

Obsah

Zoznam použitých skratiek.....	2
Abstrakt/Abstract.....	3
Kľúčové slová/Keywords.....	4
Cieľ rigorózneho práce.....	5
1. Úvodná časť.....	6
1.1 Problematika tuberkulózy.....	6
1.1.1 Súčasný stav, výskyt vo svete.....	6
1.1.2 Situácia v Českej republike.....	7
1.1.3 Tuberkulóza a rezistencia.....	8
1.2 Tuberkulóza.....	9
1.2.1 Patogenéza.....	9
1.2.2 Diagnostika.....	10
1.2.3 Prevencia.....	10
1.2.4 Liečba.....	11
1.3 Mykobakteriá.....	12
1.4 Antituberkulotiká.....	13
1.4.1 Antituberkulotiká prvej línie.....	14
1.4.2 Ďalšie antituberkulotiká.....	18
1.4.3 Nové látky vo vývoji.....	19
2. Teoretická časť.....	25
2.1 Pyrazín.....	25
2.2 Príprava acylhalogenidov.....	25
2.3 Príprava amidov karboxylovej kyseliny.....	26
3. Experimentálna časť.....	28
3.1 Prístroje a chemikálie.....	28
3.2 Schémy prevádzaných reakcií.....	29
3.2.1 Schéma prípravy chloridu kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej.....	29
3.2.2 Schéma prípravy anilidov 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	29
3.3 Postupy prípravy.....	30
3.3.1 Východzia látka.....	30
3.3.2 Príprava chloridu 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	30
3.3.3 Príprava anilidov kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej.....	30
3.4 Pripravené anilidy kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej, ich vlastnosti.....	31
3.4.1 (4-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	31
3.4.2 (3-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	32
3.4.3 (3-metylfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	33
3.4.4 (3-metoxifenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	34
3.4.5 (3-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	35
3.4.6 (2-kyano-4-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.....	36
4. Biologické hodnotenie.....	37
4.1 Antituberkulotická aktivita.....	37
4.2 Antimykotická aktivita.....	38
4.3 Herbicídna aktivita.....	40
5. Diskusia.....	41
6. Záver.....	47
Zoznam použitej literatúry.....	48

Zoznam použitých skratiek

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome
AT – antituberkulotiká
ATP – adenzíntrifosfát
CYP450 – cytochróm P450
DMSO – dimetylsulfoxid
DNA - deoxyribonukleová kyselina
DOTS - Directly Observed Treatment, Short Course
DÚ – dýchacie ústrojenstvo
FaF UK – Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovej
HIV - human immunodeficiency virus
IČ – infračervené žiarenie
INH – izoniazid
IR – infrared radiation
MDR-TB – Multi-Drug Resistant Tuberculosis
MIC – minimálna inhibičná koncentrácia
MT - *M. tuberculosis*
NMR – nukleárna magnetická rezonancia
PAS - kyselina *p*-aminosalicylová
PCR – polymerase chain reaction
POA – pyrazínkarboxylová kyselina
PZA – pyrazínamid
R_f – retenčný faktor
RNA - ribonukleová kyselina
SI - index selektivity
T_t – teplota topenia
TAACF - Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility
TBC – tuberkulóza
TLC – thin layer chromatography
ÚZIS ČR – Ústav zdravotníckých informácií a štatistiky ČR
WHO - World Health Organization
XDR-TB – Extensive-Drug Resistant Tuberculosis

Abstrakt

Názov rigorózneho práca:

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Úvod rigorózneho práca pojednáva o tuberkulóze a jej výskyte vo svete, problematike rezistencie, patogenéze, diagnostike, predchádzaní a liečbe TBC, používaných i vyvíjaných liečivách. V ďalších kapitolách sú popísané spôsoby prípravy amidov karboxylovej kyseliny, schémy prevádzaných reakcií a šesť pripravených anilidov, ktoré boli charakterizované teplotou topenia, elementárnou analýzou, IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektrami. U nasyntetizovaných látok bola metódami *in vitro* skúmaná antituberkulotická, antifungálna a herbicídna aktivita. Taktiež u nich boli stanovené hodnoty lipofility $\log P$ a $\log K$. Bol zhodnotený vzťah medzi biologickou aktivitou, chemickou štruktúrou a lipofilitou pripravených látok

Abstract

Title of rigorous thesis:

Derivates of 5-methylpyrazine-2-carboxylic acid as potential drugs

Introduction of rigorous thesis is about tuberculosis, its occurrence in the world, drug resistance, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment, about used and developed drugs. Further, I describe methods of carboxylic acid amides preparation, schemes of reactions and six prepared anilides. These are characterized by melting temperature, elemental analysis, IR, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Synthesized compounds were tested *in vitro* for antituberculous, antifungal and herbicidal activity. Also values of lipophilicity $\log P$ and $\log K$ were gained. Relationship between biological activity, chemical structure and lipophilicity of prepared substances was evaluated.

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Kľúčové slová

tuberkulóza, *Mycobacterium tuberculosis*, amidy pyrazínkarboxylovej kyseliny, pyrazínamid, lipofilita, antimykobakteriálna aktivita, antifungálna aktivita, herbicídna aktivita

Keywords

tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinecarboxamides, pyrazinamide, lipophilicity, antimycobacterial activity, antifungal activity, herbicidal activity

Cieľ rigorózneho práce

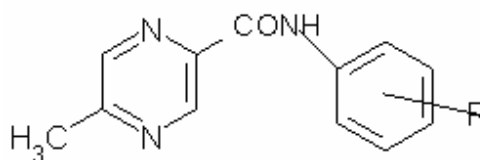
Táto rigorózna práca nadväzuje na moju diplomovú prácu z roku 2009¹. Na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv prebieha dlhodobý výskum v oblasti prípravy nových derivátov pyrazínu s potenciálnym antimykobakteriálnym, antifungálnym a herbicídnyim účinkom. Moja práca prispela k rozšíreniu spektra pripravených látok.

Cieľom rigorózneho práce je pripraviť na jadre substituované deriváty pyrazínu s predpokladanou biologickou aktivitou.

Rigorózna práca zahŕňa tieto úlohy:

1. vypracovať rešerš pojednávajúcu o tuberkulóze, jej výskyte vo svete, terapii, používaných a potenciálnych antituberkulotikách
2. v chemickej literatúre zistiť metódy prípravy amidov pyrazínkarboxylovej kyseliny
3. pripraviť substituované amidy pyrazínkarboxylovej kyseliny
4. vypočítať hodnoty $\log P$ pripravených látok
5. zhodnotiť vzťah medzi štruktúrou, biologickým účinkom a lipofilitou v súbore pripravených látok

Všeobecný vzorec pripravených látok:



R = 4-OH, 3-OH, 3-CH₃

3-OCH₃, 3-NO₂, 2-CN-4-NO₂

1. Úvodná časť

1.1 Problematika tuberkulózy

1.1.1 Súčasný stav, výskyt vo svete

TBC je nakažlivé ochorenie, ktoré sprevádza človeka odnepamäti². Podľa odhadov WHO je tuberkulózou infikovaná tretina populácie a ročne vo svete pribúda 9 miliónov nových prípadov a 2 milióny úmrtí. Len v Európskom regióne ide približne o 49 nových prípadov a 7 úmrtí každú hodinu³. Celková incidencia TBC vo svete stúpa asi o 0,4 % za rok².

Z údajov WHO vyplýva, že neliečená osoba s aktívnou formou TBC nakazí každý rok v priemere desať až pätnásť ľudí. U jedného z desiatich infikovaných prepukne aktívna forma TBC a každý rok pribudne vo svete 490 000 prípadov MDR-TB a 40 000 prípadov XDR-TB³.

Oblasti s najvyšším výskytom TBC sú: Indonézia, Malajzia, Laos, Kambodža, Thajsko, Čína, Bangladéš, India, Pakistan, Afganistan, Irak, Rusko, Ukrajina, Rumunsko, štáty Afriky ako Nigéria, Sudán, Čad, Etiópia, Keňa, Kongo, Mali, Zambia, Juhoafrická republika, či štáty Ameriky – Brazília, Bolívia, Ekvádor, Peru, Honduras, Guatemala a Dominikánska republika^{4,5}.

Podľa každoročného hlásenia WHO, zverejneného vo Svetový deň tuberkulózy 24.3.2009, je odhadovaný výskyt nových prípadov TBC vo svete za rok 2007 na 9,27 milióna, čo je napríklad v porovnaní s rokom 2004 zníženie zo 142 na 139 prípadov na 100 000 ľudí⁶.

V Európe bolo v roku 2007 registrovaných 477 327 prípadov TBC (54 na 100 000 obyvateľov), čo je 5 % všetkých TBC ochorení nahlásených WHO. Najviac, 77 % hlásení, ich bolo v krajinách Východu (patria sem napr. Arménsko, Azerbajdžán, Bielorusko, Gruzínsko, Kazachstan, Ruská federácia, Ukrajina, Moldavsko), kde žije 22 % populácie Európskeho regiónu WHO⁷.

1.1.2 Situácia v Českej republike

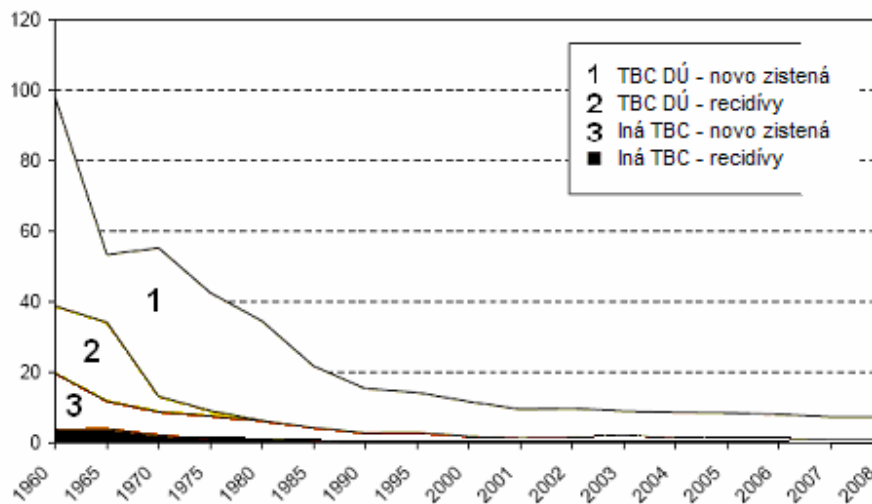
Česká republika, Slovensko a Slovinsko patria medzi jediné krajiny z bývalého východného bloku s nízkym výskytom TBC. Radia sa tak medzi štandardné západoeurópske krajiny s incidenciou TBC pod 20 prípadov na 100 000 obyvateľov².

V ČR je v posledných dvoch rokoch miera nahlásených prípadov na úrovni 8,4 na 100 000 obyvateľov. V roku 2007 bolo nahlásených 871 prípadov TBC. TBC sa častejšie vyskytovala u mužov ako u žien (v pomere 598 ku 273 prípadom). 153 prípadov bolo zistených u cudzincov. Úmrtí na TBC bolo 56⁸.

V roku 2008 bolo objavených 879 prípadov TBC, 567 u mužov, 312 u žien. U cudzincov (prevažne z Mongolska, Ukrajiny, Vietnamu a Slovenska) to bolo 186 nájdených ochorení. Medzi nakazenými boli aj 38 bezdomovci. Úmrtí na túto chorobu bolo 57. Krajmi s najvyšším počtom hlásení boli Pardubický kraj, potom Ústecký a Hl. m. Praha.

V oboch rokoch sa z hľadiska veku TBC vyskytla viac u starších ľudí, najčastejšou formou bola TBC pľúc⁸.

Do európskej databázy WHO dodáva data za Českú republiku ÚZIS ČR v spolupráci s Národnou jednotkou dohľadu nad TBC⁸.



Graf č. 1: Vývoj počtu hlásených ochorení TBC na 100 000 obyvateľov
(zdroj – ÚZIS, Aktuální informace č. 31/09)

1.1.3 Tuberkulóza a rezistencia

Rezistenciu môžeme rozdeliť na *primárnu* a *získanú (sekundárnu)*. O *primárnej* sa vraví, ak sa vyskytne u pacienta nikdy neliečeného AT, ktorý bol infikovaný už rezistentným kmeňom baktérií. Jej výskyt je zriedkavý. O prípad *získanej* rezistencie ide vtedy, ak sa objaví najmenej po jednom mesiaci liečby AT⁹.

Ďalej rozoznávame monorezistenciu (rezistenciu mykobaktérií na jedno AT), polyrezistenciu (na dve a viac AT okrem izoniazidu a rifampicínu) a multirezistenciu² (MDR-TB - minimálne na izoniazid a rifampicín, XDR-TB - na izoniazid, rifampicín a aspoň tri ďalšie AT 2. línie)¹⁰.

Rezistencia mykobaktérií na AT má negatívny vplyv na pacienta, jeho okolie a je finančne náročná. So zvyšujúcim sa počtom AT, na ktoré je baktéria rezistentná, sa znižuje šanca na prežitie pacienta, pri rezistencii na štyri až päť AT je iba polovičná. Najčastejšie príčiny vzniku rezistencie sú ako na strane lekára – nesprávna dávka, druh liečiva a kontrola terapie, tak na strane pacienta – neužívanie liekov podľa predpísanej schémy, nedodržanie dĺžky užívania⁹. Jej vznik podporujú aj ďalšie okolnosti, napríklad výskyt HIV¹¹, zlá sociálna situácia, nedostatočná kontrola liečebných režimov, cestovanie a migrácia ľudí⁹. Najčastejším dôvodom zlyhania liečby je nedôslednosť v užívaní liekov na strane pacienta. Preto vytvorila WHO program DOTS (Directly Observed Treatment, Short Course), ktorý zahŕňa priamo kontrolované neprerušované podávanie AT v kombináciách, ktoré potom môžu byť podávané v krátkodobých šesťmesačných liečebných režimoch^{9, 11}, mikroskopické vyšetrenie spúta, dostupnosť liekov i zapojenie sa vlád krajín do tohto programu².

Závažným problémom je šírenie rezistentných foriem TBC predovšetkým v rozvojových krajinách, kde nedostatok financií neumožňuje splniť program DOTS (ten sa uplatňuje len asi u 2 % zo všetkých TBC pacientov)². Následkom toho bude veľmi pravdepodobne nesplnenie cieľa WHO – globálne obmedziť výskyt TBC do roku 2015. Svetová zdravotnícka organizácia a Medzinárodná únia proti tuberkulóze a pľúcnym ochoreniam vydali v roku 2008 dokumenty zaoberajúce sa globálnym výskytom a liečbou MDR-TB a XDR-TB. Ide o 4. správu o výsledkoch globálneho projektu rezistencie baktérií na AT a o Sprievodcu cielenej liečby rezistentnej formy TBC. Na vypracovanie 4. správy poslúžili výsledky testov citlivosti mykobaktérií zo 114 krajín. Rezistencia sa vyskytla vo viac ako

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

35 % všetkých novo hlásených mikroskopicky pozitívnych prípadov TBC na svete. V dokumente o liečbe rezistentnej formy TBC sa kladie dôraz na prevádzanie testov citlivosti baktérií, na diagnostiku HIV u TBC pacientov, ochranné opatrenia v podobe izolácie infekčných osôb¹¹. Liečba rezistentných foriem TBC má prebiehať za podávania kombinácie aspoň štyroch AT, na ktoré sú baktérie citlivé po dobu 18 mesiacov po dosiahnutí kultivačnej negativity¹¹.

1.2 Tuberkulóza

1.2.1 Patogenéza

Tuberkulózu spôsobujú acidorezistentné tyčinkovité baktérie – *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, ktoré sa po ofarbení ani pôsobením kyselín neodfarbia². Postihuje pľúca (80–90 % prípadov)^{2, 9}, ale aj iné mimopľúcne štruktúry. Podľa toho rozoznávame pľúcnu a mimopľúcnu TBC⁹.

Zdrojom nákazy je zväčša človek s touto chorobou, menej často zvieratá a kadavery⁹. Preto je dôležité odstrániť aj TBC infikované voľne žijúce zvieratá a dobytok (v ČR vykonané v roku 1968). K prenosu dochádza predovšetkým inhaláciou kvapôčok vzdušnou cestou, vzácnou kontaktom, digestívnou a hematogénnou cestou⁹.

Po vdýchnutí baktérií tieto v organizme buď hynú, alebo nehynú a spôsobujú mikropneumóniu. Organizmus si s infekciou poradí a eliminuje ju, alebo sa baktérie šíria krvnou či lymfatickou cestou po tele. Jedinec, u ktorého dôjde k samovoľnej úzdruve, nemá prejavy ochorenia a nie je infekčný, ale perzistory v jeho tele môžu spôsobiť opätovné prepuknutie choroby pri zhoršení životných podmienok či jeho zdravotného stavu².

U osôb, neočkovaných proti TBC a ktoré neboli touto chorobou nakazené v minulosti, vzniká pri infikácii MT *primárna TBC*. Najčastejšie sa vyskytuje u detí, má latentný priebeh, v 90 % dochádza k spontánnemu vyhojeniu. U osôb už infikovaných v minulosti vzniká (napríklad v zlých sociálnych podmienkach, pri oslabení organizmu iným ochorením či liekmi) *postprimárna TBC* exogénnou infikáciou alebo endogénnou reaktiváciou TBC ložísk².

1.2.2 Diagnostika

Je založená na anamnéze (nočné potenie, kašeľ, hemoptýza, chudnutie, dušnosť, bolesti na hrudi, pobyt v cudzine, kontakt s TBC nakazenými osobami), klinickom vyšetrení, zobrazovacích metódach (CT vyšetrenie, RTG hrudníka), tuberkulózy skúške (používa sa čistený tuberkuloproteín v množstve 0,1 ml podkožne do predlaktia), vyšetrení biologického materiálu (mikroskopicky – potrebná prítomnosť dostatočného množstva baktérií; kultivačne – po 3, 6, 9 týždňoch; genetickými metódami – PCR metóda detekujúca prítomnosť nukleových kyselín mykobaktérií; histologicky; sérologicky – quantiferónový test založený na detekcii interferónu gama produkovaného T-lymfocytmi)².

1.2.3 Prevencia

Jednou z možností predchádzania TBC je vakcinácia. Na očkovanie sa používa BCG (Bacille Calmette-Guérin) vakcína, jedna z najstarších a najčastejšie podávaných vakcín na svete¹².

Nebráni vzniku TBC, ale znižuje možnosť vzniku závažných foriem tohto ochorenia. Podávané sú živé oslabené boviné mykobaktérie pestované trinásť rokov na glycerín-zemiakovej pôde, ktoré sú pre človeka nepatogénne². V súčasnosti sa na očkovanie používajú rôzne podkmene baktérií (Pasteur-1173 P2, Tokyo-172, Copenhagen-1331, Glaxo-1077)², čo je výsledkom genetických zmien, ktoré sa objavili počas opakovaných kultivácií v rôznych krajinách pred zavedením lyofilizácie na uchovávanie bakteriálnych kultúr pred rokom 1960¹².

K podaniu vakcíny dochádza intradermálne do hornej časti ľavej ruky od štvrtého dňa do konca šiesteho týždňa po narodení, s preočkovaním v prípade tuberkulín negatívneho výsledku v 11-tich rokoch. Tuberkulínová skúška slúži v krajinách s nízkym výskytom TBC, kde sa očkovanie neprevádza, na objavenie TBC nakazených jedincov².

Druhou možnosťou je preventívne podávanie izoniazidu, a to jedincom zdravým, vystaveným nákaze, ktorých chceme chrániť pred vznikom ochorenia, alebo už infikovaným s cieľom zabrániť prejavom infekcie².

1.2.4 Liečba

Terapia tohto ochorenia prešla vývojom od podávania neúčinných látok, kuriózných opatrení ako napríklad kráľovský dotyk, ktorý mal pacienta vyliečiť, pobytu v sanatóriách, až po liečbu v súčasnosti používanými liečivami. Liečba má pacienta vyliečiť, aby nedošlo k recidívam a šíreniu infekcie na ostatnú populáciu².

Liečba TBC je kombinovaná, aby sa zabránilo vzniku rezistencie na AT a zároveň môžu byť podávané nižšie dávky jednotlivých liečiv, čo má za následok nižší výskyt nežiaducich účinkov^{1, 13}.

V liečbe rozoznávame dve fázy – *iniciálnu*, počas ktorej je pacient hospitalizovaný a podávajú sa mu kombinácie liečiv - izoniazid, rifampicín, pyrazínamid a etambutol, prípadne streptomycín, trvá približne dva mesiace, a *pokračovaciú*, v ktorej je už neinfekčný pacient liečený ambulantne za podávania izoniazidu a rifampicínu, prípadne etambutolu, čo trvá asi štyri mesiace².

Ďalšou alternatívou je chirurgická liečba, ktorá sa v ČR využíva ojedinele. Uplatnenie nachádza u niektorých pacientov s TBC nereagujúcou na AT, s rezistentnými formami TBC, s posttuberkulóznymi pľúcnymi zmenami, či s mykobakteriázami².

V receptoch ľudovej medicíny sa môžeme stretnúť aj s čajovou zmesou na podporu liečby tohto ochorenia – obsahuje skorocel, stavikrv, pľúcnik, prasličku a slez. Čaj sa pije dvakrát až trikrát denne¹⁴.

1.3 Mykobakteriózy

Existuje najmenej 95 rôznych mykobaktérií, ktoré môžeme rozdeliť na dve skupiny. Do prvej patria tie, ktoré spôsobujú vznik prenosného ochorenia (TBC), do druhej tie, ktoré sú schopné vyvolať neprenosné ochorenie (mykobakteriózu)².

Mykobakteriózy sú vyvolané atypickými mykobaktériami, ktoré majú odlišné laboratórne charakteristiky ako MT, vyskytujú sa v prostredí (v pôde, vode, vzduchu), ale nespôsobujú vznik infekcie prenosnej z osoby na osobu².

Je to ochorenie podobné TBC, ktorého pôvodcami sú napr. *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium-intracellulare*. Postihuje hlavne pacientov s AIDS, u ktorých môže vyvolať vážne diseminované ochorenie. Inak postihnutie osoby infikovanej týmito mikroorganizmami nebýva až tak závažné ako v prípade tuberkulózy spôsobenej MT. Ide o kožné granulómy a vredy, asymptomatické infekcie, pľúcne ochorenia^{2,15}.

Diagnostika je založená na zobrazovacích vyšetreniach, prítomnosti problémov u pacienta a na opakovanom dôkaze výskytu patogéna v biologickom materiáli². U atypických mykobaktérií sa vyskytuje rezistencia voči mnohým AT. Voľba liekov pri týchto infekciách musí byť založená na základe výsledkov testov citlivosti¹⁵. Podávajú sa kombinácie liekov po dobu najmenej dvoch rokov².

1.4 Antituberkulotiká

Ako som už spomínala, liečba TBC musí byť kombinovaná¹³. Podávajú sa liečivá prvej a druhej línie¹⁶. Do prvej patria látky podávané prednostne (niekedy označované aj ako základné, esenciálne AT)¹³, do druhej tie, ktoré sa podávajú v prípade rezistencie mykobaktérií na látky prvej línie¹⁶.

Medzi baktericídne AT prvej línie patria izoniazid, rifampicín, pyrazínamid a streptomycín, etambutol pôsobí bakteriostaticky¹³. Isoniazid je účinný na metabolicky aktívne mykobaktérie, má schopnosť ich v 90 % zničiť počas siedmich dní. Rifampicín je schopný ničiť rýchlo sa množiace baktérie i perzistory. Pyrazínamid pôsobí v kyslom prostredí na MT v makrofágoch. Etambutol a streptomycín sa radia do kombinácie s nimi ako podporné látky¹³.

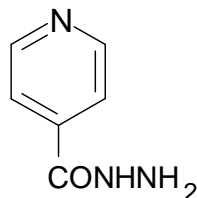
Do druhej línie patria látky, u ktorých je menej výhodný pomer prospech/riziko¹⁷. Patria sem: fluorochinolóny ofloxacín a ciprofloxacín, aminoglykozidy kanamycín a amikacín, makrolidy klaritromycín a azitromycín, tetracyklíny doxycyklín a minocyklín, ďalej cykloserín, terizidon, viomycín, kapreomycín, PAS, etionamid, protionamid, tioacetazon, klofazimín, rifabutín. Podrobnejšie sú tieto AT charakterizované v mojej diplomovej práci¹.

Najprv je dôležité zistiť o aký prípad TBC ide a podľa toho zvoliť liečebný režim. WHO rozoznáva 4 druhy liečebných režimov, pričom je dôležité, či ide o novozistený prípad, recidívu, zlyhanie liečby, alebo o následnú liečbu po prerušení liečby, ďalej či sú v biologickom materiáli prítomné baktérie, aký je RTG nález a klinický stav pacienta. U TBC seróznych blán, mozgovomiešnych blán a TBC nadobličiek sa podávajú aj glukokortikoidy, a to prednizón, hydrokortizón či metylprednizolón. Pri zistení imunodeficiencie sa môžu podávať imunomodulancia¹³.

V oblasti vývoja nových liečiv je problémom finančná náročnosť spojená s ich vývojom a následná návratnosť investícií, ďalej samotné nájdenie látky s aktivitou voči MT a dlhotrvajúce klinické hodnotenia¹⁸.

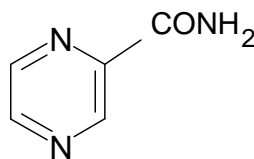
1.4.1 Antituberkulotiká prvej línie

Isoniazid



- na deliace sa MT pôsobí baktericídne¹³. Používa sa v liečbe i prevencii TBC^{2,13}.
- látka prvej línie, podlieha v MT aktivácii KatG katalázou, a takto aktivovaná molekula inhibuje syntézu kyseliny mykolovej prostredníctvom enzýmu InhA, podieľajúceho sa na syntéze mastných kyselín. Hlavnou príčinou rezistencie na INH je mutácia KatG katalázy¹⁹.
- biotransformuje sa acetyláciou^{16, 20}, dĺžka biologického polčasu závisí od typu acetylátora, u pomalého predstavuje asi 3 hodiny, u rýchleho asi 1 hodinu¹⁶
- medzi hlavné nežiaduce účinky patria alergické reakcie, horúčka, hepatotoxicita a neurotoxicita, ktorej možno zabrániť podávaním pyridoxínu^{15, 16}. Prítomnosť hydrazidovej skupiny má za následok vznik liekových interakcií s inhibítormi monoaminoxidázy, pretože sama tento enzým ovplyvňuje²⁰.
- žiadna z modifikácií hydrazidu izonikotínovej kyseliny ju svojimi vlastnosťami neprekonalá. Určitý význam mali len substitúcie hydrazidového zvyšku (tvorba prekursoru liečiva), napr. *N*-izopropylový derivát iproniazid²⁰.
- v posledných rokoch je skúmaný prínos izoniazidu v chemoprolaxii u pacientov s transplantovanou obličkou. Štúdia zverejnená v roku 2005 priniesla výsledky o nižšej incidencii TBC v skupine pacientov dostávajúcich izoniazid v porovnaní s kontrolnou skupinou bez podávania tejto látky²¹. Výsledky inej, zatiaľ najväčšej randomizovanej prospektívnej štúdie o podávaní INH transplantovaným pacientom, poukazujú na význam látky v tejto indikácii. Približne polovici zo štyroch stoviek pacientov bol rok po transplantácii podávaný INH, pričom len u jedného z nich sa rozvinula TBC (v porovnaní so 16 pacientmi z kontrolnej skupiny). Autori tak vyzdvihli prínos INH u imunosuprimovaných jedincov v oblastiach s vysokým výskytom TBC²².

Pyrazínamid



- pyrazínamid je významná látka so sterilizačným účinkom, ktorá umožňuje skrátiť dĺžku liečebných režimov tuberkulózy^{23,24}

- mechanizmus účinku pyrazínamidu je nejasný, účinnou formou je pyrazínkarboxylová kyselina²⁴. Má vysokú *in vivo*, nízku *in vitro* aktivitu²⁵. Výsledky posledných štúdií ukazujú, že PZA vstupuje do MT pasívnou difúziou, premieňa sa na POA pôsobením nikotínamidázy/pyrazínamidázy (PZAasa) a časť je vylúčená z bunky slabou effluxnou pumpou. Protónovaná POA v kyslom prostredí opäť vstupuje do baktérie a kumuluje sa, pretože effluxná pumpa je neúčinná, a spôsobuje zníženie intracelulárneho pH a poškodenie bunky²³. Inhibuje transportné membránové funkcie a rozvracia membránový potenciál²⁴, inaktivuje syntázu mastných kyselín²⁶.

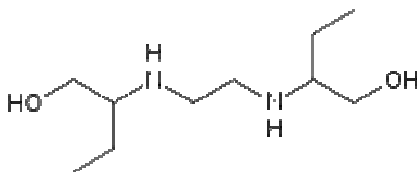
- účinnosť PZA *in vitro* zvyšujú niektoré slabé kyseliny – kyselina benzoová, sorbová, ale kyseliny salicylová či mliečna takéto účinky nemajú. Jeho efekt zvyšuje UV žiarenie, ktoré pravdepodobne poškodzuje membránu, a inhibítory energetického metabolizmu – dinitrofenol, valinomycín a KCN. Aktivita je výraznejšia voči perzistujúcim formám, slabá voči rastúcim baktériám²⁵.

- rezistencia MT voči PZA je spôsobená mutáciou génu kódujúceho tvorbu PZAasy, pretože nedochádza ku kumulácii POA v bunke²⁶. PZA nepôsobí na *M. bovis* a *M. leprae*. *M. smegmatis* je odolná vďaka efektívnemu effluxnému systému, ktorý bráni hromadeniu POA v bunke²⁶.

- nežiaduce účinky: dna, gastrointestinálne problémy, poškodenie pečene¹⁶, erytém²

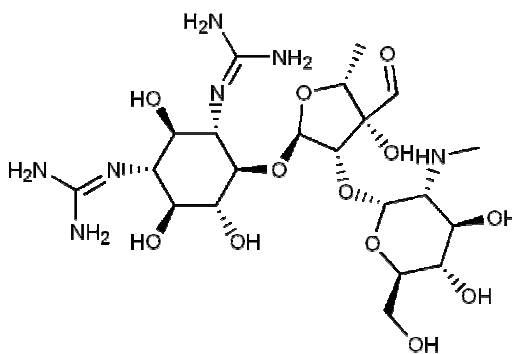
Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Etambutol



- bakteriostatická látka, derivát etyléndiamínu²⁰
- zasahuje do syntézy lipoarabinomannanu, ktorý je dôležitou zložkou mykobakteriálnej bunkovej steny²⁰
- pri podávaní etambutolu sa môžu vyskytnúť poruchy videnia – videnie červenej a zelenej farby²⁰, poškodenie očného nervu, ďalej nevoľnosť, zvracanie, bolesti hlavy, dezorientovanosť, alergické kožné reakcie, hepatotoxicita²⁷
- nesmie sa podávať ženám v období gravidity a laktácie, deťom, u pacientov s poškodením očného nervu a pri precitlivenosti na etambutol²⁷
- vhodný k liečbe TBC predovšetkým v prípadoch, keď počas terapie tohto ochorenia kombináciou isoniazid, rifampicín a pyrazínamid vznikla na jednu z látok rezistencia²⁷
- môže byť súčasťou liečebného režimu počas iniciálnej i pokračovacej fázy liečby TBC¹³

Streptomycín



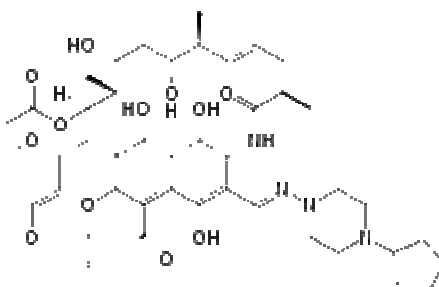
- baktericídna látka^{13, 20}, patrí medzi aminoglykozidové antibiotiká, produkuje ho *Streptomyces griseus*²⁰
- má polárnu bázickú molekulu, používa sa vo forme vo vode dobre rozpustného síranu. Po perorálnom podaní sa nevstrebáva, podáva sa injekčne²⁰.
- mechanizmus účinku je založený na inhibícii proteosyntézy bakteriálnej bunky²⁰

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

- v priebehu liečby sa môžu prejavíť jeho neurotoxické účinky na vestibulárny aparát a sluchový nerv, poškodenie sluchu až jeho strata, nefrotoxicita a porucha nervosvalového prenosu²⁰
- podľa niektorých zdrojov je radený do prvej¹³, podľa iných zase do druhej línie AT^{16, 20}

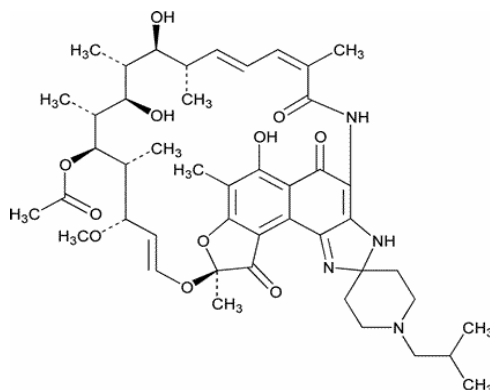
1.4.2 Ďalšie antituberkulotiká

Rifapentín



- mechanizmus účinku je rovnaký ako u rifampicínu¹⁹
- môže byť podávaný intermitentne, avšak jeho podávanie s izoniazidom jedenkrát týždenne v pokračovacej fáze je menej účinné ako podávanie kombinácie rifampicín a izoniazid dvakrát týždenne, a to predovšetkým u pacientov s kavitárnou TBC. U pacientov s HIV sa naň často vyskytuje rezistencia. Preto sa nepodáva pacientom s HIV a TBC kavitami¹⁹.
- je induktorom enzýmu P450, v porovnaní s rifampicínom ho ovplyvňuje v menšej miere, a taktiež urýchľuje svoj vlastný metabolizmus¹⁹
- pri podávaní myšiam v pokračovacej fáze vykazovala kombinácia s moxifloxacínom sterilizačnú aktivitu. Ukazuje sa ako možný kandidát na liečbu latentnej TBC, trojmesačné podávanie kombinácie s izoniazidom alebo moxifloxacínom myšiam s touto formou TBC malo rovnaký výsledok ak šesťmesačná monoterapia izoniazidom¹⁹.
- v roku 1998 bol v USA schválený na liečbu pulmonárnej TBC¹⁸

Rifabutín

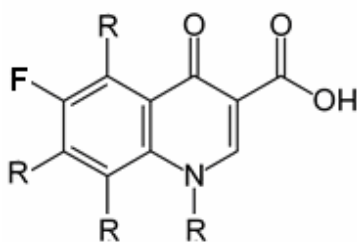


- použitie nachádza v oblasti prevencie a liečby diseminovanej formy ochorenia, ktorú spôsobuje *Mycobacterium avium* komplex, u pacientov infikovaných HIV¹⁸

1.4.3 Nové látky vo vývoji

TB Alliance predstavuje neziskové partnerstvo subjektov urýchľujúce objavovanie a rozvoj nových potenciálnych AT, do ktorých sa vkladá nádej, že budú schopné skrátiť dobu liečby, budú účinné ako voči senzitívnym tak i rezistentným kmeňom baktérií, kompatibilné s antiretrovírusovými liečivami a zlepšia liečbu latentných foriem TBC^{18, 19}.

Chinolóny



- skupina týchto chemoterapeutík je aktívna voči MT a má potenciál skrátiť dĺžku liečby TBC¹⁹

- dobre prenikajú do buniek, čo vysvetľuje ich efektivitu voči intracelulárnym mykobaktériám¹⁸

- mechanizmus účinku spočíva v inhibícii pre baktériu esenciálneho enzýmu DNA gyráza, čo má za následok zničenie bunky MT¹⁹

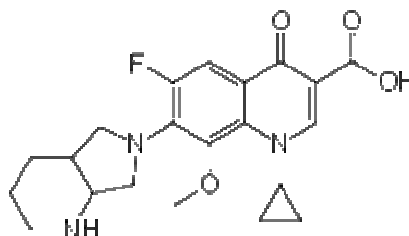
- trieda chinolónov nebola optimalizovaná na využitie v tak špecifickej indikácii ako je TBC. Preto v roku 2003 TB Alliance iniciovala tvorbu projektu s cieľom identifikovať

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

novú generáciu zlúčenín s lepšou efektívnosťou voči TBC, nájst' také inhibítory DNA gyrázy, ktoré budú pri zachovaní bezpečnosti a tolerovateľnosti schopné skrátiť terapiu TBC, prípadne budú použiteľné v liečbe rezistentných foriem a u pacientov liečených antiretrovírusovými liečivami. Bolo pripravených viac ako 600 látok, z ktorých dve postúpili do preklinickej fázy – TBK-613 a TBK-544 (záložná látka)¹⁹.

- horúcimi kandidátmi na skrátenie liečebného režimu sú moxifloxacín a gatifloxacín, majú vysokú baktericídnu aktivitu. Zatiaľ čo sa v klinických hodnoteniach zisťuje potenciál týchto látok skrátiť dĺžku terapie, nová generácia chinolónov, vrátane látky TBK-613, je skúmaná v preklinickej fáze¹⁸.

Moxifloxacín



- látka tretej generácie chinolónov, s preukázanou sterilizačnou aktivitou voči MT, s potenciálom skrátiť potrebnú dĺžku terapie TBC, derivát 8-metoxifylorochinolónu. Je účinný v liečbe niektorých respiračných a kožných infekcií. Pozitívom je minimálny vplyv na cytochróm P450¹⁹.

- výsledky niektorých štúdií na zvieratách ukázali aktivitu tejto látky voči MT a naznačili, že náhrada niektorého z používaných liečiv za moxifloxacín by mohla viesť k skráteniu dĺžky liečby TBC¹⁹. Konkrétne vo výsledkoch štúdie zverejnenej v roku 2004 bola pri podávaní myšiam zistená rýchlejšia konverzia spúta u tej skupiny, u ktorej bol izoniazid v štandardnom šesťmesačnom režime nahradený moxifloxacínom²⁸.

- v druhej fáze klinického hodnotenia bola porovnávaná úspešnosť úvodnej liečby TBC v dvojito zaslepenej randomizovanej štúdií²⁹. V nemocnici v Rio de Janeiro bol dospelým pacientom, u ktorých bola preukázaná prítomnosť MT v spúte, podávaný izoniazid, rifampicín, pyrazinamid v štandardných dávkach²⁹. K nim dostávala polovica pacientov počas piatich dní v týždni po dobu ôsmich týždňov moxifloxacín a druhá etambutol. Po skočení tejto doby bolo hodnotené spútum – u 80 % pacientov s moxifloxacínom bolo

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

negatívne, v porovnaní so 63 % pacientov s etambutolovým režimom. Tak autori poukázali na to, že moxifloxacín zlepšil konverziu spúta v iniciálnej fáze liečby TBC²⁹.

- v inej, podobne koncipovanej štúdií, kde dospelí pacienti dostávali AT trikrát alebo päťkrát týždenne, bolo preukázané, že pridanie moxifloxacínu k spomínanej trojkombinácii liečiv vykazuje sterilizačnú aktivitu, ale len nepravdepodobne dovolí významne skrátiť dĺžku liečby TBC. Po dvoch mesiacoch podávania spomínaných štvorkombinácií liečiv došlo v oboch skupinách k rovnakému výsledku, a to ku konverzii spúta u 71 % pacientov³⁰. Avšak po štyroch týždňoch liečby došlo ku konverzii spúta u 37 % pacientov liečených moxifloxacínom v porovnaní s 26 % pacientov užívajúcimi etambutol¹⁸.

- momentálne sa nachádza v tretej fáze klinického hodnotenia. Hodnotia sa dva liekové režimy, v oboch prípadoch ide o štvorkombinácie liečiv, z ktorých v jednom nahrádza moxifloxacín etambutol, v druhom izoniazid, a sú podávané po dobu štyroch mesiacov. Výsledky tohto hodnotenia určia, ako štvormesačný režim obstojí v porovnaní so štandardným šesťmesačným – do úvahy sa berie množstvo relapsov, zlyhania a bezpečnosť terapie¹⁹.

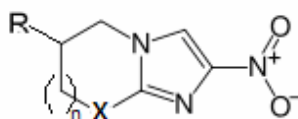
TBK-613

- syntetická látka s antimikrobiálnym účinkom. Je baktericídne účinná voči replikujúcim i nereplikujúcim sa formám MT, má dobrú biologickú dostupnosť po perorálnom podaní a schopnosť vstúpiť do makrofágov¹⁹.

- má ako *in vitro*, tak aj *in vivo* účinnosť voči MT, akceptovateľnú toxicitu. *In vitro* je TBK-613 štyrikrát až osemkrát účinnejšia ako moxifloxacín a schopná rýchlejšie eliminovať MT z pľúc laboratórnej myši ako porovnateľné dávky moxifloxacínu. To, či látka vstúpi do klinickej fázy, závisí od výsledkov prebiehajúceho preklinického hodnotenia¹⁹.

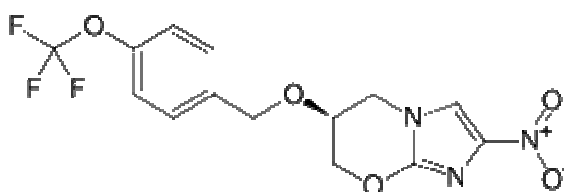
Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Nitroimidazoly



- trieda antibakteriálnych látok odvodených od prírodného produktu azomycínu. Štruktúrne obmeny viedli k vzniku metronidazolu a ďalších látok prvej generácie, ďalšie výskumy k objavu látky PA-824. Cieľom TB Alliance je nájdenie zlúčenín s lepšími vlastnosťami ako má PA-824, čiže rozvoj druhej generácie látok s vyšším potenciálom a efektivitou v boji s TBC¹⁹.

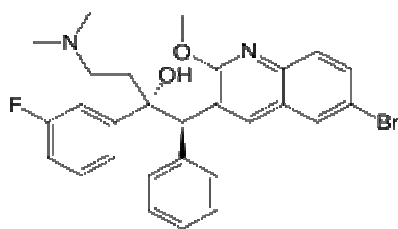
PA-824



- nitroimidazolový derivát. *In vitro* vykazuje aktivitu voči senzitívnym i rezistentným kmeňom MT. Nepôsobí na CYP450, nie je mutagénny. Po prvej fáze klinického hodnotenia, kde sa látka ukázala ako dobre tolerovaná, vstúpila v roku 2007 do druhej fázy, kde bola látka podaná pacientom infikovaným MT. Po dvojtýždňovej monoterapii bola hodnotená jej schopnosť zabiť baktérie v spúte. Výsledok bol povzbudzujúci, naznačujúci, že už nižšie dávky, ako sa pôvodne predpokladalo, môžu priniesť očakávaný výsledok. Viac ako na rok boli klinické štúdie pozastavené, zatiaľ čo boli zisťované výsledky toxicity na zvieratách. Ďalšie klinické štúdie budú zahŕňať testovanie látky PA-824 v kombinácii s ďalšími AT a hodnotenie jej potenciálu zlepšiť terapiu TBC¹⁹.

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

TMC207 (R 207910, Compound J)



- derivát diarylchinolínu. Má špecifický mechanizmus účinku – cieľom pôsobenia je enzým ATP-syntáza baktérie. Preto sa očakáva, že táto látka by mohla byť aktívna aj voči rezistentným MT. Tieto očakávania potvrdilo preklinické hodnotenie, kde sa ukázala aj baktericídna aktivita a sterilizačné vlastnosti TMC207. V prvej fáze klinického hodnotenia bola objavená významná a na dávke závislá, ale oneskorená, baktericídna aktivita v spúte¹⁹. V druhej fáze hodnotenia boli pacienti (47 pacientov, u ktorých bola novo diagnostikovaná pľúcna MDR-TB) rozdelení do dvoch skupín, kde jedna dostávala štandardnú liečbu obsahujúcu AT druhej línie s TMC207, druhá s placebom³¹. Po ôsmich týždňoch podávania bolo spútum negatívne u 48 % pacientov s TMC207 v porovnaní s 9 % pacientov s placebom³¹. Pridanie TMC207 k štandardnej terapii MDR-TB malo za následok skrátenie doby potrebnej na konverziu spúta na negatívne a zároveň spôsobilo nárast podielu pacientov u ktorých k tejto premene došlo³¹. Pokračuje hodnotenie bezpečnosti a efektivity tejto látky v kombinácii s ďalšími AT, kde po šiestich mesiacoch režimu, ktorý bude obsahovať aj TMC207, bude nasledovať ďalších 6 – 12 mesiacov liečby bez tejto látky. Pacienti budú sledovaní 24 mesiacov po terapii a monitorovaní vzhľadom k výskytu relapsov a bezpečnosti liečby¹⁹.

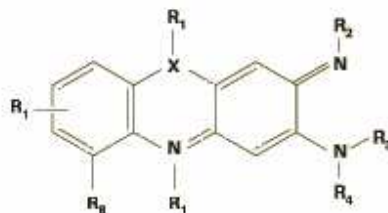
InhA inhibítory

- enzým InhA predstavuje cieľ zásahu skupiny vyvíjaných látok, ktoré by v budúcnosti mohli potenciálne nahradiť izoniazid. Nová látka by mala byť podávaná perorálne, dobre tolerovaná a mať malú schopnosť podnecovať MT ku vzniku rezistencie na ňu. V štádiu identifikácie prebiehal skrining knižnice nasyntetizovaných zlúčenín. Prvý výstup priniesol niekoľko zlúčenín, ktoré inhibovali izolovaný enzým InhA, ale boli menej efektívne v zničení celých buniek MT a v liečbe myší s TBC. Ďalší skrining priniesol látky s účinkom voči celým bunkám MT. Upresňovanie, uhladzovanie ich analógov pokračuje

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

s dôrazom na ich metabolickú stabilitu. V súčasnej dobe sa InhA inhibítory nachádzajú vo fáze optimalizácie, ktorá má za cieľ zlepšiť ich silu voči MT *in vitro* i efektivitu *in vivo*¹⁹.

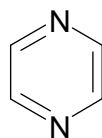
Riminofenazíny



- sú to látky efektívne v liečbe mykobateriálnych infekcií ako je lepra. Sú málo rozpustné a môžu spôsobiť nežiaduce kozmetické vedľajšie účinky, kožné diskolorácie. Momentálne je výskum zameraný na prípravu nových a efektívnejších zlúčenín tejto skupiny. Predpokladá sa, že mechanizmus ich účinku spočíva v inhibícii energetického metabolizmu baktérií, ktorý je potrebný i u pomaly rastúcich, perzistujúcich MT. Preto by mohli tieto látky prispieť ku skráteniu dĺžky liečebných režimov. Nevykazujú skříženú rezistenciu so žiadnou skupinou AT, mohli by byť potenciálne využiteľné v liečbe rezistentných foriem TBC. Taktiež neinteragujú s cytochrómom P450, čiže by mohli byť podávané pacientom s TBC i HIV infekciou spolu s antiretrovírusovými látkami. Výskum sa nachádza v štádiu identifikácie nových látok. Bolo pripravených viac ako 230 zlúčenín, ktoré boli testované na *in vitro* aktivitu voči MT. Niekoľko látok ukázalo zlepšené farmakokinetické vlastnosti a výbornú efektivitu pri podávaní laboratórnym myšiam. Ďalej bude nasledovať fáza optimalizácie vedúca k zlepšeniu bezpečnosti, tolerovateľnosti a *in vitro* aktivity voči MT¹⁹.

2 Teoretická časť

2.1 Pyrazín



1,4-diazín je látka so symetrickou molekulou, je slabou dvojsýtnou bázou a má slabý aromatický charakter³², prítomnosť dusíkov znižuje elektrónovú hustotu na uhlíkoch. Poskytuje nukleofilné substitučné reakcie do polohy 2³³. Jeho deriváty sa vyskytujú v prírode - sú produktom niektorých plesní, ako feromóny a signálne látky sa uplatňujú u hmyzu a v rastlinnej ríši. Syntetické látky sa využívajú ako ochucovadlá a vonné látky v potravinárstve a voňavkárskom odvetví³².

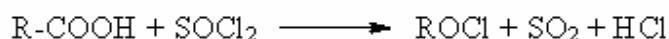
Niektoré deriváty pyrazínu sú toxické, vznikajú napríklad zahrievaním zmesi sacharidov, aminokyselín a kreatínínu. Iné deriváty majú zase priaznivé účinky. Pyrazínové zoskupenie vo svojej molekule obsahuje antituberkulotikum pyrazínamid, antidiabetikum glipizid, hypnotikum zopiklon, kálium šetriace diuretikum amilorid, či ďalšie novo vyvíjané látky s potenciálnym uplatnením ako antineoplastiká - pyrazíndiazohydroxid, antivirotiká - T705³².

2.2 Príprava acylhalogenidov

Acylhalogenidy sú najreaktívnejšie deriváty karboxylových kyselín. Možno ich pripraviť reakciou karboxylovej kyseliny s halogenidmi fosforu a síry - s chloridom fosforečným, fosforitým, s chloridom tionylu - PCl_5 , PCl_3 , SOCl_2 ^{33,34}.



Najvýhodnejšie je použitie tionylchloridu - vznikajú ľahko odstrániteľné plynné vedľajšie produkty. Chlorid kyseliny tak možno použiť priamo, bez ďalšieho čistenia³⁴.



Táto reakcia prebieha mechanizmom intramolekulovej nukleofilnej substitúcie alebo $\text{S}_{\text{N}}2$ mechanizmom³³.

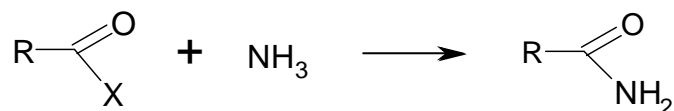
Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Acylhalodenidy vďaka svojej reaktivite slúžia na prípravu ostatných derivátov karboxylových kyselín^{33,34}.

2.3 Príprava amidov karboxylovej kyseliny

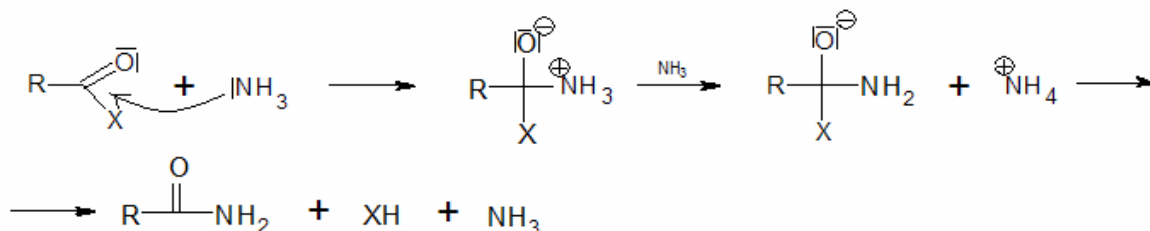
Amidy karboxylových kyselín sú kryštalické látky, majú vysoké teploty topenia. Sú polárne, v neutrálnom prostredí sa chovajú neutrálne, v kyslom ako slabé zásady, v zásaditom ako slabé kyseliny³³.

Najpoužívanejším spôsobom prípravy amidov karboxylových kyselín je aminolýza. Pri nej dochádza k reakcii medzi acylačným činidlom (halogenidom, anhydridom, esterom, azidom) a amoniakom, primárnym alebo sekundárnym amínom³³.



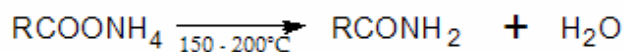
X je halogén (Cl, Br), RCOO, OR, N₃.

Mechanizmus tejto reakcie je nukleofilná substitúcia³³.



Medzi ďalšie možnosti prípravy patrí:

- tepelný rozklad amóniových solí karboxylových kyselín³³,

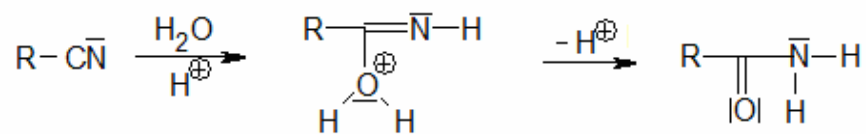


- zohrievanie karboxylovej kyseliny s močovinou³³,

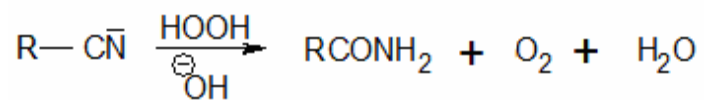


Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

- čiastočná hydrolýza alkylkyanidu v kyslom prostredí v miernych podmienkach³³,



- reakcia alkylkyanidu s peroxidom vodíka v zásaditom prostredí³³



3. Experimentálna časť

3.1 Prístroje a chemikálie

Pomocou tenkovrstvovej chromatografie na doskách Merck, Silica gel 60 F₂₅₄, za použitia vyvíjacej sústavy acetón : toluén = 1:1 bol sledovaný priebeh reakcií a čistota látok. Detekcia bola prevedená UV svetlom s vlnovou dĺžkou 254 nm.

Teploty topenia boli stanovené v kapiláre na prístroji Stuart Scientific (SMP3, Bibby Sterling LTD, UK) a nie sú korigované.

Elementárne analýzy CHN na analyzátore EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A, Miláno, Taliansko) previedla pani Hronová na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv FaF UK.

Infračervené spektrá boli merané na prístroji Nicolet 6700 (Smart MIRacle™ ATR ZnSe, Nicolet™ 6700 FT-IR Spectrometer, Thermo Scientific, USA) na Katedre anorganickej a organickej chémie FaF UK pani Ivou Vencovskou. Látky pevného charakteru boli merané vo forme tabliet bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg KBr), vlnočty sú uvádzané v cm⁻¹.

¹H NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pre ¹H a 75,43 MHz pre ¹³C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Nemecko). Merania previedol a spektrá vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny sú vzťahované k Si(CH₃)₄.

Log *P* zlúčenín bol vypočítaný pomocou programu ACD/LogP ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) a Clog *P* pomocou CS ChemOffice Ultra ver. 9.0 (CambredgeSoft, Cambridge, MA, USA).

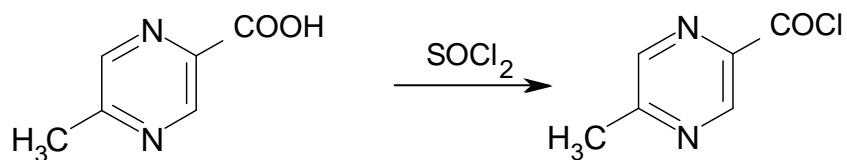
Na výpočet korelácie medzi log *P* a log *K* bol použitý Pearsonov korelačný koeficient v programe Sigmastat ver. 3.1 (SPSS Inc., San Jose, CA, USA).

K tvorbe grafov bol použitý MS Excel ver. 2003 (Microsoft Co, Silicon Valley, CA, USA).

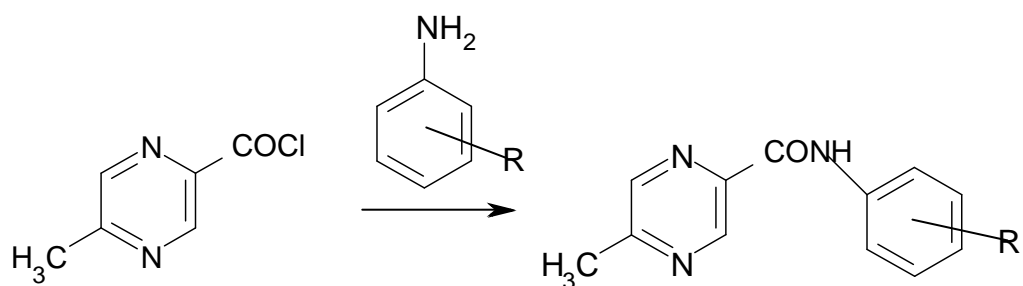
Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

3.2 Schémy prevádzaných reakcií

3.2.1 Schéma prípravy chloridu kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej



3.2.2 Schéma prípravy anilidov 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny



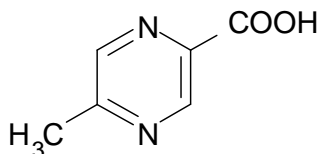
R = 4-OH, 3-OH, 3-CH₃

3-OCH₃, 3-NO₂, 2-CN-4-NO₂

3.3 Postupy prípravy

3.3.1 Východzia látka

Kyselina 5-metylpyrazín-2-karboxylová od firmy Sigma Aldrich.



3.3.2 Príprava chloridu 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

0,005 mol kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej sa rozpustí v 20 ml vysušeného toluénu v banke (objem banky 250 ml) s guľatým dnom. K tomu sa pridá 0,05 mol (3,4 ml) tionylchloridu a banku zahrievame za miešania pod spätným chladičom pri teplote 120-130 °C 45 minút.

Ďalej prevádzame destiláciu za zníženého tlaku na vákuovej odparke s využitím olejového kúpeľa. Tým sa z reakčnej zmesi odstráni nezreagovaný tionylchlorid. Pridaním trochy toluénu na záver tohto procesu sa prevedie azeotropné oddestilovanie zvyškov tionylchloridu. Takto získaný produkt sa ďalej priamo spracováva bez akejkoľvek úpravy.

3.3.2 Príprava anilidov kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej

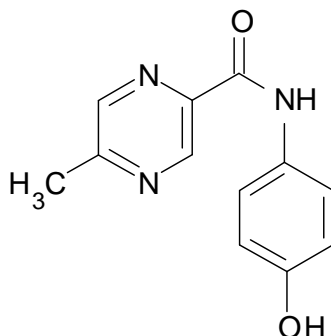
Do Erlenmeyerovej banky s magnetickým miešadlom navážime 0,00167 mol (0,1012 g) bezvodého pyridínu, 0,00167 mol substituovaného anilínu, ktorý rozpustíme v 20 ml bezvodého acetónu, a pridáme roztok chloridu kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej (0,00167 mol) v 10 ml bezvodého acetónu. Túto zmes necháme miešať pri laboratórnej teplote aspoň hodinu. Acetón zo zmesi odstránime destiláciou za zníženého tlaku. K surovému produktu v banke pridáme zmes etanolu a vody, zahrejeme k varu, prefiltrujeme. Získaný filtrát ešte dvakrát čistíme varom s aktívnym uhlím. Filtrát necháme vychladnúť. Produkt odsávame na frite za zníženého tlaku. Takto získavame prečistený produkt. Ten je podrobený meraniu teploty topenia a kontrole pomocou TLC.

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

3.4 Pripravené anilidy kyseliny 5-metylpyrazín-2-karboxylovej, ich vlastnosti

3.4.1 (4-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

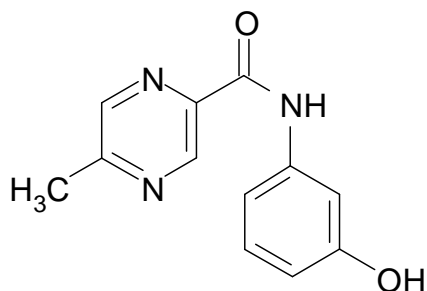
Látka č. 1



Sumárny vzorec	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂
Výtťažok (g, %)	0,130 g (44 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	229,24
T _t (°C)	125-127
R _f	0,62
Elementárna analýza	vypočítané: C 62,87 %, H 4,84 %, N 18,33 %, O 13,96 % namerané: C 63,08 %, H 5,01 %, N 18,48 %
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3348 (NH), 2977 (metyl), 1662 (C=O), 1602 (fenyl), 1515 (NH), 1381, 1273, 1172, 1037 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	10.39 (1H, bs, NH), 9.30 (1H, bs, OH), 9.11 (1H, d, J=1.1 Hz, H3), 8.65 (1H, d, J=1.1 Hz, H6), 7.69-7.59 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.78-7.69 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.60 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	161.3, 157.1, 154.2, 143.0, 142.8, 142.7, 130.0, 122.3, 115.2, 21.5

3.4.2 (3-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

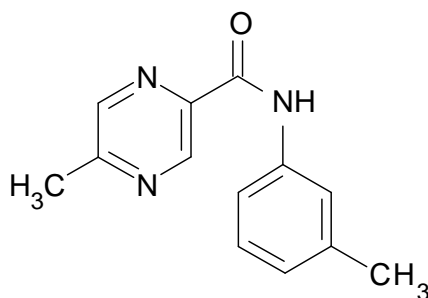
Látka č. 2



Sumárny vzorec	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂
Výtlačok (g, %)	0,150 g (51 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	229,24
T _t (°C)	147-149
R _f	0,67
Elementárna analýza	vypočítané: C 62,87 %, H 4,84 %, N 18,33 %, O 13,96 % namerané: C 62,77 %, H 4,78 %, N 18,15 %
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3325 (NH), 2918 (metyl), 1685 (C=O), 1602 (fenyl), 1546 (NH), 1272, 1164, 1025 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	10.38 (1H, bs, NH), 9.22 (1H, bs, OH), 9.11 (1H, d, J=1.1 Hz, H3), 8.67 (1H, d, J=1.2 Hz, H6), 7.42-6.58 (4H, m), 2.60 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	161.1, 156.4, 155.0, 143.1, 142.6, 142.5, 139.8, 130.8, 129.3, 124.3, 115.6, 21.7

3.4.3 (3-metylfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

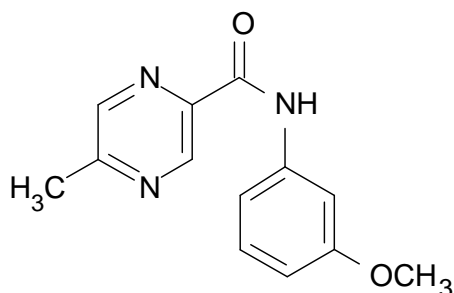
Látka č. 3



Sumárny vzorec	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O
Výťažok (g, %)	0,100 g (34 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	227,27
T _t (°C)	123-124
R _f	0,94
Elementárna analýza	vypočítané: C 68,70 %, H 5,77 %, N 18,49 %, O 7,04 % namerané: C 68,86 %, H 5,89 %, N 18,32 %
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3342 (NH), 2979 (metyl), 1680 (C=O), 1596 (fenyl), 1542 (NH), 1295, 1172, 1026 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	9.39 (1H, bs, NH), 9.11 (1H, d, <i>J</i> =1.1 Hz, H3), 8.85 (1H, d, <i>J</i> =1.1 Hz, H6), 7.63-7.59 (m, H2'), 7.57-7.51 (m, H4'), 7.28 (m, H5'), 7.02-6.97 (m, H6'), 2.61 (3H, s, CH ₃), 2.39 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	164.4, 159.7, 145.0, 141.2, 140.2, 139.1, 137.2, 130.0, 125.3, 120.2, 117.3, 28.4, 21.5

3.4.4 (3-metoxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

Látka č. 4

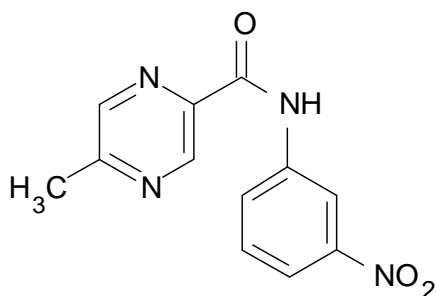


Sumárny vzorec	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₂
Výťažok (g, %)	0,100 g (32 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	243,27
T _t (°C)	114-115
R _f	0,90
Elementárna analýza	vypočítané: C 64,19 %, H 5,39 %, N 17,27 %, O 13,15 % *
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3343 (NH), 2929 (metyl), 1671 (C=O), 1597 (fenyl), 1532 (NH), 1267, 1163, 1026 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	9.39 (1H, bs, NH), 9.13 (1H, d, J=1.1 Hz, H3), 8.68 (1H, d, J=1.37 Hz, H6), 8.63-8.59 (m, H2'), 7.37-7.31 (m, H4'), 7.11 (m, H5'), 7.06-7.03 (m, H6'), 2.60 (3H, s, CH ₃), 2.41 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	164.2, 158.9, 144.9, 141.1, 140.3, 139.3, 137.1, 130.6, 125.8, 120.5, 118.0, 27.2, 21.4

* do odovzdania rigoróznejskej práce neboli údaje dostupné

3.4.5 (3-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

Látka č. 5

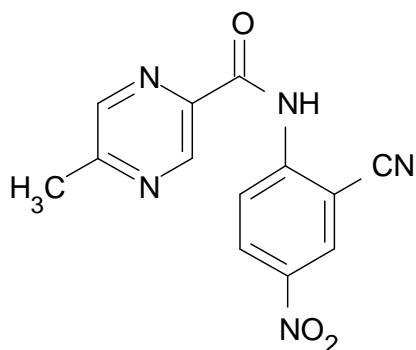


Sumárny vzorec	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₃
Výťažok (g, %)	0,300 g (91 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	258,24
T _t (°C)	111-112
R _f	0,86
Elementárna analýza	vypočítané: C 55,81 %, H 3,90 %, N 21,70 %, O 18,59 % namerané: C 55,70 %, H 3,90 %, N 21,67 %
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3338 (NH), 2928 (metyl), 1683 (C=O), 1620 (fenyl), 1528 (NH), 1340, 1278, 1149, 1029 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	11.19 (1H, s, NH), 9.16 (1H, d, J=1.3 Hz, H3), 8.94 (1H, t, J=2.1 Hz, H2'), 8.71 (1H, d, J=1.3 Hz, H6), 8.33-7.26 (1H, m, H4'), 8.00-7.94 (1H, m, H6'), 7.64 (1H, t, J=8.2 Hz, H5'), 2.63 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	162.8, 157.8, 148.1, 143.5, 143.0, 142.0, 139.7, 130.2, 126.8 118.8, 114.9, 21.7

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

3.4.6 (2-kyano-4-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny

Látka č. 6



Sumárny vzorec	C ₁₃ H ₉ N ₅ O ₃
Výťažok (g, %)	0,140 g (39 %)
Molekulová hmotnosť (g/mol)	283,25
T _t (°C)	204-205
R _f	0,84
Elementárna analýza	vypočítané: C 55,13 %, H 3,20 %, N 24,73 %, O 16,95 % namerané: C 55,40 %, H 3,44 %, N 24,57 %
IČ spektrum (KBr), (cm ⁻¹)	3328 (NH), 2929 (metyl), 2229 (CN), 1685 (C=O), 1600 (fenyl), 1505 (NH), 1320, 1267, 1123, 1083 (pyrazín)
¹ H NMR (300 MHz, DMSO), (δ)	9.39 (1H, bs, NH), 9.11 (1H, d, J=1.1 Hz, H3), 8.75 (1H, d, J=1.1 Hz, H6), 8.57-8.51 (m, H5'), 8.36 (d, H6'), 7.54 (m, H3'), 2.39 (3H, s, CH ₃)
¹³ C NMR (75 MHz, DMSO), (δ)	166.4, 160.2, 145.8, 143.6, 140.7, 139.2, 138.4, 137.8, 130.1, 125.2, 121.2, 116.3, 21.5

4. Biologické hodnotenie

4.1 Antituberkulotická aktivita

Aktivita látok voči kmeňu *M. tuberculosis* H₃₇Rv bola testovaná v USA v rámci medzinárodného programu TAACF, zameraného na hľadanie nových potenciálnych AT³⁵.

Testovanie látok prebiehalo *in vitro* metódou na kmeni *M. tuberculosis* H₃₇Rv v BACTEC 12B médiu za použitia Microplate Alamar Blue Assay (MABA) v zriedeniach 100 µg/ml až 0,19 µg/ml.

IC₉₀ je koncentrácia testovanej látky spôsobujúca zníženie fluorescence o 90 % v porovnaní s kontrolou, IC₅₀ koncentrácia látky spôsobujúca zníženie fluorescence o 50 % v porovnaní s kontrolou. Za antituberkuloticky aktívnu sa látka považuje vtedy, ak je percento inhibície väčšie alebo rovné 90 %, čiže je hodnota IC₉₀ ≤ 10 µg/ml. Takéto látky sa ďalej hodnotia, určuje sa ich MIC hodnota a zároveň cytotoxicita vyjadrená ako CC₅₀ (cell cytotoxicity). MIC je najnižšia koncentrácia látky spôsobujúca zníženie fluorescence o 90 % v porovnaní s kontrolou. CC₅₀ vyjadruje 50% inhibičnú koncentráciu látky, cytotoxicitu testovanú na VERO bunkách po 72 hodinovej expozícii odčítanú z grafu závislosti dávky látky na vyvolanej odpovedi. Uvedením týchto dvoch hodnôt do pomeru sa získava index selektivity (SI). Ak je SI ≥ 10, látka sa považuje za aktívnu³⁵.

Výsledky hodnotenia sú zhrnuté v tejto tabuľke:

Látka	Aktivita	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₉₀ (µg/ml)
1	neaktívna látka	>100	>100
2	neaktívna látka	>100	>100
3	slabo aktívna	66,191	>100
4	slabo aktívna	13,936	25,894
5	slabo aktívna	25,190	50,961
6	slabo aktívna	24,011	27,526

4.2 Antimykotická aktivita

Šesť nových pyrazínových derivátov bolo podrobených testovaniu antifungálnej aktivity metódou *in vitro* na Katedre biologických a lekárskech vied FaF UK v Hradci Králové.

Bol použitý mikrodilučný bujónový test. Skúšaná látka bola dvojito riedená v roztoku RPMI 1640 (Rockwell Park Memorial Institute) s glutamínom, pH bolo upravené na hodnotu 7,0 za použitia 0,165 molárneho roztoku kyseliny 3-(morfolino)propánsulfónovej (MOPS). Látky dosahovali v týchto roztokoch koncentrácie v rozmedzí 0,975 – 1000 $\mu\text{mol/l}$. Inkubácia prebiehala pri 35 °C, staticky, v tme, v humidnej atmosfére po dobu 24 až 48 hodín, v prípade *Trichophyton mentagrophytes* 72 až 120 hodín. MIC (MIC = IC₈₀, 80 % inhibície kontroly) bola stanovená vizuálne, fotometricky od 540 nm oproti kontrole bez testovanej látky.

Aktivita bola testovaná voči týmto kmeňom: *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon asahii* 1188 (TA), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

Účinnosť látok môžeme porovnať s antimykoticky pôsobiacim flukonazolom, ktorého hodnoty MIC/IC₈₀ sú uvedené v tejto tabuľke:

Testované kmene	MIC/IC ₈₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
Dĺžka inkubácie	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	72h
	48h	48h	48h	48h	48h	48h	48h	120h
flukonazol	0,8	1,6	52,2	13,1	3,3	>418	>418	26,1
	1,6	>418	104,5	52,2	6,5	>418	>418	52,2

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

KMEŇ (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (číslo) –MIC/IC ₈₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)					
		1	2	3	4	5	6
CA	24h	>500	125	>250	125	250	500
	48h	>500	250	>250	250	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
CK	24h	>500	250	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	500	>250	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>250	>500	>500	500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>250	500	>500	250
	120h	>500	>500	>250	500	>500	500

Pozn. – hrubo zvýraznené hodnoty MIC/IC₈₀ sa nachádzajú v testovanom rozmedzí koncentrácií.

4.3 Herbicídna aktivita

Herbicídna aktivita derivátov 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny bola testovaná *in vitro* metódou prostredníctvom merania inhibície prenosu elektrónov v chloroplastoch špenátu. Hodnotenie prevádzala v chemickom ústave Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave pani doktorka Katarína Kráľová, CSc.

Testovanie inhibície prenosu elektrónov pri fotosyntéze v chloroplastoch špenátu (*Spinacia oleracea*), pripravených metódou podľa Walkera³⁶, prebiehalo spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany). V súlade s metodikou podľa Kráľovej bol ako akceptor elektrónov použitý 2,6-dichlorfenol-indofenol (DCIPP)³⁷. Z dôvodu nízkej rozpustnosti vo vode boli skúšané látky rozpustené v dimetylsulfoxide s maximálnou koncentráciou 4 %, ktorá neovplyvňuje fotochemické pochody v chloroplastoch špenátu. Hodnota IC₅₀ vyjadruje inhibičnú účinnosť látok - molárnu koncentráciu testovanej látky spôsobujúcu 50% pokles produkcie kyslíka oproti kontrolnej skupine (bez pridania testovaných látok). Ako štandard bol použitý selektívny herbicíd DCMU (DCMU- systematicky: 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimetylurea). Jeho IC₅₀ má hodnotu 0,0019 mmol.dm⁻³³⁸.

Vzorka	Log(1/IC ₅₀)	IC ₅₀ (mmol.dm ⁻³)
1	neúčinná	-
2	nedá sa vyhodnotiť	-
3	nestanovená	-
4	neúčinná	-
5	3,3966	0,402
6	3,2597	0,550

5. Diskusia

Katedra farmaceutickej chémie a kontroly liečiv sa dlhodobo zaoberá štúdiom derivátov pyrazínu, ktorého súčasťou je zisťovanie antituberkulotickej, antimykotickej a herbicídnej aktivity pripravených látok. Moja rigorózna práca prispela k rozšíreniu spektra testovaných látok.

Pripravila som 6 derivátov pyrazínu. Východnou látkou bola 5-metylpyrazín-2-karboxylová kyselina, ktorá po reakcii s tionylchloridom poskytla chlorid. Ten som nechala zreagovať s príslušným anilínom za vzniku anilidu spomínanej kyseliny.

Výťažky reakcií sa nachádzali v rozmedzí od 32 % do 92 % v závislosti na reaktivite anilínu a stratách pri prečisťovaní produktu.

Získané látky boli charakterizované teplotou topenia, podrobené tenkovrstvovej chromatografii, IČ spektrometrii, elementárnej analýze, ^1H a ^{13}C NMR spektrometrii.

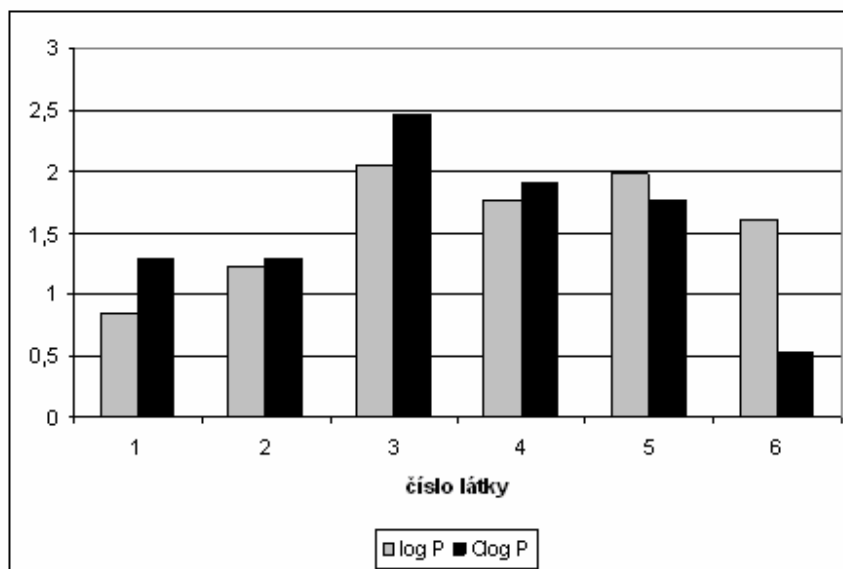
U testovaných látok bol zisťovaný parameter lipofility $\log P$, látky s $P > 1$ a $\log P > 0$ sú lipofilné, látky s $P < 1$ a $\log P < 0$ sú hydrofilné³⁹.

$\log P$ je logaritmus rozdeľovacieho koeficientu v sústave n-oktanol/voda. $\text{Clog } P$ je logaritmus rozdeľovacieho koeficientu v sústave n-oktanol/voda, pri ktorého výpočte sa berú do úvahy aj chemické interakcie. Hodnoty $\log P$ pripravených látok sa nachádzajú v rozmedzí od $0,85 \pm 0,40$ do $2,06 \pm 0,40$, $\text{Clog } P$ od 0,536402 do 2,46248.

Hodnoty $\log P$, $\text{Clog } P$ aj $\log K$ sú uvedené v tejto tabuľke:

číslo látky	$\log P$	$\text{Clog } P$	$\log K$
1	$0,85 \pm 0,40$	1,29648	0,44
2	$1,24 \pm 0,40$	1,29648	0,4708
3	$2,06 \pm 0,40$	2,46248	0,5763
4	$1,76 \pm 0,41$	1,90164	0,5037
5	$1,98 \pm 0,41$	1,7741	0,5125
6	$1,62 \pm 0,46$	0,536402	0,5524

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

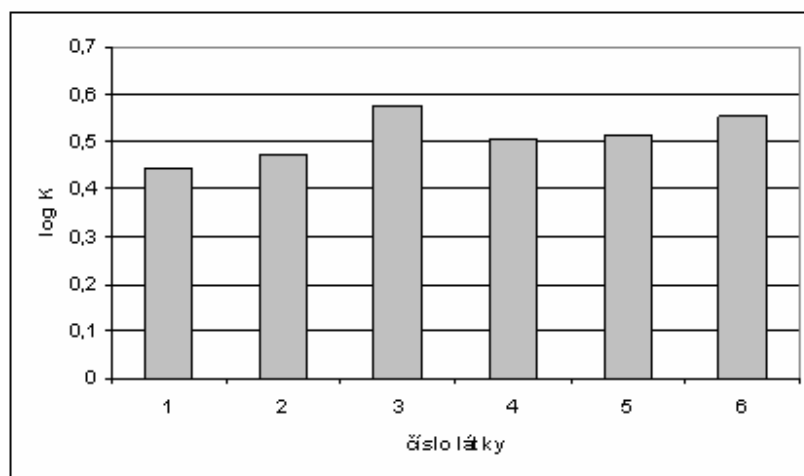


Graf č. 2: znázornenie hodnôt log *P* a Clog *P* u jednotlivých látok

Kapacitný faktor *K* bol zistený za použitia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie pomocou chromatografu Waters Alliance 2695 XE a detektora Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Mobilná fáza s prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min bola zložená zo zmesi metanolu (70 %) a vody (30 %), stacionárnou bola C₁₈ reverzná fáza. 30 µl roztoku vzorky s teplotou 10 °C bolo nastreknutých na kolónu s teplotou 30 °C. Detekcia prebiehala pri vlnovej dĺžke 210 nm.

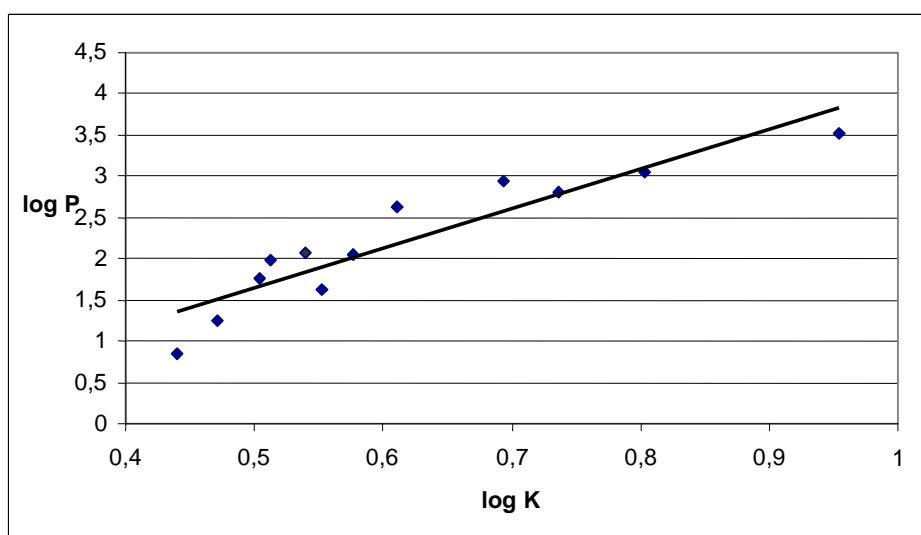
Na výpočet kapacitného faktora *K* bol použitý Millennium32^R Chromatography Manager Software a vzorec $K = (T_R - T_D) / T_D$, kde T_R (vzdialenosť pozdĺž základnej línie od miesta nastreknutia ku kolmici vedenej z vrcholu hodnoteného píku) je retenčný čas v minútach, T_D je mŕtvy čas (vzdialenosť pozdĺž základnej línie medzi bodom nastreknutia a kolmicou spustenou z vrcholu píku zodpovedajúceho nezadržovanej zložke, v našom prípade ju predstavoval metanolvý roztok KI). Hodnoty log *K* sú vypočítané z hodnôt kapacitného faktora *K*.

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá



Graf č. 3: znázornenie hodnôt log K u jednotlivých látok

Ako log P , tak i log K , vyjadrujú lipofilitu látky. Vzťah medzi nimi je znázornený na grafe č. 4 – lineárna závislosť log P na log K . Na jeho hodnotenie som použila súbor dvanástich látok (šesť látok z mojej diplomovej práce¹ a šesť z rigoróznej práce), aby bol súbor porovnávaných hodnôt čo najväčší. Štatistické parametre tejto korelácie ($r = 0,926$; $P < 0,0001$; $n = 12$) potvrdzujú výskyt vzťahu medzi experimentálne zistenými hodnotami log K a vypočítanými hodnotami log P .



Graf č. 4: znázornenie závislosti log P na log K u pripravených látok

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

Látka číslo 3, ktorá má najnižšiu molekulovú hmotnosť a v štruktúre prítomné dve metylové skupiny, je zároveň najlipofilnejšia - má hodnotu $\log P$ 2,06 a experimentálne zistenú hodnotu $\log K$ 0,5763. Látky číslo 1 a 2 s rovnakou molekulovou hmotnosťou sa líšia svojou lipofilitou, hodnota $\log P$ i $\log K$ je vyššia u látky číslo dva, čiže u molekuly s hydroxylovou skupinou v polohe 3 na benzénovom jadre anilidu. U látok číslo 4, 5 a 6 stúpa hodnota $\log K$ spolu s rastúcou molekulovou hmotnosťou.

Antifungálna, antimykotická a herbicídna aktivita, ktorá bola u pripravených látok testovaná, závisí od ich vlastností fyzikálochemických (napríklad vytváranie vodíkových väzieb látky s inými molekulami, jej prechod cez membrány buniek, väzba na tukovité materiály) a stérických (napríklad uhly medzi chemickými väzbami, vzdialenosti medzi atómami, druhy atómov zastúpené v molekule)³⁹. Na hodnotenú biologickú aktivitu má významný vplyv lipofilita, čo sa vysvetľuje kinetikou transportu liečiva v biologických systémoch a rozdelením látky v rôznych častiach biologického objektu³⁹. Po získaní výsledkov biologického hodnotenia som sa snažila tento vzťah medzi aktivitou a lipofilitou popísať.

Antimykobakteriálna aktivita

Pripravené látky vykázali rôznu mieru aktivity voči *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Žiadna z látok nebola aktívna, teda s hodnotou $IC_{90} \leq 10 \mu\text{g/ml}$, nebola teda u nich zisťovaná hodnota CC_{50} a index selektivity. Ako slabo aktívne boli označené látky s hodnotou IC_{50} menšou ako 100 $\mu\text{g/ml}$.

Neaktívne látky číslo 1 a 2 majú zo všetkých testovaných látok najnižšiu hodnotu $\log P$ i $\log K$. Najlipofilnejšia látka číslo 3 je len slabo aktívna. Látka číslo 4 je najaktívnejšou látkou s hodnotou $\log P$ $1,76 \pm 0,41$.

Ak mám zhrnúť výsledky aktivity v súbore pripravených šiestich látok vzhľadom na ich lipofilitu (vyjadrenú ako $\log P$), tak dve látky najmenej lipofilné (1 a 2) sú neaktívne, dve najlipofilnejšie látky (3 a 5) sú slabo aktívne a zostávajúce dve látky (4 a 6) sú taktiež slabo aktívne, ale najaktívnejšie z celého súboru. Na posúdenie vplyvu lipofility na antimykobakteriálnu aktivitu ale toto malé množstvo pripravených látok nestačí.

Antimykotická aktivita

Z výsledkov hodnotenia antimykotickej aktivity vyplýva, že aktivitu voči kmeňu *Candida albicans* vykazujú látky číslo **2**, **4**, **5** a **6**. Najvyššia je u prvých dvoch menovaných látok, látky **5** a **6** vykazujú nižšiu aktivitu. U látok s najvyššou a najnižšou hodnotou lipofility (látka číslo **1** a **3**) vyjadrenej ako $\log P$ a $\log K$ nebola nájdená žiadna aktivita voči spomínanému kmeňu a ani voči žiadnemu inému testovanému kmeňu.

Voči kmeňu *Candida krusei* bola aktívna len látka číslo **2**, voči kmeňu *Candida glabrata* látka číslo **6**. Spomínaná látka číslo **6** bola spoločne s látkou číslo **4** aktívna voči kmeňu *Trichophyton mentagrophytes*.

Na základe uvedených výsledkov som nenašla žiaden významný vzťah medzi aktivitou látok a ich lipofilitou. Ako som už spomínala, látky s najvyššími a najnižšími hodnotami lipofilít nevykazovali žiadnu merateľnú aktivitu voči testovaným kmeňom.

Herbicídna aktivita

Úspešne sa podarilo stanoviť herbicídnu aktivitu u dvoch látok, u ostatných to pre ich zlú rozpustnosť v použitom rozpúšťadle možné nebolo.

Dva pripravené deriváty pyrazínu (látky číslo **5** a **6**) sú schopné inhibovať prenos elektrónov v chloroplastoch špenátu v priebehu fotosyntézy. Podľa dosiaľ prevedených štúdií má na tento účinok vplyv lipofilita a prítomnosť elektrón odťahujúcich alebo elektrón akceptujúcich substituentov v molekule^{38,40}.

Látky **5** a **6** mali zo súboru testovaných látok najvyššiu molekulovú hmotnosť. Žiaden vzťah medzi ich aktivitou a lipofilitou nebol objavený. V štruktúre majú obe na rozdiel od ostatných látok prítomnú $-\text{NO}_2$ skupinu, látka číslo **6** aj $-\text{CN}$ skupinu. Tieto skupiny vyvolávajú záporný mezomérny efekt, odčerpávajú elektróny, a tak dochádza v aromatickom systéme k elektrónovému zriedeniu. Na rozdiel od nich skupiny $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$ vykazujú záporný indukčný a kladný mezomérny efekt, ktorý nad ním prevláda, a $-\text{CH}_3$ kladný indukčný efekt.

Výsledky herbicídnej aktivity týchto látok boli prezentované na 12. ročníku Medzinárodnej elektronickej konferencie syntetickej organickej chémie (ECSOC-12)³⁸.

6. Záver

Pri vypracovaní rigorózneho práce som splnila tieto úlohy:

- spracovala som stručný prehľad o tuberkulóze vo svete a v Českej republike, charakteristiku ochorenia, terapiu, používané liečivá a látky v rôznych fázach výskumu, do ktorých sa vkladá nádej, že pomôžu zefektívniť súčasné liečebné režimy tuberkulózy
- zistila som spôsoby prípravy amidov pyrazín-2-karboxylovej kyseliny
- pripravila som tieto v literatúre dosiaľ nepopísané látky:
 1. (4-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
 2. (3-hydroxyfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
 3. (3-metylfenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
 4. (3-metoxifenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
 5. (3-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
 6. (2-kyano-4-nitrofenyl)amid 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny
- uvedené produkty sú charakterizované teplotou topenia, elementárnou analýzou, IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektrami
- produkty boli podrobené *in vitro* biologickému hodnoteniu:
 - získala som údaje o antimykobakteriálnej, antimykotickej a herbicídnej aktivite niektorých látok
- nové látky som charakterizovala aj pomocou $\log P$ a $\text{Clog } P$, ich hodnoty sú znázornené v grafoch a uvedené v tabuľke spolu s hodnotami $\log K$:
 - $\log P$ pripravených látok je v rozmedzí od $0,85 \pm 0,40$ do $2,06 \pm 0,40$, $\text{Clog } P$ od $0,536402$ do $2,46248$
- pokúsila som sa zistiť vzťah medzi štruktúrou, biologickou aktivitou a lipofilitou v uvedenom súbore látok

Zoznam použitej literatúry

1. LEŠŇANSKÁ, K. *Diplomová práca*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Prahe, Hradec Králové 2009
2. TURČÁNI, P. TBC dnes. *Pracov. Lék.* 2009; roč. 61, č. 2, s. 85-91
3. World Health Organization, [online], [cit. 16. augusta 2009]. Dostupné na WWW: <<http://www.euro.who.int/tuberculosis>>
4. Maps, [online], [cit. 19. augusta 2009]. Dostupné na WWW: <<http://maps.maplecroft.com>>
5. World Health Organization, [online], [cit. 19. augusta 2009]. Dostupné na WWW: <<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>>
6. DONALD, P.R., VAN HELDEN, P.D. The global burden of tuberculosis - combating drug resistance in difficult times. *N. Engl. J. Med.* 2009; vol. 23, no. 360, p. 2393-2395
7. Ústav zdravotníckých informácií a statistiky ČR, [online], [cit. 2. októbra 2009]. Dostupné na WWW: <http://www.uzis.cz/download_file.php?file=3553>
8. Ústav zdravotníckých informácií a statistiky ČR, [online], [cit. 2. októbra 2009]. Dostupné na WWW: <http://www.uzis.cz/download_file.php?file=3552>
9. RAJECOVÁ, E., SOLOVIČ, I. Súčasný pohľad na otázky v liečbe tuberkulózy. *Klin. Farmakol. Farm.* 2003; roč. 1, s. 25-28
10. ZATLOUKAL, P. Tuberkulóza. *Lékařské listy*. 2007; č. 2/2007, s. 30-33
11. TRNKA, L., Jak hodnotí globální situaci MDR-TB a XDR-TB Světová zdravotnická organizace a jaké metody doporučuje při jejich zdolávání? *Vakcinologie*. 2009; č. 3, s. 98-100
12. RITZ, N., CURTIS, N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis*. 2009; vol. 89, no. 4, p. 248-251
13. Vestník Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, [online], [cit. 22. septembra 2009]. Dostupné na WWW: <<http://www.health.gov.sk>>
14. DUGAS, D. *500 nejlepších receptů lidové medicíny*. 1. vyd. Ostrava: Knižní expres. 2007. 247 s. ISBN 978-80-7347-035-7
15. KATZUNG, B.G., a kol. *Základní & klinická farmakologie*. 5. vyd. Jinočany: H&H. 1995. 1072 s. ISBN 80-85787-35-0
16. HRDINA, R. *Antituberkulotiká*. Farmakologie – prednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Prahe, Hradec Králové 2007
17. LULLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vyd. Praha: Grada. 2004. 725 s. ISBN 80-247-0836-1
18. VAN DEN BOOGAARD, J., KIBIKI, G.S., KISANGA, E.R., BOEREE, M.J., AARNOUTSE, R.E. New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; vol. 53, no. 3, p. 849-862
19. The Global Alliance for TB Drug Development, [online], [cit. 15. septembra 2008]. Dostupné na WWW: <<http://www.tballiance.org/new/portfolio.php>>
20. HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chémie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum. 2006. 166 s. ISBN 80-246-1169-4
21. VIKRANT, S., AGARWAL, S.K., GUPTA, S., BHOWMIK, D., TIWARI, S.C., DASH, S.C., GULERIA, S., MEHTA, S.N. Prospective randomized control trial of isoniazid chemoprophylaxis during renal replacement therapy. *Transpl. Infect. Dis.* 2005; vol. 7, no. 3-4, p. 99-108
22. NAQVI R, NAQVI A, AKHTAR S, AHMED E, NOOR H, SAEED T, AKHTAR F, RIZVI A. Use of isoniazid chemoprophylaxis in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010; vol. 25, no. 2, p. 634-637
23. ZHANG, Y., MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2003; vol. 7, no. 1, p. 6-21

Deriváty 5-metylpyrazín-2-karboxylovej kyseliny ako potenciálne liečivá

24. ZHANG, Y., WADE, M.M., SCORPIO, A., ZHANG, H., SUN, Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; vol. 52, no. 5, p. 790-795
25. WADE, M.M., ZHANG, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; vol. 58, no. 5, p. 936-941
26. Pyrazinamide. *Tuberculosis.* 2008; vol. 88, no. 2, p. 141-144
27. *Remedia: compendium.* 3. vyd. Praha: Panax. 1999. 772 s. ISBN 80-902126-5-4
28. NUERMBERGER, E.L., YOSHIMATSU, T., TYAGI, S., O'BRIEN, R.J., VERNON, A.N., CHAISSON, R.E., BISHAI, W.R., GROSSET, J.H. Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004, vol. 169, no. 3, p. 421-426
29. CONDE, M.B., EFRON, A., LOREDO, C., DE SOUZA, G.R., GRAÇA, N.P., CEZAR, M.C., RAM, M., CHAUDHARY, M.A., BISHAI, W.R., KRITSKI, A.L., CHAISSON, R.E. Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial. *Lancet.* 2009; vol. 373, no. 9670, p. 1183-1189
30. BURMAN, W.J., GOLDBERG, S., JOHNSON, J.L., MUZANYE, G., ENGLE, M., MOSHER, A.W., CHOUDHRI, S., DALEY, C.L., MUNSIFF, S.S., ZHAO, Z., VERNON, A., CHAISSON, R.E. Moxifloxacin versus ethambutol in the first 2 months of treatment for pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; vol. 174, no. 3, p. 331-338
31. DIACON, A.H., PYM A, GROBUSCH M, PATIENTIA R, RUSTOMJEE R, PAGE-SHIPPI L, PISTORIUS C, KRAUSE R, BOGOSHI M, CHURCHYARD G, VENTER A, ALLEN J, PALOMINO JC, DE MAREZ T, VAN HEESWIJK RP, LOUNIS N, MEYVISCH P, VERBEECK J, PARYS W, DE BEULE K, ANDRIES K, MC NEELEY DF. The Diarylquinoline TMC207 for Multidrug-Resistant Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2009; vol. 360, no. 23, p. 2397-2405
32. DOLEŽAL, M. Léčiva na bázi pyrazinu. *Praktické lékárenství.* 2005; č. 1, s. 16-17
33. DEVÍNSKY, F., a kol. *Organická chemia pre farmaceutov.* 1. vyd. Martin: Osveta. 2001. 751 s. ISBN 80-8063-056-9
34. HRABÁLEK, A., KUBICOVÁ, L., KUNEŠ, J., POUR, M., VINŠOVÁ, J. *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty.* 1. vyd. Praha: Karolinum. 1999. 162 s. ISBN 80-7184-968-5
35. Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, [online], [cit. 10. októbra 2009]. Dostupné na WWW: <<http://www.taacf.org/>>
36. WALKER, D.A. Preparation of higher plant chloroplasts. *In methods in enzymology Part C; S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Ed.; Academic Press: New York, 1980; vol. 69, p. 94-104*
37. KRÁLOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F., SIDOOVÁ, E. Photosynthesis inhibition produced by 2-alkylthio-6-benzothiazoles. *Chem. Pap.* 1992, vol. 46, p. 348
38. DOLEŽAL, M., LEŠŇANSKÁ, K., PEŠKO, M., JAMPÍLEK, J., KRÁLOVÁ, K. Pyrazinecarboxamides, their synthesis and evaluation as potential herbicides. *12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-12).* November 2008, [online], [cit. 2. októbra 2009]. Dostupné na WWW: <<http://www.usc.es/congresos/ecsoc/12/ECSOC12.htm>>
39. NEMEČEK, P., ĎURČEKOVÁ, T., MOCÁK, J., LEHOTAY, J., WAISSER, K. Štúdium vzťahov medzi biologickou aktivitou a fyzikálnochemickými vlastnosťami potenciálnych antituberkulotík. *Nova Biotechnologica.* 2006; č. VI-I, s. 37-48
40. DOLEŽAL, M., KRÁLOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F., MILETÍN, M. The site of action of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acids in the photosynthetic apparatus. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2001, vol. 26, p. 13-20