Nakladatelství Karolinum*, Praha, 2005, s. 74-83, ISBN 80-246-0993-2
- ⁵ ČTK. Podle WHO je každý čtvrtý zemřelý na TBC i HIV pozitivní. MAGAZÍN ČESKÉ NOVINY 2009, 24. 03. 2009 [online]. ISSN 1213-5003, Dostupný z WWW: <<http://magazin.ceskenoviny.cz>>
- ⁶ KOENIG, R. Hughes Backs Institute at Epicenter of HIV and Resistant TB. SCIENCEMAG, 27. 3. 2009, VOL 323, p. 1659 [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencemag.org>>
- ⁷ TRNKA, L. Jak hodnotí globální situaci MDR-TB a XDR-TB Světová zdravotnická organizace a jaké metody doporučuje při jejich zdolávání? *Vakcinol.*, 2009, vol. 3, s. 98-100.
- ⁸ SALAJKA, F.; PARÁKOVÁ, Z.; PRCHALOVÁ, E. Aktuality oboru TRN. 1. vyd., *Nadační fond pro léčbu a výzkum plicních a přidružených onemocnění*, Hradec Králové, 2007, s. 47-50, 103-107, ISBN 978-80-239-9167-3
- ⁹ ŠPÁSOVÁ, I.; PARÁKOVÁ, Z.; PRCHALOVÁ, E. Tuberkulóza, respirační insuficience, karcinom plic, ošetřovatelství - Aktuality oboru TRN. 1. vyd., *Nucleus HK*, Hradec Králové, 2001, s. 14-20, 38-40, 146-149, ISBN 80-86225-13-5
- ¹⁰ ČTK. Počet onemocnění TBC u cizinců stoupá. MAGAZÍN ČESKÉ NOVINY 2009, 23. 03. 2009 [online]. ISSN 1213-5003, Dostupný z WWW: <<http://magazin.ceskenoviny.cz>>

-
- ¹¹ PERGL, V. Boj s tuberkulózou loni prohrálo 43 lidí. PRÁVO, 03. 08. 2010 [online] Dostupný z WWW: <<http://www.novinky.cz/domaci/207643-boj-s-tuberkulozou-loni-prohralo-43-lidi.html>>
- ¹² SZÚ. Infekční nemoci v České republice v letech 2007–2009. ÚZIS: Aktuální informace 45, Praha, 16. 08. 2010 [online] Dostupný z WWW: <http://www.uzis.cz/system/files/45_10.pdf>
- ¹³ MACELA, A.; a kol. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií. 1. vyd., Grada publishing, a. s., Praha, 2006, s. 155–180, ISBN 80-247-0664-4
- ¹⁴ EMBERGER, O.; a kol. Obecná a speciální mikrobiologie II. Speciální bakteriologie. 1. vyd., SPN, Praha, 1980, s. 89–93
- ¹⁵ NĚMCOVÁ, B. Lidé si připomínají den TBC, nemocí je nakažena třetina lidstva. MF DNES, 24. 03. 2009 [online] Dostupný z WWW: <http://zpravy.idnes.cz/lide-si-pripominaji-den-tbc-nemoci-je-nakazena-tretina-lidstva-p6e-/domaci.asp?c=A090324_080743_domaci_ban>
- ¹⁶ HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.; ZIMČÍK, P. Farmaceutická chemie IV. 1. vyd., Nakladatelství Karolinum, Praha, 2006, s. 73–80, 99–104, 113–117, 119–124, ISBN 80-246-1169-4
- ¹⁷ HYNIE, S. Speciální farmakologie – Díl VII/B, Protiinfekční léčiva. 2. vyd., Nakladatelství Karolinum, Praha, 2003, s. 133–151, ISBN 80-246-0657-7
- ¹⁸ ABRAHAM, D. J.; ROTELLA, D. P. Burger's medicinal chemistry, drug discovery, and development – Volume 7: Antiinfectives. 7. vyd., A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2010, p. 713, 755–759, ISBN 978-0-470-77008-5
- ¹⁹ HAMPL, F.; PALEČEK, J. Farmakochemie. 1. vyd., VŠCHT Praha, Praha, 2002, s. 316–319, ISBN 80-7080-495-5
- ²⁰ BRAVO, T. C.; ELLARD, G. A.; MITCHISON, D. A. Reappraisal of the activity of morphazinamide against *M. tuberculosis*. *Tubercle*, 1975, vol. 56, p. 211–6.

-
- ²¹ ZIERSKI, M. Comparison of the effect of morphazinamide and pyrazinamide in the treatment of chronic tuberculosis. *Gruzlica*, 1965, vol. 33, p. 769-75.
- ²² BOSHOFF, H. I.; MIZRAHI, V.; BARRY, C. E., 3RD. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J. Bacteriol.*, 2002, p. 184-9.
- ²³ CYNAMON, M. H.; SPEIRS, R. J.; WELCH, J. T. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, p. 42-9.
- ²⁴ YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WATANABE, N.; URA, T. In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, p. 39-47.
- ²⁵ SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; REDDY, S. P. Synthesis of pyrazinamide Mannich bases and its antitubercular properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, vol. 16., no. 8, p. 2113-6
- ²⁶ IMRAMOVSKÝ, A.; POLANC, S.; VINŠOVÁ, J.; KOČEVAR, M.; JAMPÍLEK, J.; RECKOVÁ, Z.; KAUSTOVÁ, J. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol. 15, no. 7, p. 2551-9
- ²⁷ CHUNG, W. J.; KORNILOV, A.; BRODSKY, B. H.; HIGGINS, M.; SANCHEZ, T.; HEIFETS, L. B.; CYNAMON, M. H.; WELCH, J. Inhibition of M. tuberculosis in vitro in monocytes and in mice by aminomethylene pyrazinamide analogs. *Tuberculosis (Edinb)* 2008, vol. 88, no. 5, p. 410-9
- ²⁸ DOLEŽAL, M.; JAMPÍLEK, J.; OSICKA, Z.; KUNES, J.; BUCHTA, V.; VÍCHOVÁ, P. Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco*, 2003, vol. 58, p. 1105-11
- ²⁹ DOLEŽAL, M.; ČMEDLOVÁ, P.; PALEK, L.; VINŠOVÁ, J.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; JAMPÍLEK, J.; KRÁLOVÁ, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted

pyrazinecarboxamides. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, vol. 43, no. 5, p. 1105-13

³⁰ DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; OSIČKA, Z.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; VEJSOVÁ, M.; DOHNAL, J.; JAMPÍLEK, J.; KRÁLOVÁ, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, 2010, vol. 15, no. 12, p. 8567-8581, ISSN 1420-3049

³¹ ZITKO, J.; DOLEŽAL, M.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; KUČERA, R.; JÍLEK, P. Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, vol. 19, no. 4, p. 1471-1476, ISSN 0968-0896

³² PALEK, L.; DVOŘÁK, J.; SVOBODOVÁ, M.; BUCHTA, V.; JAMPÍLEK, J.; DOLEŽAL, M. Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-2,5-dicyanopyrazines. *Arch. Pharm.*, 2008, vol. 341, no. 1, p. 61-65, ISSN 0365-6233

³³ TAKEMATSU, T.; et al. 2,3-dicyanopyrazines. 31st March 1981, United States Patent, 4.259.489, 42 p.

³⁴ NOHAVOVÁ T., JEŽKOVÁ T., MARKOVÁ T. Mikrovlny, <http://fyzsem.fjfi.cvut.cz/2008-2009/Leto09/proc/mikrovlny.pdf> (datum přístoupení březen 2011)

³⁵ <http://www.labhut.com/education/flash/index.php> (datum přístoupení březen 2011)

³⁶ www.isco.com (datum přístoupení březen 2011)

³⁷ NAKAMURA, A.; ATAKA, T.; SEGAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; TAKEMATSU, T. Structure-activity relationships of herbicidal 5-ethylamino- and 5-propylamino-2,3-dicyanopyrazines. *Agric. Biol. Chem.*, 1983, vol. 47, no. 7, p. 1561-7.