

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza potenciálních antituberkulotik

**Nikola Eva Mádlová
Královéhradecký kraj**

Hradec Králové, 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza potenciálních antituberkulotik

Synthesis of Potential Anti-tuberculosis Drugs

Autor: Nikola Eva Mádlová
Škola: První soukromé jazykové gymnázium Hradec Králové,
Brandlova 875, 500 03, Hradec Králové
Kraj: Královéhradecký kraj
Konzultanti: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.,
RNDr. Zdeněk Martinec, CSc.
RNDr. Michal Hruška

Hradec Králové

2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Hradci Králové dne 12. 3. 2020

.....

Nikola Eva Mádlová



Práce byla vypracována na Karlově univerzitě v Hradci Králové (Farmaceutická fakulta, Katedra organické chemie a biochemie).

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Galině Karabanovich, Ph.D. za odborné vedení, pomoc v laboratoři, nesmírné množství cenných rad, času a trpělivosti, které mi byla ochotna věnovat jak při psaní teoretické části práce, tak při samotném výzkumu.

Dále bych chtěla vyjádřit vděk doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, PhD. za umožnění laboratorní činnosti na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy a za podnětné rady a připomínky k práci.

V neposlední řadě děkuji i RNDr. Zdeňku Martinci, CSc. a RNDr. Michalu Hruškovi, kteří mi vypomohli s korekturou práce.

ANOTACE

Práce *Syntéza potenciálních antituberkulotik* se zabývá syntézou látek, u kterých je předpoklad aktivity proti patogennímu původci tuberkulózy, mykobakterii *Mycobacterium tuberculosis* a jejím kmenům, jež jsou rezistentní k běžně používaným antituberkulotikům. V teoretické části je popsána charakteristika tohoto infekčního onemocnění, jeho historie, původce, způsob přenosu, formy, diagnostika a způsob léčby.

Praktická část práce je zaměřena na zdokonalení substituovaných tetrazolů, jež nabízí slibné možnosti v léčbě tuberkulózy. V rámci experimentální části této práce jsou podány informace o reakčních krocích a mechanismech syntézy série nových, doposud nepopsaných sloučenin na bázi fenylethyl- a styryl-derivátů tetrazolu. U těchto látek byl studován vliv spojovacího řetězce mezi 3,5-dinitrofenylovým fragmentem a tetrazolovým cyklem na antimykobakteriální aktivitu sloučenin. Dále byl zkoumán vliv polohy substituentu na tetrazolovém cyklu porovnáním aktivity 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů.

Antimykobakteriální aktivita finálních produktů byla zkoumána *in vitro*, jak na standardním kmeni *Mycobacterium tuberculosis*, tak na dalších klinicky izolovaných kmenech mykobakterií. Bylo zjištěno, že ani 1,5- ani 2,5-disubstituované tetrazoly, syntetizované a analyzované v rámci tohoto projektu, neprokázaly vyšší antituberkulotickou aktivitu ve srovnání s předlohovými sloučeninami a isoniazidem (antituberkulotikem první řady), s výjimkou jedné látky, která bude dále studována.

ANNOTATION

The work *Synthesis of Potential Anti-tuberculosis Drugs* deals with the synthesis of substances for which the activity against pathogenic agents of tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* and its strains resistant to commonly used antituberculosis drugs is expected. The theoretical part describes the characteristics of this infectious disease, its history, causative agent, method of transmission, form, diagnosis and treatment.

The actual work is focused on the improvement of substituted tetrazoles, which offer promising possibilities in the treatment of tuberculosis. In the experimental part of this work are given information on the reaction steps and the mechanisms of synthesis of novel, yet previously undescribed substances based on phenylethyl- and styryl-derivatives of tetrazole. The effect of the linker between the 3,5-dinitrophenyl fragment and the tetrazole cycle on the antimycobacterial activity of the compounds was studied. Furthermore, the effect of the substituent position on the tetrazole cycle is examined by comparing the activity of 1,5- and 2,5-disubstituted tetrazoles.

Their antimycobacterial activity was evaluated *in vitro* on both the standard strain of *Mycobacterium tuberculosis* and the clinically isolated mycobacterial strains. It was found that neither 1,5- nor 2,5-disubstituted tetrazoles that were synthesized and analyzed in this project showed higher antimycobacterial activity compared to the parent compounds and isoniazide

(first-line anti-tuberculosis drug), with the exception of one substance that will be further studied.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antituberkulotika; *Mycobacterium tuberculosis*; syntéza substituovaných tetrazolů; tuberkulóza

KEYWORDS

Anti-tuberculosis drugs; *Mycobacterium tuberculosis*; synthesis of substituted tetrazoles; tuberculosis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AG	arabinogalaktan
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
Araf	α -D-arabinofuranosyl
BCG	vakcína Bacillus Calmette-Guérin
CNS	centrální nervový systém
CT	počítačová tomografie
DAT	diacyl- trehalóza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMB	ethambutol
FaF UK	Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy
Galf	β - D-galactofuranóza
HIV	virus způsobující syndrom získaného selhání imunity
IGRA	Interferon Gamma Release Assay
INH	isoniazid
kg	kilogram
LAM	lipoarabinomanan
LM	lipomanan
M.tb.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mAG	mykolylarabinogalaktan
mAGP	mykolylarabinogalaktan-peptidoglykanový komplex
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
mg	miligram
ml	mililitr
MOM	mykobakteriální vnější membrána

NMR	nukleární magnetická rezonance
PAT	pentacyl-trehalóza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDIM	ftiocerol dimykocerozát
PG	peptidoglykan
PGLs	fenolické glykolipidy
PIMs	fosfatidylinositolové manosidy
PZA	pyrazinamid
RMP	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RR-TB	tuberkulóza rezistentní vůči rifampicinu
SLs	sulfolipidy
STM	streptomycin
SZO	Světová zdravotnická organizace
TB	tuberkulóza
TDM	dimykolyltrehalóza
TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TMM	trehalóza monomykolát
TST	tuberkulinový kožní test
UV	ultrafialový
XDR-TB	extrémně rezistentní tuberkulóza
°C	stupeň Celsia

OBSAH

Seznam použitých zkratek	6
Obsah.....	8
1 Úvod	11
2 Tuberkulóza.....	12
2.1 Historie TB	12
2.1.1 Deskripce TB od antiky po renesanci	13
2.1.2 Deskripce TB od renesance k moderní éře	13
2.1.3 Průzkum TB v moderní éře	14
2.1.4 Vývoj léčby TB.....	14
2.2 Původce TB	15
2.2.1 Buněčná stěna mykobakterií.....	15
2.2.2 Mycobacterium tuberculosis complex	19
2.3 Přenos TB	19
2.3.1 Inhalační forma	19
2.3.2 Přímý kontakt.....	20
2.3.3 Vzácné formy nákazy.....	20
2.4 Patogeneze TB	20
2.4.1 Primární TB	20
2.4.2 Postprimární TB.....	22
2.4.3 Latentní forma TB.....	23
2.5 Diagnostika TB	23
2.5.1 Anamnéza a fyzikální vyšetření.....	23
2.5.2 Skiaskopie hrudníku	23
2.5.3 Mikroskopické vyšetření sputa na acidorezistentní tyčinky.....	24
2.5.4 Tuberkulinový test	25
2.5.5 Kulturační průkaz mykobakterií tuberkulózy	25
2.5.6 Metody urychlené kultivace	26
2.5.7 Molekulárně genetické techniky	26
2.6 Prevence proti TB	26
2.6.1 Očkování.....	27
2.6.2 Chemoprolaxe.....	27
3 Léčba tuberkulózy	28

3.1	Základní antituberkulotika.....	28
3.1.1	Isoniazid	29
3.1.2	Rifampicin	29
3.1.3	Pyrazinamid	30
3.1.4	Ethambutol.....	30
3.1.5	Streptomycin.....	30
3.2	Vedlejší antituberkulotika.....	31
4	Popis výzkumu probíhajícího na FaF UK.....	32
5	Materiál a metodika	35
5.1	Cílové látky a význam jejich syntézy.....	35
5.2	Metodika výzkumu.....	35
5.3	Použité materiály.....	36
5.4	Použité separační a analytické metody.....	36
5.4.1	Filtrace.....	36
5.4.2	Extrakce.....	37
5.4.3	Kolonová chromatografie	38
5.4.4	TLC (chromatografie na tenké vrstvě)	39
6	Syntéza cílových látek	41
6.1	Syntéza 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazolů	41
6.1.1	Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (NM5a).....	41
6.1.2	Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitridu (NM6a).....	42
6.1.3	Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM1a).....	43
6.1.4	Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM2a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM2b)	44
6.1.5	Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM3a) a 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM3b)	46
6.1.6	Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM4a) a 1-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM4b)	48
6.2	Syntéza 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2 <i>H</i> -tetrazolů	50
6.2.1	Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (NM10a).....	50
6.2.2	Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (NM11a).....	51
6.2.3	Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM12a).....	52
6.2.4	Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)- 2 <i>H</i> -tetrazolu (NM14a).....	54

6.2.5	Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolu (NM15a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM15b).....	55
6.2.6	Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolu (NM16a)	57
7	Mechanismy reakcí provedných v této práci	59
7.1	Syntéza amidu kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové:	59
7.1.1	Reakce karboxylové kyseliny s thionyl-chloridem.....	59
7.1.2	Reakce chloridu kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové (2) s amoniakem.....	60
7.2	Syntéza (3,5-dinitrofenyl)propannitrilu.....	60
7.3	Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu	61
7.4	Syntéza 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolů a 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolů:	62
8	Shrnutí hlavních výsledků.....	63
8.1	Vyhodnocení získaných produktů.....	63
8.1.1	Antimykobakteriální aktivita finálních produktů.....	64
9	Diskuse.....	67
10	Závěr	68
11	Přehled použité literatury	69
12	Seznam obrázků a tabulek.....	73
13	Příloha 1: Elementární (CHNS) analýzy připravených látek.....	75
14	Příloha 2: NMR spektra připravených látek	77

1 ÚVOD

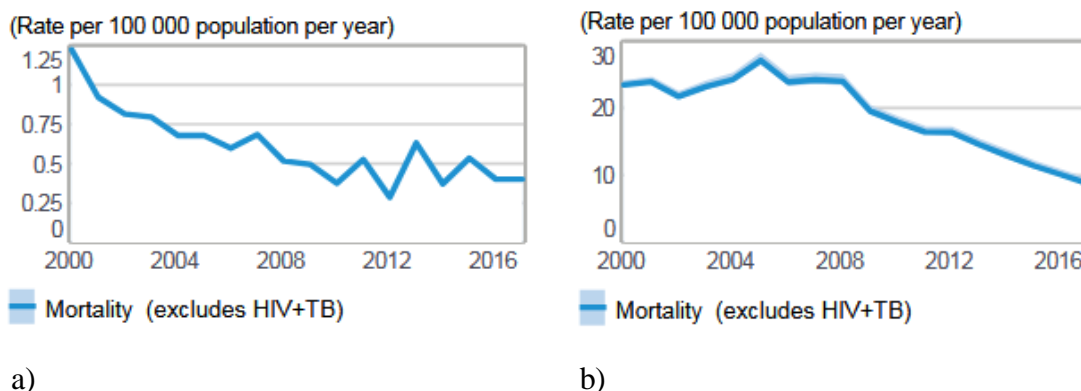
Tuberkulóza (neboli souchotiny, ftíza či bílý mor) je rozšířenou infekční chorobou a představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí na celém světě v důsledku jediného infekčního původce. Toto onemocnění označuje všechny chorobné stavy zapříčiněné mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Za posledních 10 let prošla tuberkulóza jakožto choroba s masovým výskytem doslova zásadními změnami, nejvýraznější poznatky přibýly v medikamentózní léčbě, která jasně převládá nad chirurgickou. Ačkoli jsou úspěchy ftizeologů nemalé, současný vývojový trend tuberkulózy je nerovnoměrný a nepříznivý, zejména v rozvojových zemích. Terapie je také značně komplikována výskytem rezistentních a multirezistentních forem mykobakterií. Z toho důvodu je nutný vývoj inovativních léčiv.

Tato práce se zabývá problematikou tuberkulózy a přípravy nových látek, jejichž účinnost je porovnatelná s běžně používanými antituberkulotiky a zároveň by působila proti lékově rezistentním formám *Mycobacterium tuberculosis*. Cílem práce je syntéza série nových sloučenin na bázi 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolů, 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazolů, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolů. U těchto látek byl studován vliv spojovacího řetězce mezi 3,5-dinitrofenylovým fragmentem a tetrazolovým cyklem na antimykobakteriální aktivitu sloučenin. Dále byl prostudován vliv polohy substituentu na tetrazolovém cyklu porovnáním aktivity 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů. V rámci substituce síry u dříve studovaných látek za uhlík v sérii nových derivátů je očekávána větší metabolická stabilita připravených sloučenin.

Odborná činnost se uskutečnila na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Katedře organické a bioorganické chemie a probíhala pod dozorem Ing. Galiny Karabanovich, Ph.D. V souladu s laboratorní činností byly uplatněny jak běžné laboratorní postupy, tak i metody separační, izolační a analytické.

2 TUBERKULÓZA

Tuberkulóza (TB) je infekční choroba způsobená mikroorganismy *Mycobacterium tuberculosis* komplex. TB je rozšířena po celém světě a představuje nejčastější smrtící infekční onemocnění na planetě. Podle Světové zdravotnické organizace (SZO) bylo zaznamenáno, že jenom v roce 2018 zapříčinila tuberkulóza 1,2 mil. úmrtí (rozsah 1,1-1,3 mil.) mezi HIV- negativními lidmi a k nim přibýlo dalších 251 000 úmrtí pacientů s AIDS. Globálně se odhaduje, že u 10,0 mil. lidí (rozsah 9-11,1 mil.) se v roce 2018 rozvinula TB infekce, z čehož bylo 57 % mužů, 32% žen a 11 % dětí. Celosvětově velký problém však představuje lékově rezistentní forma TB. Nejlepší odhad je takový, že v roce 2018 se tuberkulózou rezistentní vůči rifampicinu (RR-TB) nakazilo 500 tis. lidí po celém světě, z nichž u 78% byla rozvinuta dokonce multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB). Tři země, které se podílely skoro na polovině z celkových případů RR-TB/MDR-TB byly: Indie (27%), Čína (14%) a Ruská federace (9%). Odhaduje se, že téměř 23% světové populace (1,7 miliard lidí) má latentní tuberkulózní infekci, která se během jejich života může rozvinout do aktivní formy TB. Nicméně zaměříme-li se na Českou republiku, zjistíme, že statistika výskytu TB a její mortality je poměrně příznivá. V roce 2018 bylo zaznamenáno pouze 37 úmrtí způsobených tuberkulózou. Odhadovaný počet případů byl celkem 580. Nahlášených případů bylo celkem 444, z nichž 4 lidé byli HIV- pozitivní a 12 trpělo multirezistentní tuberkulózou. Úmrtnost se v ČR od roku 2012 lehce zvýšila, na což měl vliv zejména zvýšený přísun ukrajinských občanů do ČR. Na Ukrajině je totiž celková mortalita podstatně vyšší. Na následujících grafech je porovnán počet úmrtí na TB v obou zemích. [1,2,3,4]



Graf 1: Počet smrtí způsobených TB (na 100 tisíc obyvatel) podle SZO: a) V České republice. *Převzato z citace:* [4] b) Na Ukrajině. *Převzato z citace:* [3]

2.1 Historie TB

Tuberkulóza je nemoc známá člověku již odedávna. První zmínka o ní pochází již z doby kamenné, z nálezů kostry člověka, který trpěl na tuberkulózní spondylitidu, dnes mimo jiné známou jako Pottova nemoc. Nejstarší exemplář osteoartikulární TB, která postihla páteřní obratle, ve formě fosilních kostí se datuje do cca 8000 let před Kristem. V neposlední řadě byl uskutečněn i unikátní bakteriální nález acidorezistentního bacila ve stěru, který byl vzat z psoas

absces¹ z velmi dobře zachované mumie inckého dítěte kolem roku 700 před Kristem. Tento nález byl jasným důkazem lumbální TB. [5,6]

2.1.1 Deskripce TB od antiky po renesanci

V nejstarším dochovaném zákoníku pocházejícím z Babylonu, jež byl formulován babylonským monarchou Hammurabim roku 1948-50 před Kristem, je zmíněno chronické plicní onemocnění, které se popisně velmi podobá tuberkulóze. [6]

V řecké literatuře se koncept ftízy, neboli tuberkulózy, objevuje kolem roku 460-370 před Kristem. V této době žil mimo jiné nejslavnější lékař své doby- Hippocrates. Ten popisoval ftízu jako jednu z nejběžnějších nemocí a jako stav, který kulminoval ve smrt. Hippocrates také varoval své kolegy před navštěvováním nemocných v pokročilém stadiu choroby, jelikož by pacient mohl kdykoliv umřít, což by poškodilo lékařovu pověst. Hippocrates také nejprve pozoroval tuberkuly ve tkáni dobytka, ovcí a prasat. Hippokratova škola považovala ftízu za dědičné onemocnění spíše než za infekční chorobu. Aristoteles (384-322 let p.K.) na druhou stranu popsal skrofulózu² na kůži tuberkulózních prasat. Jako jediný ve své době věřil, že je ftíza nakažlivá, nikoli dědičná. Ve druhém století našeho letopočtu začal i Galén, který neměl žádné vědomosti z oblasti morbidní anatomie, pochybovat o dědičnosti choroby a přikláněl se k infekční povaze choroby. Mimo jiné také varoval před intimním kontaktem s nakaženými. Caelius Aurelianus, jeden z nejvýznamnějších římských fyziologů 5. století našeho letopočtu, se zasloužil jako první o detailní popis příznaků ftízy. [6]

2.1.2 Deskripce TB od renesance k moderní éře

V Renesanci, konkrétně v severní Itálii, použil Girolamo Francastoro (1478-1553) slovo *de contagione*³ ve svém postulátu a dokonce tvrdil, že nemoc je způsobena neviditelným virem, který může přežít na oblečení nakaženého až 2 roky. V 17. století byla uvedena éra detailní patoanatomické deskripce tuberkulózy. Sylvius de la Boe z Amsterdamu jako první ve své Opera Medica popsal tuberkuly jako charakteristické léze na plicích a jiných orgánech nakažených lidí. Popsal také, že progrese choroby vede k jejich kavitaci⁴ a tvorbě vředů. Nicméně de la Boe stále věřil, že je nemoc dědičná. Naopak nejslavnější patolog svého věku- Giovanni Baptista Morgagni, byl tak přesvědčen o nakažlivosti tuberkulózy, že dokonce odmítl vykonat veřejnou pitvu mrtvolky nakažené tuberkulózou, kvůli strachu z infekce. V roce 1720 pojal anglický fyziolog Benjamin Marten podezření, že by TB mohla být způsobena miniaturními organismy, které jestliže se dostaly do lidského těla, produkovaly tuberkulózní léze a začaly se projevovat standární příznaky. V roce 1844 se Jacob Henle (1809-1885) domníval, že by ftíza mohla být nakažlivá. K jádru věci se dostal, když napsal: „za určitým okolností... pokud je zde více či méně daná predispozice“. Dnes, cca 170 let po Henleovi, víme, že méně než 10 % lidí infikovaných TB skutečně onemocní. [6]

¹ Psoas absces- zánět nacházející se v části bedrokyčelního svalu

² Skrofulóza („krstice“)- krční forma tuberkulózy

³ *De contagione*- italsky před infekcí

⁴ Kavítace- vznik dutin

2.1.3 Průzkum TB v moderní éře

K průlomovému objevu, který objasnil původce TB, došlo v roce 1882. Robert Koch, jeden z žáků Henleho, nadaný v práci s mikroskopem, nevyvratitelně dokázal existenci specifického mikrobu, který zapříčiňuje samotnou chorobu. Sejmul tenký plátek tuberkulózní tkáně a použil Tyndallovu metodu sterilizace hovězího a ovčího séra a následně jeho koagulace⁵. Na tomto médiu byl ve finále schopen pozorovat růst tuberkulózního mikroba. Dne 24. 3. 1882 přednesl svůj slavný projev *Über Tuberkulose* (O Tuberkulóze) a seznámil veřejnost s výsledky své práce. Objev R. Kocha je největším objevem v dějinách TB vůbec, jelikož odhalení infekční povahy tohoto onemocnění neznamenovalo jen nový, podstatný krok ve studiu této choroby, ale i začátek nové éry v boji proti němu. [5,6]

2.1.4 Vývoj léčby TB

Medicína 19. století byla sice velmi zainteresovaná v deskripci, patogenezi a diagnostice soudobých chorob, ale málokdy se starala o jejich léčbu. Zhruba v polovině 19. století přišel Hermann Brehmer s teorií, že bylo pouze nutné pacienty hospitalizovat na „imunním místě“, kde se nemoc zhojí sama. „Imunní místo“ definoval jako oblast, kde se předtím nikdy neobjevili žádní nakažení. Taková místa našel ve Slezsku, a v roce 1856 založil své první sanatorium v Gorbersdorfu. Nicméně odstranění nakažených z normálního okolí a jejich přesun do sanatorií rozhodně přispěl k veřejnému zdraví. Jinak současně nucený odpočinek společně s dietou a regulovaným životem v sanatoriích podpořil samohojící tendenci choroby v nějakých pacientech až na ohromující úroveň. Avšak ačkoli se pacienti během pobytu v sanatoriích zotavovali překvapivě rychle, dlouhodobé výsledky byly dosti deprimující. Americké statistiky [9] ukazují, že přes 60 % pacientů, kteří byli propuštěni ze sanatorií, zemřelo do 6 let. Toto obsahovalo 17 % „vyléčených“, 51 % „stabilizovaných“ a 72 % „vylepšených“ pacientů s TB. Ve 30. letech 19. století byla léčba v sanatoriích postupně nahrazena tzv. collapse therapy, která vedla ke značnému zlepšení dlouhodobých výsledků. Tato chirurgická procedura spočívala ve vytvoření umělého pneumothoraxu⁶ pomocí naplnění pleurální dutiny dusíkem. Následujících 25 let se stala pneumothoraxová technika nejčastěji praktikovanou jako dodatek ke zbytku léčby. Jestliže plicí dostatečně zkolabovala, plicní tkáň se uvolnila, dutina nabyla objemu, její stěny se připojily a velmi často se ze zásobovacího bronchu⁷ stala „smyčka“. Avšak příležitostně byla plicní dutina chráněna před kolapsem srůstou mezi dvěma vrstvami pleury. Tento problém ale vyřešil Jacobaeus, který roku 1912 vynalezl thorakoskop⁸. Vývoj prvních antituberkulotik byl započat objevením streptomycinu, na kterém má zásluhu Američan Selman Waksman. Tento lék byl prvně použit roku 1944 u kriticky nemocného pacienta, jehož stav se během několika dní zázračně zlepšil. To odstartovalo evoluci moderních léčiv, jako jsou isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol a spousta dalších. [6,8]

⁵ Koagulace- srážení

⁶ Pneumothorax- přítomnost vzduchu v pleurální dutině s následným smrštěním, čili kolapsem plicí

⁷ Bronchus- průduška

⁸ Thorakoskop- chirurgický nástroj sloužící k přímému pozorování hrudní dutiny

2.2 Původce TB

Jak je známo, rod *Mycobacterium* obsahuje jak patogenní, tak i nepatogenní původce tuberkulózy. Jedná se o rod strikně aerobních⁹ bakterií, které se vyskytují v podobě tyčinek, jež mohou nabývat kokovitých až vláknitých forem. Mykobakteria tvoří skupinu mikroorganismů na rozhraní mezi vyšší organizovanou živou hmotou (např. houby, plísně) a mezi pravými bakteriemi charakterizovanými jednoduchou strukturou (např. paličky, koky). Po zbarvení anilínovým barvivem¹⁰ (fuchsínem) je není možno odbarvit ani poměrně silným roztokem kyseliny, líhu nebo alkoholu. Z toho důvodu mají všechna mykobakteria společné vlastnosti- acidorezistenci, alkalirezistenci a alkoholerezistenci. [5,9,10]

2.2.1 Buněčná stěna mykobakterií

Esenciální pro přežití mykobakterií v infikovaném hostiteli je buněčná stěna. Předkládá mykobakteriím vysoce ochrannou strukturovanou vrstvu, která napomáhá mimo jiné i jejich růstu. Tyto vlastnosti jsou poskytnuty obrovským množstvím lipidových substancí, které zajišťují hydrofobní¹¹ povrch mykobakterií a činí je tak cca 1000x méně propustnými pro hydrofilní molekuly v porovnání s buněčnou stěnou bakterie *Escherichia coli*. Jak virulence, tak i pomalý růst jsou přisuzovány právě této unikátní membránové buněčné struktuře. [11]

Buněčná stěna mykobakterií se vyznačuje extrémní odolností hlavně z toho důvodu, že je složena z látek, jež mají voskový charakter. Mezi takové sloučeniny lze zařadit zejména mykolové kyseliny. Mykobakterie postrádají vnější membránu, místo níž se v jejich buněčné stěně nacházejí lipidy tvořící vnější obal, pod kterým jsou uloženy právě mykolové kyseliny. Pod nimi se dále nachází polysacharidová vrstva arabinogalaktanu, vrstva peptidoglykanu a konečně cytoplazmatická membrána. Nyní se podrobněji zaměříme na konkrétní struktury. [12]

Volné glykolipidy, důležité komponenty mykobakteriální buněčné stěny, jsou přítomny v *M.tb.* ve velkém množství. Jsou vloženy do kostry mAGP interakcí s mykolylovou skupinou a tvoří pseudo-dvojvrstvu, která působí jako dodatečná hydrofobní bariéra. Mezi těmito dobře asociovanými lipidy mohou být nalezeny i: dimykolyltrehalóza (TDM), trehalóza monomykoláty (TMM), diacyl- (DAT) a pentacyl-trehalóza (PAT), sulfolipidy (SLs), ftiocerol dimykokerozát (PDIM) a fenolické glykolipidy (PGLs). [11]

Lipoarabinomanan (LAM) je glykolipid obsahující Arať a jeho manopyranosylové zbytky. LAM prochází MOM a mAGP a je etablován v cytoplazmatické membráně pomocí fosfatidyl-myo-inositol diacylglycerolové kotvy. Varianty lipoarabinomananu, PIMs a lipomanan (LP), které jsou také ukotveny v buněčné membráně, se pravděpodobně také podílejí na imunitní responzi hostitele. [11]

Lipidy a glykolipidy na vnějším povrchu mykobakteriálního buněčného obalu jsou zodpovědné za specifické vlastnosti těchto bacilů, jako například silná rezistence proti degradaci pomocí

⁹ Aerobní- vyžadující k životu kyslík

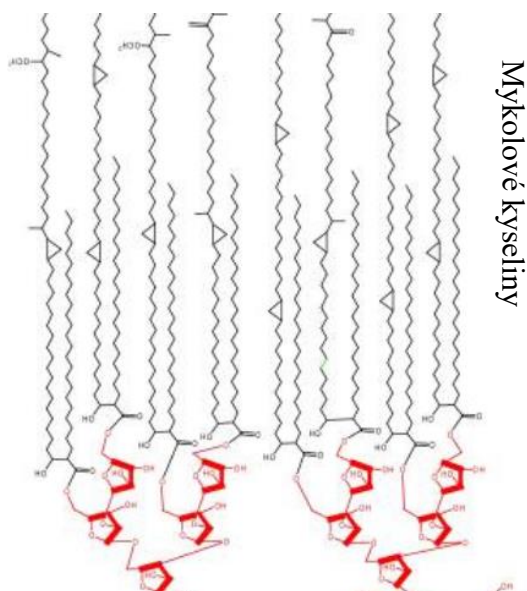
¹⁰ Anilínové barvivo je barvivo obsahující jedovatý aromatický amin olejovité konzistence- anilin

¹¹ Hydrofobní- odpuzující vodu

hostitelských enzymů, nepropustnost vůči toxickým makromolekulám a inaktivace reaktivního kyslíku a derivátů dusíku. [11]

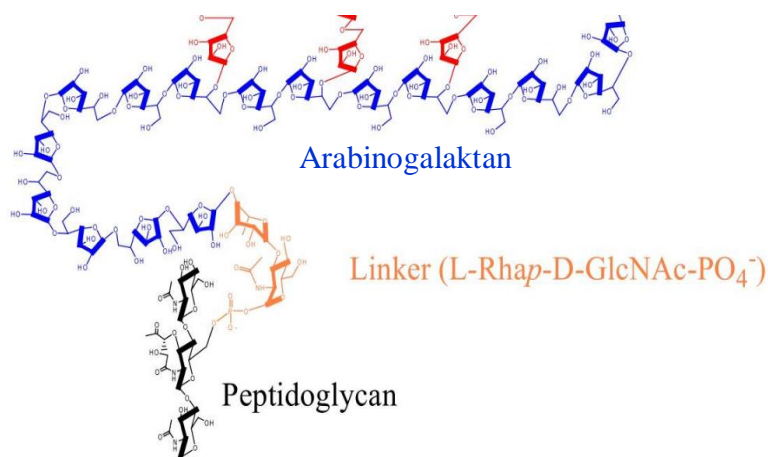
Mykolové kyseliny se skládají ze 70-90 atomů uhlíkových rozvětvených α -alkyl- β -hydroxy mastných kyselin. Jsou známy 2 typy mykolových kyselin: první s kyslíkatými funkčními skupinami (například ethoxy, methoxy, keto skupiny) a druhé bez takovýchto skupin (α -mykoláty obsahující pouze cyklopropanové kruhy jako funkční skupiny). Tzv. α -mykoláty jsou nejrozšířenějším typem nalezeným v *M.tb*. Mykoláty esterifikované na arabinanový řetězec AG tvoří vnitřní kryt mykobakteriální vnější membrány (MOM). [11]

Arabinogalaktan (AG) je polymer, který je tvořen D- galaktofuranosami a D- arabinofuranosami, sacharidy, které se v přírodě vyskytují velmi vzácně. D- galaktofuranosový polysacharid je složen přibližně z 30 β -D- galactofuranosových (Gal β) jednotek. Redukovaný zbytek galaktanu je připojen k PG pomocí fosforyl-*N*-acetylglukosaminosyl-rhamnosylové vazby. Rozvětvené řetězce arabinanu obsahující α -D-arabinofuranosyl (Araf) jsou připojeny prostřednictvím redukčního konce k C5 Gal β jednotkám. [11]



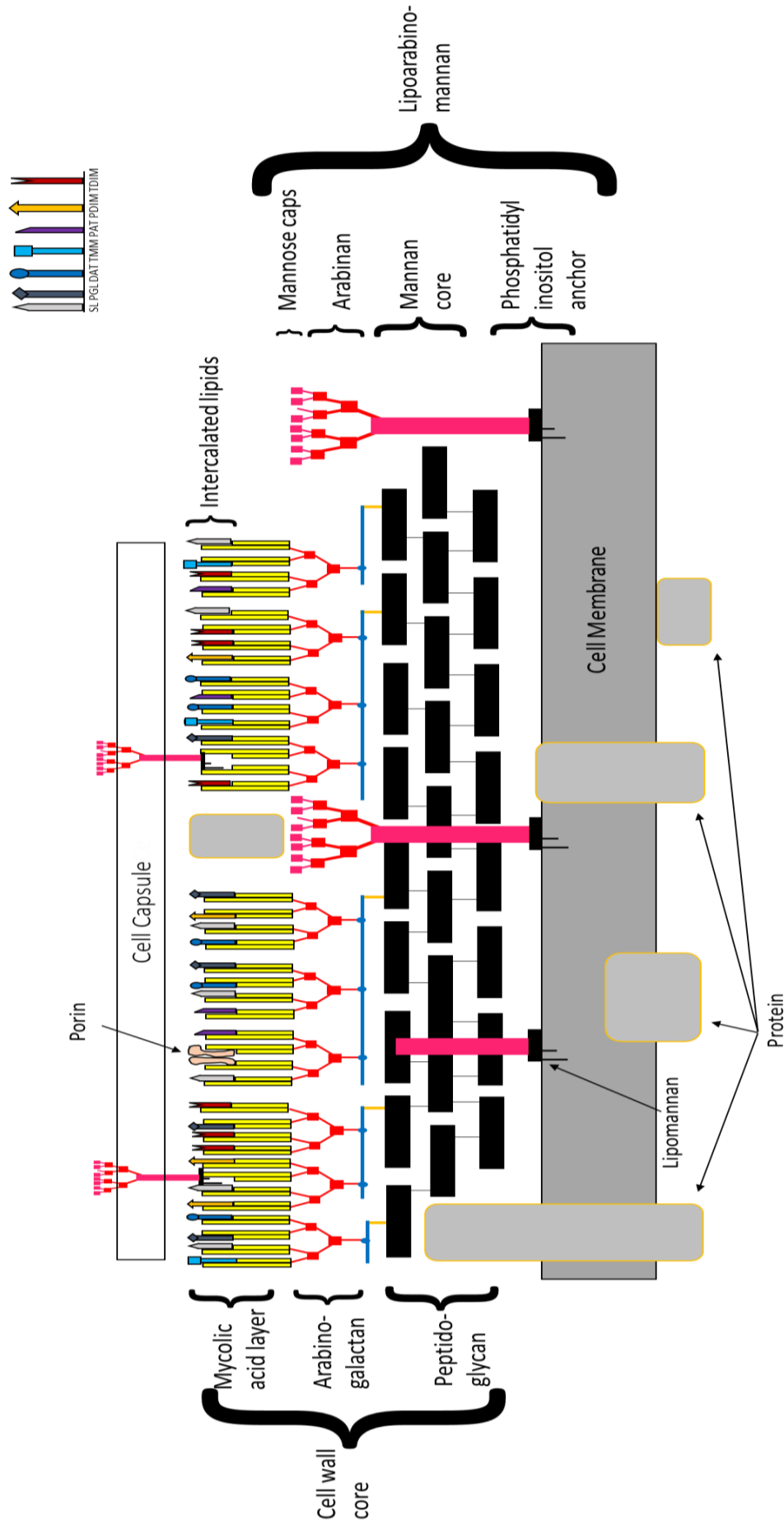
Obrázek 1: Připojení mykolových kyselin k arabinogalaktanu. *Převzato z citace:* [14]

Peptidoglykan (PG), páteř mykobakteriální buněčné stěny, se lokalizuje za plazmatickou membránou a je formován pomocí střídajících se jednotek, kde se opakuje *N*-acetyl- β -D-glucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-*N*-glykolylmuramová kyselina. L-Rhap(13)-D-GlcNAc-1 \rightarrow P je linker, který poskytuje spojení PG s galaktanem, který již náleží arabinogalaktanu. [11]



Obrázek 2: Připojení arabinogalaktanu k peptidoglykanu. *Převzato z citace:* [14]

Cytoplazmatická membrána je zapouzdřena vrstvou peptidoglykanu (PG), který tvoří kovalentní vazbu s arabinogalaktanem (AG), jež je dále připojen k mykolovým kyselinám pomocí jejich dlouhých meromykolátových a krátkých α - řetězců. Tyto látky spolu tvoří mycolylarabinogalaktan-peptidoglykanový komplex (mAGP) a dodatečně se tu nachází i 3 glykolipidy. Horní segment je složen z volných lipidů, některé složené z delších mastných kyselin doplňujících kratší α - řetězce a ostatní s kratšími mastnými kyselinami komplementující delší řetězce. Nesourodě rozptýlené jsou buněčné proteiny, fosfatidylinositolové manosidy (PIMs), lipidy obsahující ftiocerol, lipomanan (LM) a lipoarabinomanan (LAM). Jestliže je buněčná stěna narušena, například při extrakci za použití různých rozpouštědel, budou volné lipidy, proteiny, LAM a PIMs rozpuštěny. Avšak mAGP zůstane jako nerozpustný zbytek. Zjednodušeně tyto lipidy, proteiny a lipidoglykany mohou být považovány za signalizující efektorové molekuly v chorobném procesu. Zatímco nerozpustné jádro je esenciální pro životaschopnost buňky. Tudiž je třeba zaměřit nově vyvíjené léky na rozrušení této struktury. [11,13]



Obrázek 3: Schématické znázornění mykobakteriální buněčné stěny Vložené lipidy (Intercalated lipids): SL- sulfolipidy, TMM- trehalóza monomykoly, TDM- dimykolytrehalóza, DAT- diacyl- trehalóza, PAT- pentacyl- trehalóza, PGL- fenolické glykolipidy, PDIM- ftiocerol dimykocerozát. *Převzato z citace: [11]*

2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis* complex

Mycobacterium tuberculosis complex je souborem mykobakterií, který zahrnuje nejčastější a nejdůležitější příčinné agens tuberkulózy, která jsou obligatorně patogenní pro člověka. [1]

Mycobacterium tuberculosis (*M.tb.*) je v současnosti nejčastějším původcem tuberkulózy u člověka, konkrétně v celých 95 % případů. *M. tb.* dosahuje velikosti 0,3 – 0,6 x 1,4 μm s generačním časem *in vitro* 14-15 hod za optimálních podmínek. Ideální teplota pro množení je 37 °C. Mykobakteria nejsou schopna přežít déle než 1-2 hod, jsou-li při běžných podmínkách v prostředí vystavena slunečnímu svitu a teplotě vyšší než 60 °C. Dávka schopná infikovat člověka se odhaduje na 3- 300 bacilů. *M. tb.* je na základě imunologické analýzy extrahované T-katalázy¹² strukturálně identická s *M. bovis* a *M. africanum*, avšak vykazuje výraznou divergenci od ostatních druhů. [5,9]

Mycobacterium bovis je označován za druhého nejčastějšího původce TB, ačkoli jeho hostitelem bývá spíše hovězí či vepřový dobytek. Jeho kultivace trvá 21 dní a více, nejlépe za teploty 37 °C, což je mimo jiné i optimální teplota lidského těla. Z *M. bovis* byl odvozen vakcinační kmen *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), který má v podstatě stejné vlastnosti jako *M. bovis* s výjimkou jeho značně oslabené patogenity. [5,15]

Mycobacterium africanum také patří mezi pravá mykobakteria, avšak není již tak častý. Objevuje se zejména v rozvojových zemích, konkrétně v tropické Africe. Jeho kolonie mají průměr 3 μm a rostou zejména na vaječných médiích při teplotě 37 °C. Mikroskopicky se *M. africanum* podobá *M. tb.* a *M. bovis*, mezi kterými tvoří jakýsi přechod. [5]

2.3 Přenos TB

Jak víme, tuberkulóza je vysoce infekční onemocnění. Největším přenašečem tuberkulózy je nemocný člověk, zejména ten, který exkretuje mykobakteria, jejichž existence je mikroskopicky prokazatelná. Po kontaktu s infikovaným se inkubační doba řádově pohybuje mezi 4 týdny a 2 lety, avšak dojde-li k latentní formě tuberkulózy, onemocnění může propuknout až při imunosupresi. [16]

2.3.1 Inhalační forma

Přenos nákazy v rámci dvou lidí se tedy nejčastěji uskutečňuje inhalační cestou. Z toho důvodu jsou nejčastěji postiženým orgánem právě plíce (cca 85-90 % případů), konkrétně obvykle dolní laloky. Dochází zde ke vdechnutí mykobakterií, která se dostala do vzduchu buď tím, že uvízla na bronchiálním sekretu, který vykašlal nemocný člověk (kapénková forma) nebo se volně vznášela ve vzduchu bez toho, aniž by byl zdravý jedinec v osobním kontaktu s nemocným. [1]

¹² T-kataláza je enzym rozkládající peroxid vodíku na volný kyslík a vodu s T indexem

2.3.2 Přímý kontakt

Přímým kontaktem je myšlena nákaza způsobená prací s infikovaným materiálem. Případy tohoto rázu mají obvykle profesionální původ (např. patolog, chirurg). Ojedinelé se v této situaci objevuje inokulační¹³ tuberkulóza. [1, 16]

2.3.3 Vzácné formy nákazy

Jednou z možností infekce je kontakt s kontaminovanými předměty (např. prádlo, přístroje). Dále může dojít k infekci i alimentární cestou, kdy se do trávicího traktu dostane infikované maso dobytka či nakažené mléko. [1, 16, 17]

2.4 Patogeneze TB

Při infekci člověka mykobakteriemi vznikají v jeho těle 2 základní imunitní odezvy. První je vytvoření určitého projevu získané imunity proti infekci, druhou je tuberkulínová hypersenzitivita¹⁴. Obě tyto reakce mají celulární charakter a zprostředkovávají je T-lymfocyty¹⁵. Změny a imunitní odpovědi buněk hrají ve vývoji onemocnění také významnou roli a jejich vzájemný vztah a projev u infikované osoby determinuje progresi choroby a její manifestaci. [5]

2.4.1 Primární TB

Primární tuberkulóza se řadí mezi manifestní typy tuberkulózy. K jejímu rozvoji dochází po skončení první expozice s přenašečem. Je obvyklá spíše u mladších osob. Mykobakteriální infekce se za vhodných podmínek dostává (nejčastěji inhalační formou) do plic hostitele, obvykle do dolních laloků, kde se v alveolech vytvoří exsudát¹⁶, jež je bohatý na bílkoviny. Mykobakteria se zde tudíž množí a to do rozvoje buněčné imunity (4-8 týdnů). Původní nespecifický zánět alveolů¹⁷ během 10 dnů vyústí v tzv. Ghonův fokus. Hlavním znakem tohoto tuberkulózního procesu je vznik nekróz¹⁸ v lokálně postižené části tkáně. Neustálé množení mykobakterií vygraduje do degenerativního procesu - kazeifikace¹⁹. Za těchto podmínek nastává uvolnění tělových substancí, které jsou zejména lipidové povahy. Následně dojde ke granulaci²⁰, kdy tyto substance na okraji kazea transformací z makrofágů vytvoří společně s epiteloidními buňkami, Langhansovými buňkami a lymfocyty specifickou granulární tkáň. V průběhu několika hodin se mykobakteria rozšíří pomocí lymfatických drah do regionálních lymfatických uzlin. Ložiska v plicích a spádové hilové uzlině společně vytváří primární

¹³ Inokulační- očkování jakožto příčina nákazy

¹⁴ Hypersenzitivita- zvýšená citlivost

¹⁵ T-lymfocyt- druh bílých krvinek ze skupiny agranulocytů, součást imunitního systému

¹⁶ Exsudát- zánětlivý výpotek

¹⁷ Alveolus- plicní sklípek

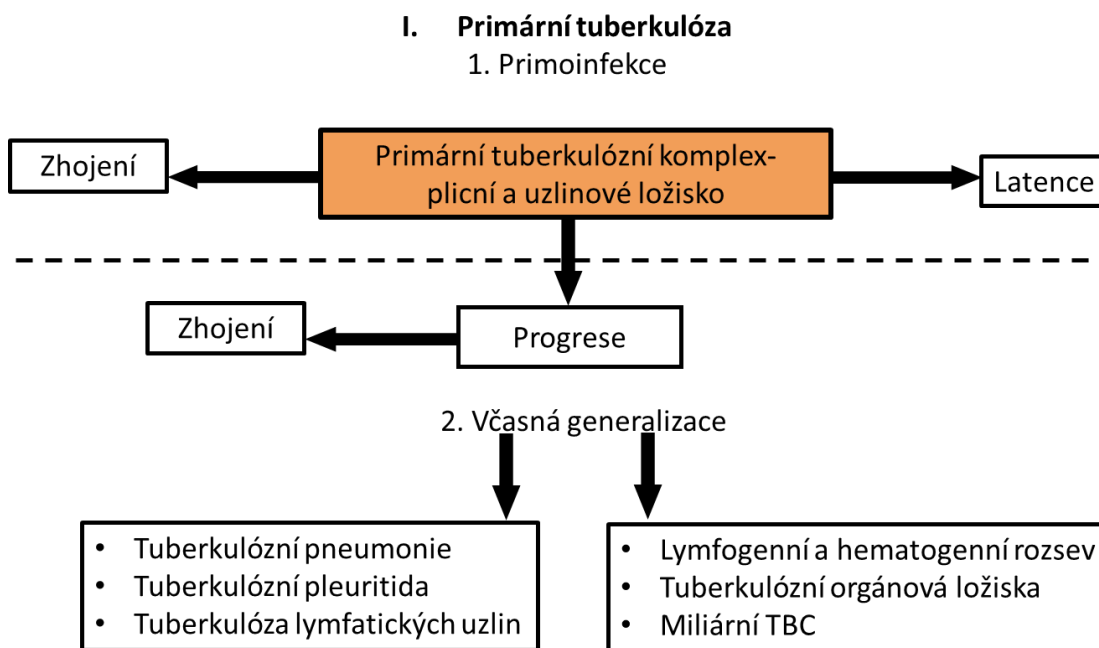
¹⁸ Nekróza- odumření tkáně

¹⁹ Kazeifikace- zesýrovatění, tvorba sýrovité nekrózy

²⁰ Granulace- tvorba tkáně složené z nově vytvořených cév a vaziva, která přerůstá přes poškozená místa

tuberkulózní komplex. Za příznivého imunitního stavu se primární tuberkulózní komplex spontánně zhojí fibrózou²¹ a kalcifikací²². [1,5,17]

Pokud se ale onemocnění rozvíjí, dochází tak k další exsudaci, kalcifikaci a zřídka může dojít i ke zkapalnění (tzv. kolikvaci) a vytvoření primární kaverny²³. Samotná infekce se v těle šíří per continuitatem²⁴ nebo bronchogenně. Takto dojde ke vzniku tuberkulózní pneumonie. Jestliže je ložisko uloženo pod pleurou²⁵, vytváří se tuberkulózní pleuritida, která je velmi bolestivá a bývá mnohdy prvním projevem TB. V útlém věku se typicky objevuje i TB lymfatických uzlin, kdy se lymfatické uzliny zvětší natolik, že začnou zužovat bronchy a ojedinele se do nich mohou i provalit. Tímto způsobem vzniká v plicích tzv. epituberkulóza, která je kombinací atelektatických²⁶ a zánětlivých změn. Pokud se infekce dostane z lymfatických cest do krevního oběhu, tj. hematogenní rozsev virulentních tuberkulózních bacilů do takřka všech orgánů a tkání, vznikají tak v plicích, stejně jako v ostatních orgánech, hematogenní metastázy. Jedná se tedy o miliární tuberkulózu. Až se primární TB vyhojí, mohou mykobakteria ve tkáních dlouhá léta perzistovat a k manifestaci choroby může dojít po skončení latence. [5,17]



Obrázek 4: Schématické znázornění patogeneze primární TB. *Převzato z citace:* [5]

²¹ Fibróza- zmnožení vaziva

²² Kalcifikace- zvápenatění

²³ Kaverna- dutina

²⁴ Per continuitatem- plynule

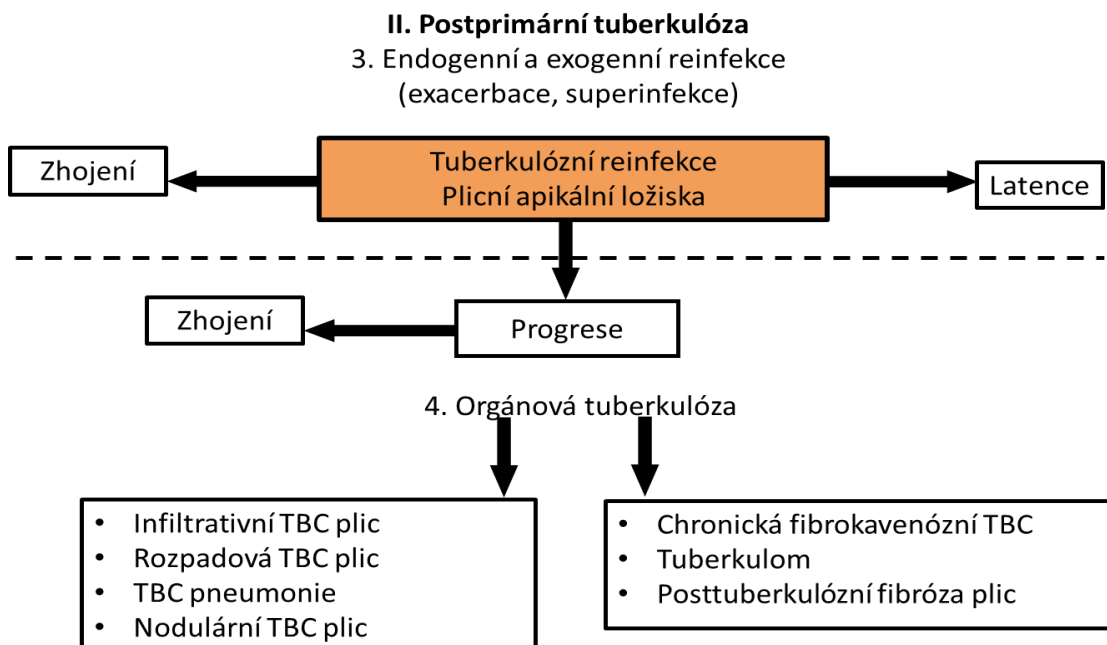
²⁵ Pleura- tenká blána vystýlající dutinu hrudní a pokrývající plíce

²⁶ Atelektatické změny jsou změny vedoucí k nevdůšnosti plíce

2.4.2 Postprimární TB

Postprimární tuberkulóza se objevuje u jedinců, kteří již infikováni byli. K opětovnému propuknutí nemoci může dojít za předpokladu snížené imunity (AIDS), kdy se zdánlivě zhojená ložiska spontánně reinfikují. Tento mechanismus se nazývá endogenní exacerbace. Druhou možností je tzv. exogenní superinfekce, která vzniká vlivem inhalace nových mykobakterií při masivním či protražovaném vystavení tuberkulózním bacilům. Z klinického hlediska se tyto dva mechanismy nedají rozlišit. [1,17]

Klíčem k rozvoji sekundární formy tuberkulózy je enzym izocitrátlyáza, který je schopen produkovat mastné kyseliny, jež jsou esenciální jako zdroj energie pro metabolismus mykobakteria. Tím pádem jsou schopna se replikovat a perzistovat ve tkáních. Bez ohledu na způsob, jakým se mykobakteria znovuobnovila, jsou schopna se neefektivněji množit v místech největšího kyslíkového tlaku, například v růstových zónách dlouhých kostí, vrcholech plic či v ledvinách. Konkrétně plicní postižení se projevuje infiltráty, které se nejčastěji nachází v apikálním segmentu²⁷ dolního laloku (infiltrativní tuberkulóza plic) a horních lalocích. Tyto infiltráty se dále mohou rozpadat a tím pádem dojde ke vzniku kaverny, což je nekrotická plicní tkáň. Pokud infiltrace rychle progreduje a je-li klinický obraz bouřlivý (rapidní snížení hmotnosti, noční poty, vysoké teploty), jedná se o TB pneumonii. Rozsevem průduškového původu vzniká nodulární tuberkulóza plic. Jestliže dojde ke kombinaci progresivních a reparativních procesů, vznikne chronická fibrokavernózní TB. Při chronických typech TB může ojediněle vznikat shluk mykobakterií obalených pojivem, jež se nazývá tuberkulom, a je schopen kalcifikovat. Jeví se jako solitárně okrouhlý útvar. Pakliže jsou postižení rozsáhlá, může dojít k posttuberkulózní fibróze plic, která je již neinfekční a projevuje se dušností. [1,17]



Obrázek 5: Schématické znázornění patogeneze postprimární TB. *Převzato z citace:* [5]

²⁷ Apikální segment- vrcholová část plic

2.4.3 Latentní forma TB

Latentní tuberkulóza se týká lidí, kteří byli infikováni *Mycobacterium tuberculosis* a rovněž měli adekvátní imunitní odpověď vůči jeho antigenům. Navzdory tomu se u nich neprojevily žádné příznaky. Vzhledem k tomu jsou časté diskuse o aktuálním stavu latence a stupně metabolické aktivity spojené se stavem této choroby. S největší pravděpodobností se zde vyskytuje kontinuum mezi latentní mykobakteriální infekcí a manifestní tuberkulózou než dvou vzdálených chorobných stavů. Tento přechod je nejlépe popsitelný u lidí, kteří byli nakaženi HIV, u kterých se dokáže stav TB rapidně změnit z latentní infekce, přes sub-klinickou TB až na aktivní symptomatickou formu TB. Odhadem mělo určitou formu latentní TB v roce 2017 globálně asi 1,7 miliardu lidí. Nicméně takový odhad je čistě přibližný, z velké části kvůli problémům týkajících se diagnostiky latentní infekce. Bohužel ještě neexistuje žádný ideální test na detekci mykobakteriální infekce. Současné testy sice stanovují imunitní responzi hostitele vůči *M. tb.*, ale samotnou infekci neodhalí. Dříve byl dostupným pro diagnostiku latentní infekce pouze tuberkulinový kožní test (TST), ale s uvedením Interferon Gamma Release Assay (IGRA) testu dosáhla diagnostika TB pokročilejší úrovně. Nedávný průzkum potvrdil, že právě IGRA test je schopen s určitou přesností předpovědět vývoj TB. Léčba latentní formy TB se také vylepšila a to zavedením efektivní tříměsíční terapie. [17]

2.5 Diagnostika TB

Současné snižování počtu onemocnění na TB ve vyspělých zemích a další aspekty si vyžadují klást důraz a soustředit se na komplexnost použitých diagnostických metod a na jejich celkové zhodnocení při stanovení diagnózy tuberkulózy. Z klinického hlediska je tuberkulóza diagnostikována na základě příznaků, nálezů na tomografech hrudníku a skiagramech či průkazu existence mykobakterií TB v kultivacích. Mezi typické příznaky tuberkulózy patří stavy nápadné únavy, nechutenství, hubnutí, elevace teploty a následné pocení ve spánku, kašel (který může se může vyvinout až v hemoptýzu) a pleurální bolesti. [1,5]

2.5.1 Anamnéza a fyzikální vyšetření

Anamnéza je obzvlášť důležitá, jedná-li se o infekční onemocnění. Probíhá formou aktivního vyhledávání a zahrnuje pátrání po výskytu onemocnění v rodině pacienta, v blízkém okolí či na pracovišti a následné vyšetření rodinných příslušníků a spolupracovníků. Podstatná při předchozím onemocnění TB je také osobní anamnéza, kdy je zjišťováno léčení, očkování apod. Výhodou je porovnání předešlých rentgenových snímků a případných výsledků tuberkulinových testů. [17,19]

Fyzikální vyšetření zahrnuje hledání typických znaků indikujících tuberkulózu. Mezi takové znaky patří např. zvětšené mízní uzliny, problémy s mobilitou hrudníku. Konkrétně na hrudníku se popisuje i jeho symetrie. Poklepem lze zjistit i výskyt kavern a poslechem odhalit zhoršené, trubicovité dýchání. Avšak pouhé fyzikální vyšetření je pro celkovou diagnostiku zcela nedostatečné. [1]

2.5.2 Skiaskopie hrudníku

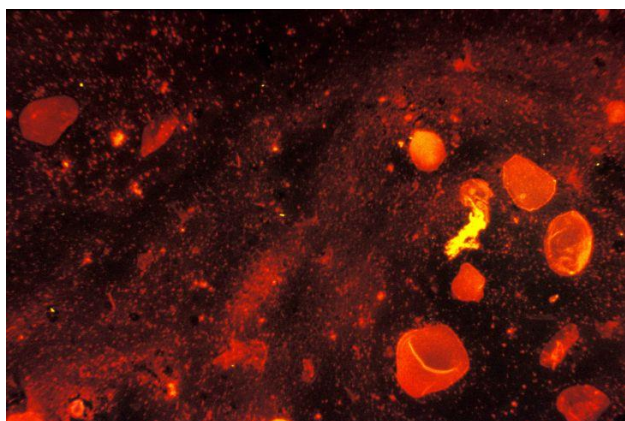
Jedná se o základní vyšetření, z něhož je vysloveno podezření na TB plic. Skiaskopie je rentgenové vyšetření, prosvěcování, při němž se prosvícená část těla přímo pozoruje na

obrazovce. V tomto případě jsou plíce snímány z různých úhlů pro vytvoření uceleného obrazu-skiagramu. Tuberkulózní nekrotická ložiska jsou prozrazena stíny v oblasti plic. V rámci upřesnění nálezu se používá i CT hrudníku, které se může vyjádřit k aktivitě onemocnění, jelikož lépe zachytí rozpady. Nicméně z klinického hlediska ani tato metoda nepatří mezi 100 % přesné. [1,17]

2.5.3 Mikroskopické vyšetření sputa na acidorezistentní tyčinky

Toto vyšetření se řadí mezi jedno z nejrychlejších při identifikaci osob, které vykašlávají velké množství sputa²⁸ a jsou tak největší infekční hrozbou pro své okolí. Mikroskopický průkaz bohužel neumožňuje bližší identifikaci mykobakterií a posouzení jejich životaschopnosti. Nález acidorezistentních tyčinek je navíc možný pouze v případě, že počet bacilů v 1 ml přesáhne 50 000. Z epidemiologického hlediska je tedy jasné, že nemocní, u kterých je nález acidorezistentních tyčinek v preparátu pozitivní, trpí nejzávažnějšími formami TB infekce. [1]

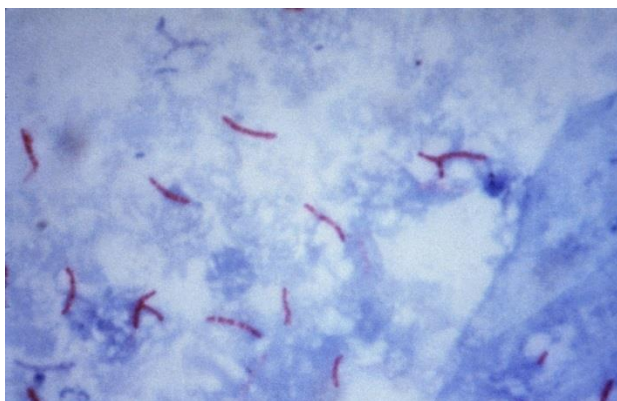
Nejužívanější metodou k průkazu mykobakterií je barvení. Jedním z nich je fluorescenční barvení. Při této metodě je vzorek za zvýšené teploty zabarven auraminem, následně okyselen alkoholem a nakonec je dobarven anilínovým barvivem- fuchsinem. Pod UV zářením se mykobakteria jeví jako žlutozelené tyčinky na rudém až temně rudém pozadí. [1]



Obrázek 6: Mikroskopický průkaz mykobakterií fluorescenčním barvením. *Převzato z citace:* [20]

Druhou nejčastější metodou je barvení karbol- fuchsinem podle Ziehl-Neelsena s prohlížením preparátů pod mikroskopem ve viditelné části spektra. Při tomto barvení mají acidorezistentní tyčinky červené zabarvení na modrém či zeleném pozadí. Obě metody jsou vyhodnoceny jako chvalitebné, avšak v porovnání je metoda fluorescenční citlivější a rychlejší. [1]

²⁸ Sputum- to co je vykašláno, „hlen“



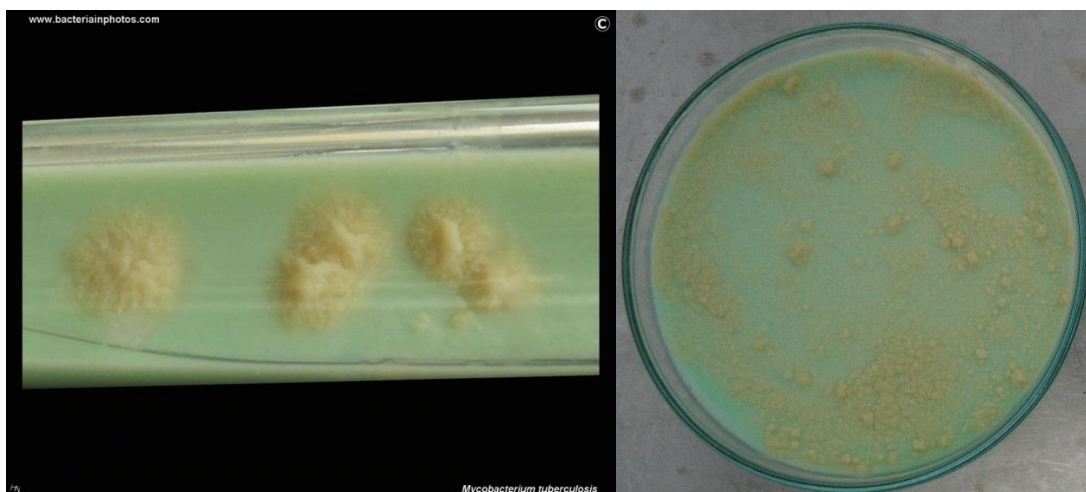
Obrázek 7: Mikroskopický průkaz mykobakterií Ziehl-Neelsenovým barvením. *Převzato z citace: [21]*

2.5.4 Tuberkulinový test

Tuberkulinový test slouží ke zjištění typu opožděné hypersenzitivity vůči antigenům mykobakterií. Mezi nejčastější kožní tuberkulinové testy patří zkouška podle Mantoux. Spočívá ve vstříknutí 0,1 ml čištěného proteinového derivátu do předloktí. Aplikace je striktně intradermální. Za 3 dny se hodnotí okolní reakce. Tuberkulinový test je pozitivní, jestliže se v místě vstříku objeví zarudnutí a mírná indurace. V tomto případě to znamená, že byl jedinec buď očkovan nebo TB již prodělal. Pakliže je nadměrné, je zde pravděpodobnost, že je TB aktivní. Na druhou stranu, jestliže vyjde test negativně, znamená to, že jedinec buď nebyl očkovan nebo má sníženou imunitu. Bohužel, ani negativní tuberkulinová reakce TB nevylučuje. [17, 22]

2.5.5 Kultivační průkaz mykobakterií tuberkulózy

Typickým rysem mykobakterií je jejich dlouhá generační doba. To je avšak také jejich nevýhoda, jelikož oproti ostatním bakteriím nevyrostou na médiu tak rychle a častokrát je přerostou ostatní bakterie. Z toho důvodu je nutné před kultivací mykobakterií provést důkladnou dekontaminaci materiálu, který nebyl získán sterilním způsobem (např. sputum, moč, bronchiální aspirát). Dekontaminace je možná díky rezistenci mykobakterií vůči kyselinám a zásadám, jelikož počet lipidů v jejich stěně je velmi vysoký. Mezi neúčinnější metody patří metoda s laurylsulfátem sodným nebo modifikované metody dle Petroffa, kdy se používá louh. Sediment, jež je získán po centrifugaci je očkovan na kultivační média. Po dekontaminaci následuje samotná kultivace. Nejčastěji se provádí na vaječných půdách jako je Löwenstein-Jensenova či na půdách tekutých s nativní bílkovinou, mezi které patří Šulova půda. Jakmile se půdy naočkují, jsou uloženy do termostatu při teplot 37 °C, kde je vhodná cirkulace vzduchu a příčná vlhkost. Následné hodnocení se sestává z pozorování makroskopického vzhledu kultivačních médií. Jestliže je půda čirá, je nález negativní. V opačném případě je možno hodnotit počet kolonií kvantitativně. Kultivační pozitivita indikuje nižší počet mykobakterií nacházejících se v odebraném materiálu. [1]



Obrázek 8: Průkaz mykobakterií při kultivaci na Löwenstein-Jensenově půdě. *Převzato z citace: [23]*

2.5.6 Metody urychlené kultivace

Značným problémem kultivace je její časová náročnost. Toto ale řeší novější metody urychlené kultivace, které jsou založeny na růstu mykobakterií v tekutých půdách. Mezi jedny z těchto metod patří tzv. BACTEC systém, která využívá radiometrii k určení růstu mykobakterií. Spočívá v metabolizaci kyseliny palmitové ^{14}C na $^{14}\text{CO}_2$. Tato přeměna se totiž děje pouze za přítomnosti živých mykobakterií. Po 14 dnech se hodnotí množství uvolněného $^{14}\text{CO}_2$, který se vyznačuje svojí radioaktivitou. Pokud zde $^{14}\text{CO}_2$ není přítomen po aplikaci jednotlivých antituberkulotik, značí to míru citlivosti mykobakterií na stávající léčbu. [1, 17]

2.5.7 Molekulárně genetické techniky

Molekulárně genetické techniky patří mezi dosud nejmodernější a nejpreciznější metody diagnostiky TB. Tyto techniky popisují druhově či rodově specifickou sekvenci v DNA nebo RNA mykobakterií. Genetické sondy slouží k identifikaci a detekci mykobakterií v již pomnožené kultuře, zatímco amplifikační metody (např. PCR- polymerázová řetězová reakce) prokazují genetický materiál mykobakterií přímo v sesbíraných vzorcích. Jejich rychlost je velkou výhodou, jelikož výsledek je znám v řádu hodin. Mimo jiné jsou také velmi senzitivní. Nicméně amplifikační metody působí spíše jako podpůrný doplněk pro standardní kultivaci mykobakterií. [1, 17]

2.6 Prevence proti TB

Mezi preventivní opatření lze zařadit vše, co umožňuje zabránit vzniku a rozptýlení choroby. Vzhledem k vysoké nakažlivosti TB je prevence nutností. Nejúčinnějším preventivním epidemiologickým prostředkem je pravidelné očkování. Avšak zejména zdravotnická pracoviště by se na prevenci měla zaměřit a to konkrétně přijímáním pouze pracovníků s pozitivním kožním testem. Jiným prostředkem je vyhledávání neznámých zdrojů mezi nemocnými a jejich izolace a léčba. [9]

2.6.1 Očkování

Očkování je jedno z preventivních epidemiologických opatření. Ačkoli nevytvoří plnou imunitu vůči antigenům mykobakterií, zabrání závažným formám primární tuberkulózy (meningoencephalitida, miliární TB). Kalmetizace neboli očkování proti tuberkulóze, spočívá v podkožní aplikaci BCG vakcíny, což je suspenze živých bacilů se sníženou virulencí. Do roku 2010 bylo dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví se v ČR očkování u novorozenců, jejichž hmotnost přesáhla 2,5 kg, povinné. Avšak od listopadu 2010 bylo plošné očkování proti tuberkulóze v ČR zrušeno. [9,17]

2.6.2 Chemoprophylaxe

Chemoprophylaxe je v podstatě preventivní podávání antituberkulotik. Často je indikována u dětí s negativním tuberkulinovým testem, které jsou ve styku s infekční TB, jelikož zabraňuje vzniku primární TB infekce. Obvykle je prováděna monoterapií isoniazidem v dávce 5 mg na kg hmotnosti. Isoniazid je podáván každý den po dobu 6 měsíců. [17]

3 LÉČBA TUBERKULÓZY

Principem léčby TB je podávání antituberkulotik. Délka léčby záleží na rozsahu postižení tuberkulózou, přidružených onemocnění pacienta a kombinaci použitých antituberkulotik. V roce 2005 byl doporučený systém aplikace denní a přerušovaný (1x až 3x týdně). Pacient, který byl diagnostikován TB, byl zařazen do jedné ze 4 léčebných kategorií. První kategorie zahrnuje nová onemocnění plicní TB, jež jsou mikroskopicky pozitivní a klinicky závažné formy plicní a mimoplicní TB (téměř všechny bakteriologicky ověřené TB). Do druhé kategorie spadají recidivy, léčebné neúspěchy a léčby po přerušení. Třetí kategorie se sestává z méně závažných forem TB (bakter. neověřené plicní a mimoplicní TB) a čtvrtá kategorie řeší ostatní případy - TB chronici- bakteriologicky pozitivní i po dokončení kontrolované léčby doporučené pro kategorii II. Dle zařazení do kategorie je pacient léčen odpovídajícím režimem (viz Tab. 1). [1,17]

Tabulka 1: Léčebné kategorie pro antituberkulotickou léčbu. *Převzato z citace:* [17]

	Iniciální fáze	Pokračovací fáze
I. kategorie	2 HRZE nebo 2 HRZS	4 HR nebo 4 H3R3 nebo 6 HE
II. kategorie	2 HRZSE a 1 HRZE Při přetrvávání m. p. 2 HRZSE + 2 HRZE	5 HRE nebo 5 H3R3E3
III. kategorie	2 HRZ	4 HR nebo 4 H3R3 nebo 6 HE
VI. kategorie	Léčení přísně individualizované, ve specializovaných ústavech; možné prodloužení léčby	

Legenda k tabulce 1: Tabulka rozděluje antituberkulotickou léčbu do čtyřech kategorií. Každé kategorii přísluší příklad způsobu léčby, avšak ta samotná ještě záleží na konkrétním pacientovi. Jsou zde zmíněna antituberkulotika v následujících zkratkách – H náleží isoniazidu, R rifampicinu, Z označuje pyrazinamid, E ethambutol a S zastává streptomycin. Dále jsou zde uvedeny i číslice, které symbolizují dobu v jednotkách měsíců, po kterou je léčba uskutečněna. To znamená, že například 2 HRZE znamená 2 měsíce podávání kombinace HRZE denně a dále 4 H3R3 značí 4 měsíce podávání H a R 3x týdně.

Léčba se dělí na 2 fáze, iniciální a pokračovací. Pokud je pacient nakažen lékově citlivou formou TB, iniciální fáze probíhá 2 měsíce a spočívá v troj- nebo čtyřkombinaci antituberkulotik 1. řady. V pokračovací fázi se podává dvojkombinace antituberkulotik, obvykle isoniazidu a rifampicinu, během 4-6 měsíců. Pakliže dojde ke vzniku rezistence, volí se individuální léčebné režimy za použití antituberkulotik 2. řady. [1,17]

3.1 Základní antituberkulotika

Základní antituberkulotika, neboli antituberkulotika první volby jsou používána k léčbě tuberkulózy zapříčiněné nerezistentními (tedy citlivými) kmeny mykobakterií. Antituberkulotika slouží obecně ke zničení mykobakterií a sterilizaci TB lézí.

Mykobaktericidní a sterilizační účinek se u jednotlivých léčiv liší, avšak nejvyšší mykobaktericidii mají právě antituberkulotika první volby, čiže isoniazid- hydrazid kyseliny isonikotinové (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA) a streptomycin (STM). Ethambutol (EMB) působí zejména mykobakteriostaticky, to znamená, že brání v růstu a množení mykobakterií. Za neúčinnější jsou považovány první dva zmíněné léky, další mají spíše doplňující charakter proti rozvoji odolnosti mykobakterií. [1]

3.1.1 Isoniazid

Isoniazid (INH), neboli hydrazid kyseliny isonikotinové, je pro svou snadnou výrobu, levnost a vysokou účinnost globálně nejpoužívanějším léčivem proti TB. Lze jej používat v kombinaci s ostatními léčivy a profylaxi²⁹ TB. Na množící se bakterie působí baktericidně. Snadno prostupuje do stěn *M. tb.*, kde se oxiduje na kyselinu izonikotinovou za pomoci enzymů katalázy a peroxidázy, které jsou obsaženy v cytoplasmě. Kvůli negativnímu náboji kyseliny isonikotinové, opouští INH buňku obtížně a z toho důvodu se v ní kumuluje. Do metabolismu bakterie zasahuje interferencí³⁰ kyseliny nikotinové, která je esenciální pro přežití bakterie. To vysvětluje inhibici pochodů látkové přeměny, např. syntézy kyseliny mykolové, která je specifickou součástí mykobakteriální buněčné stěny. Isoniazid se nejlépe vstřebává do stěn trávicího ústrojí. Podání na lačno je nutné z důvodu rovnoměrné biologické dostupnosti. Úspěšně se vstřebává do všech tělních tekutin. Je schopen proniknout i do cerebrospinálního moku³¹, což je esenciální pro léčbu tuberkulózní meningitidy. V nezměněné formě se močí vyloučí cca 10 % celkové dávky, větší podíl je eliminován ve formě acetylovaných metabolitů. Nežádoucí účinky se projevují zejména na centrálním nervovém systému (CNS), s přibývajícím věkem se mimo jiné zvyšuje nebezpečí hepatotoxicity³². Mezi kontraindikace patří epilepsie, choroby CNS či akutní jaterní onemocnění. [1,24]

3.1.2 Rifampicin

Rifampicin působí baktericidně na množící se mikroby tak, že v bakteriích potlačuje syntézu RNA. Tento proces je způsoben inhibicí DNA-RNA- dependentní polymerázy, jejíž příčinou je právě rifampicin. Primární rezistence bakterií na rifampicin se vykytuje velmi zřídka (méně než 1 %). Při perorálním podání je rifampicin účinný, rovnoměrně se distribuuje v celém organismu a resorbuje se také v likvoru³³. Nejlépe se koncentruje v játrech, kde se deacetyluje na hydrofilní metabolit³⁴, který je vylučován žlučí a má antibakteriální účinky. Rifampicin se nejvíce váže na plazmatické bílkoviny a z těla je eliminován za 2-5 hod. Mezi nežádoucí účinky patří lehké poruchy jaterních funkcí, ze kterých se velmi zřídka vyvine těžké toxické poškození jater, déle poškození ledvin či poškození CNS. Rifampicin je nutno podávat denně, jelikož při intermitentní léčbě je nebezpečí krevních dyskrázií³⁵ či šokových stavů. Ačkoli je embryonální poškození u člověka téměř nepatrné, užívání rifampicinu v prvním trimestru těhotenství se přes

²⁹ Konkrétní ochrana před určitou nemocí

³⁰ Vzájemné pronikání

³¹ Mozkomíšni mok

³² Chemicky způsobené poškození jater

³³ Tekutina

³⁴ Produkt látkové přeměny rozpustný ve vodě

³⁵ Porucha

to nedoporučuje. Nevýhodou rifampicinu je pouze četnost nežádoucích účinků a rovněž poměrně vysoká cena. [1,24]

3.1.3 Pyrazinamid

Pyrazinamid je v rámci krátkodobých režimů řazen mezi léčiva první volby, kromě toho má také baktericidní účinky na *M.tb*, ale *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium africanum* jsou vůči němu většinou odolné. Podání na počátečních fázích nemoci (2-3 měsíce) zkracuje potřebnou dobu léčení díky možnosti zničení perzistorů *M.tb*. Mechanismy jeho účinku nejsou přesně známy. V bakteriích se hromadí v podobě pyrazin-2-karboxylová kyseliny, kde se působením amidázy pyrazinamid štěpí. Tímto se přemění na karboxylovou kyselinu a není schopen z bakterie uniknout. Po perorálním podání se pyrazinamid dobře vstřebává a úspěšně se distribuuje do všech tkání a tělních tekutin. Hepatotoxicita je omezením v léčení, z toho důvodu je nutno během léčby kontrolovat funkci jater. Mimo jiné snižuje vylučování kyseliny močové z ledvin, což může vést k hyperurikémii³⁶. [1,24]

3.1.4 Ethambutol

Ethambutol působí bakteriostaticky na množící se mikroby a zasahuje do syntézy celulární membrány. Největší uplatnění nachází v kombinované léčbě zejména při odolnosti vůči jiným medikamentům. Celoplošně se dobře rozprostírá a vylučuje se renálně. Nežádoucí účinky jsou ojedinělé, jedná se hlavně o výskyt leukopenie³⁷, alergické reakce či poškození ledvin. Je popsáno také rozostřené vidění či neschopnost vidět zelenou barvu. Z tohoto důvodu jsou nutné návštěvy u oftalmologa³⁸ alespoň ve čtyřtýdenních intervalech. Jestliže se ethambutol včas vysadí, zrakové problémy časem ustoupí. Možnou kontraindikaci představuje poškození ledvin. Ethambutol je obecně tolerovaný lék, avšak jeho nevýhodou je pouze vyšší cena. [1,24]

3.1.5 Streptomycin

Streptomycin byl poprvé izolován ze *Streptomyces griseus* americkým biochemikem Walksmanem a jeho spolupracovníky v roce 1943, je tedy považován za první lék proti tuberkulóze. Zprvu byl považován za „zázračný lék“, avšak časem se začaly zjišťovat jeho závažné vedlejší účinky. Navíc mykobakteria na něj rychle získávají rezistenci, z toho důvodu je používán v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Navzdory tomu i nadále patří mezi antituberkulotika první řady. Streptomycin působí baktericidně a je používán k léčbě zvláštních forem TB, mezi které patří třeba tuberkulózní meningitida v dětském věku. Z trávicího ústrojí se streptomycin téměř neresorbuje, je tedy podáván intramuskulárně³⁹. Dobře prostupuje do tekutin oka, ucha či cerebrospinálního moku v případě TB meningitidy. Mezi nejobávanější vedlejší účinek způsobený léčbou patří poškození 8. mozkového nervu, které se nejprve projevuje postižením rovnovážného ústrojí a později či současně i sluchového aparátu. Všechna

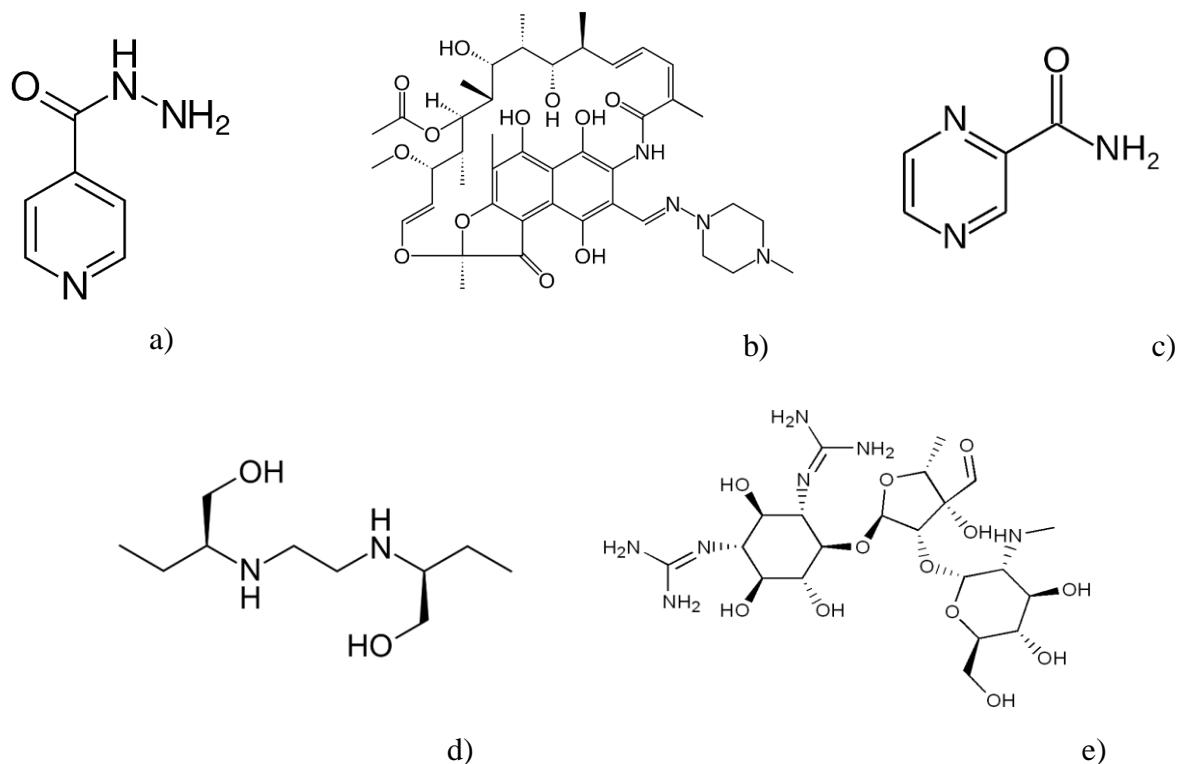
³⁶ Zvýšená hladina kyseliny močové v krvi

³⁷ Pokles počtu leukocytů v krvi

³⁸ Oční lékař

³⁹ Mezisvalový

poškození mozkových nervů jsou nevratná. Streptomycin je také nefrotoxický a při intramuskulárním podání se často objevuje bolestivá lokální reakce. [1,24]



Obrázek 9: Antituberkulotika první volby **a)** Isoniazid. *Převzato z citace:* [25], **b)** Rifampicin. *Převzato z citace:* [26], **c)** Pyrazinamid. *Převzato z citace:* [27], **d)** Ethambutol. *Převzato z citace:* [28], **e)** Streptomycin. *Převzato z citace:* [29]

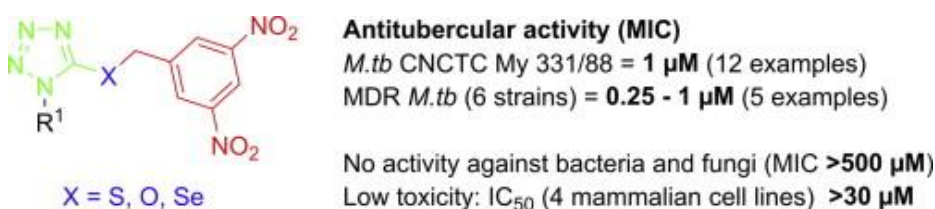
3.2 Vedlejší antituberkulotika

Jedná se o léčiva druhé volby, ke kterým se přistupuje pakliže nelze sestavit vhodný léčebný režim z 5 hlavních antituberkulotik. Mezi vedlejší antituberkulotika patří zástupci aminoglykosidových antibiotik (kanamycin, kapreomycin), cykloserin či ethionamid. Používají se k léčbě zejména rezistentních forem TB. Mezi takové formy se řadí multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB), extrémně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB) a totálně rezistentní tuberkulóza (TDR-TB). Multirezistence je definována odolností mykobakterií vůči 2 nejpoužívanějším antituberkulotikům, tj. isoniazidu a rifampicinu. Extrémní rezistence je způsobena kmeny, které splňují jak kritérium pro MDR-TB, tak vykazují odolnost vůči 2 libovolným vedlejším antituberkulotikům. Totálně rezistentní tuberkulóza, nejzávažnější z rezistentních forem TB, se vyznačuje rezistencí vůči všem antituberkulotikům první i druhé řady. Neustále dochází k vývoji nových antituberkulotik, mezi než se řadí jak léčiva, jejichž účel byl v rámci terapie změněn (rifamycin, clofazimine) tak i zcela inovativní sloučeniny (delamanid, bedaquiline). [1,30,31]

4 POPIS VÝZKUMU PROBÍHAJÍCÍHO NA FAF UK

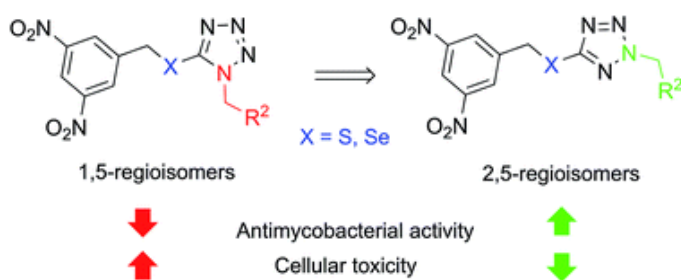
V rámci několikaletého výzkumu na FaF UK byly deriváty tetrazolu a 1,3,4-oxadiazolu obsahující nitro skupinu identifikovány jako slibná antituberkulotika. Tato kapitola popisuje objevy inovativních sloučenin, které otevřely dveře k dalším možnostem v oblasti léčby.

V předchozích pracích byl zkoumán vztah mezi strukturou benzylsulfanyl-tetrazolů a jejich antimykobakteriální aktivitou. V důsledku této studie byly 1-substituované 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-1*H*-tetrazoly a jejich oxa a selen analogy identifikovány jako vysoce účinné proti lékově citlivým a multirezistentním kmenům *M. tb.* bez křížové rezistence s běžně používanými antituberkulotiky. Studované látky vykazovaly vysokou a selektivní antimykobakteriální aktivitu, nízkou buněčnou toxicitu a genotoxicitu. Tato studie mimo jiné potvrdila, že obě dvě nitro skupiny na benzylové části sloučeniny jsou nutné pro vysoké antimykobakteriální účinky. Bylo také zjištěno, že 1-substituované 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a jejich 2,4-dinitrobenzylsulfanylové analogy vykazovaly několikanásobně větší aktivitu než benzylsulfanyl a 4-nitrobenzylsulfanylové analogy. [32,33]



Obrázek 10: Grafický abstrakt studie zabývající se 1-substituovanými 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a jejich isosterními analogy. *Převzato z citace:* [32]

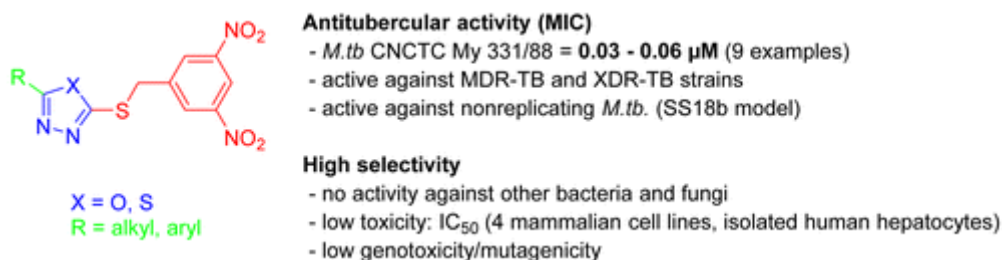
V následující práci byl studován vliv polohy substituentu na tetrazolovém cyklu a byla porovnána antimykobakteriální aktivita 1-alkyl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-2*H*-tetrazolů. Bylo zjištěno, že 2,5-disubstituované tetrazoly vykazují poněkud výhodnější vlastnosti ve srovnání s 1,5-regioizomery: mají vyšší antituberkulotickou aktivitu a nižší toxicitu. [34]



Obrázek 11: Grafický abstrakt studie zabývající se tetrazolovými regioizomery. *Převzato z citace:* [34]

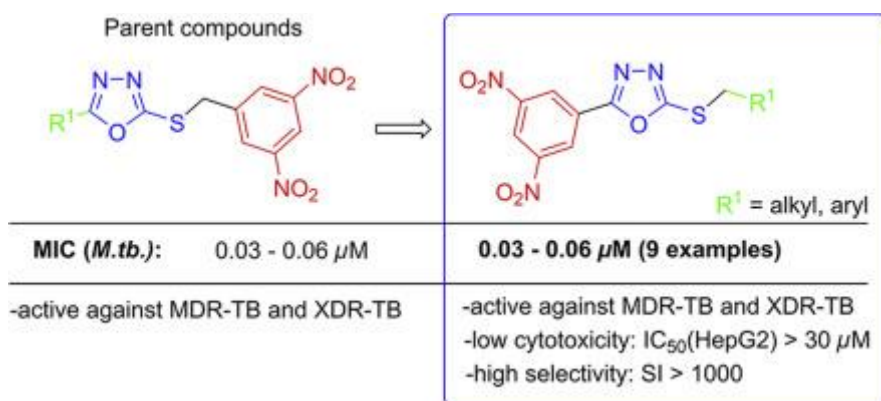
Dále byl studován vztah mezi strukturou a aktivitou v sérii 5-substituovaných 2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazolů a 1,3,4-thiadiazolů. Tyto sloučeniny vykazovaly vynikající antimykobakteriální aktivitu proti lékově citlivým a multirezistentním kmenům *M. tb.* bez křížové rezistence s běžně používanými antituberkulotiky. Navíc prokázaly studované látky vysokou účinnost vůči latentním kmenům *M. tb.* Zkoumané sloučeniny měly vysoce selektivní antimykobakteriální účinek, protože nevykazovaly žádnou aktivitu proti ostatním bakteriím

nebo houbám testovaným v této studii. Dále vykazovaly nízkou toxicitu *in vitro* ve čtyřech proliferujících savčích buněčných liniích a izolovaných primárních lidských hepatocytech. [33,35]



Obrázek 12: Grafický abstrakt studie zabývající se 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoly a thiadiazoly. *Převzato z citace:* [35]

V dalším výzkumu byla připravena řada tzv. reverzních analogů, kde 3,5-dinitrofenylová skupina byla připojena přímo na 1,3,4-oxadiazolový nebo tetrazolový cyklus. [38] Tyto sloučeniny vykazovaly vynikající antimykobakteriální účinky srovnatelné s původními 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazoly a tetrazoly, resp. měly tyto sloučeniny znovu vysoce selektivní účinek, protože nebyly účinné proti jiným bakteriím nebo houbám a měly malý účinek na proliferaci buněk savců. [33]



Obrázek 13: Grafický abstrakt studie zabývající se reverzními analogy. *Převzato z citace:* [36]

Poslední studie byla soustředěna na syntézu a zkoumání ve vodě rozpustných analogů již popsaných sloučenin s vysokou antimykobakteriální účinností. Byla připravena série terciárních aminových derivátů 3,5-dinitrofenyltetrazolu a oxadiazolových látek a byly vyhodnoceny jejich antimykobakteriální účinky *in vitro*. Bylo zjištěno, že studované sloučeniny vykazovaly antimykobakteriální aktivitu závislou na lipofilitě. Aktivita těchto sloučenin byla opět porovnatelná s účinností antituberkulotik první řady- isoniazidem a rifampicinem. Ve vodě rozpustné 3,5-dinitrofenyltetrazolové a oxadiazolové látky popsané v této práci jsou dobrými kandidáty pro další *in vitro* a *in vivo* farmakokinetické a farmakodynamické studie. [33,37]



Obrázek 14: Grafický abstrakt studie zabývající se ve vodě rozpustnými 3,5-dinitrofenyltetrazolovými a oxadiazolovými látkami. *Převzato z citace: [37]*

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Cílové látky a význam jejich syntézy

Cílem této práce je syntéza série nových sloučenin na bázi 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolů, 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazolů, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolů. U těchto látek bude studován vliv spojovacího řetězce mezi 3,5-dinitrofenylovým fragmentem a tetrazolovým cyklem na antimykobakteriální aktivitu sloučenin. Dále bude prostudován vliv polohy substituentu na tetrazolovém cyklu porovnáním aktivity 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů. V rámci substituce síry u dříve studovaných látek za uhlík v sérii nových derivátů je očekávána větší metabolická stabilita připravených sloučenin.

Celkem bude syntetizováno 18 látek, tj. jak meziproductů, tak finálních sloučenin. U 16 z nich budou postupně naměřena NMR-spektra, ručně stanovena teplota tání a zhotovena CHNS analýza kvůli jejich přesnější charakteristice. Pakliže bude kvantita finálních produktů dostačující, budou odeslány na měření antimykobakteriální aktivity na Oddělení bakteriologie a mykologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Z důvodu zjištění účinnosti budou aktivity finálních látek porovnány s předlohovými 3,5-dinitrobenzylsulfanyltetrazoly a také hydrazidem kyseliny isonikotinové, který se řadí mezi přední léčiva proti tuberkulóze.

5.2 Metodika výzkumu

Praktická část práce probíhala formou experimentu. Výzkum se uskutečnil na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Katedře organické a bioorganické chemie. Odborná činnost byla vedena Ing. Galinou Karabanovich, Ph.D. Syntetické postupy, podle kterých byly sloučeniny připraveny, jsou obecně známy a jsou široce používány v chemických laboratořích.

Během práce bylo v rámci syntézy finálních produktů provedeno celkem 5 základních kroků a to jak při přípravě sloučenin s jednoduchou vazbou, tak i těch s vazbou dvojnou. Byly to konkrétně přeměna kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové či 3,5-dinitrofenylakrylové na příslušný chlorid a dále na odpovídající amid, syntéza nitrilu, syntéza 1*H*-tetrazolu a 3 reakce alkylace získaného 1*H*-tetrazolu vhodnými alkylačními činidly. Reakce byly provedeny buď při míchání na magnetické míchače za laboratorní teploty nebo při míchání na magnetické míchače a současného zahřívání k varu pod zpětným chladičem. Pro kontrolu průběhu reakcí a kontrolu čistoty získaných sloučenin byla uskutečněna chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Pro zpracování reakcí byly použity takové metody jako filtrace za normálního či sníženého tlaku, extrakce (vytřepávání). Za účelem přečištění látek byla provedena sloupcová chromatografie.

Připravený 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamid byl izolován z reakční směsi pomocí vytřepávání a byl získán v dostatečné čistotě, aby mohl být použit v dalších krocích syntézy bez čištění. 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamid byl po reakci přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitril byl izolován z reakční směsi pomocí vytřepávání a byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, zatímco 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitril byl použit v dalších

krocích syntézy bez čištění. Látky 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazol a 5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazol byly získány tím způsobem, že z reakční směsi byla pomocí filtrace izolována sodná sůl tetrazolu, která byla rozpouštěna ve vodě a okyselením převedena na požadovaný tetrazol. Filtrací byly získány krystaly tetrazolů v dostatečné čistotě, aby mohly být použity v dalších krocích syntézy bez čištění. Finální produkty - 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazoly, 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazoly, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazoly a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazoly byly jako směs regioisomerů izolovány z reakční směsi pomocí vytřepávání. Prostřednictvím sloupcové chromatografie byly finální látky separovány od sebe.

5.3 Použité materiály

Použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich nebo byly dříve připraveny v rámci jiných studií. K tenkovrstvé chromatografii byly použity TLC hliníkové desky se silikagelem 60 F254 od firmy Merck. NMR analýza byla prováděna spektrometrem Varian Mercury Vx BB 300 a v rámci měření teplot tání byl využit bodotávek Kofler. Odpařování rozpouštědel bylo provedeno na vakuové rotační odparce Heidolph.

5.4 Použité separační a analytické metody

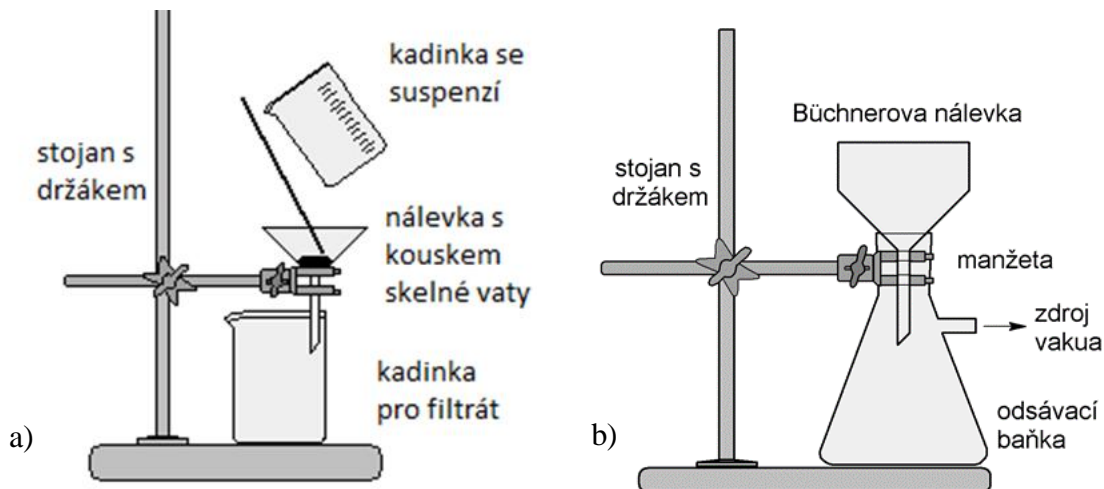
Kromě samotné syntézy nových cílových látek bylo nutno také izolovat látky z reakčních směsí a získat je v dostatečně čistém stavu, aby mohly být použity i v dalších krocích. Ačkoliv se říká, že čištění produktů je mnohdy pracnější než samotná syntéza, díky modernímu chemickému vybavení již není tento proces tak časově náročný. Základní charakteristiky použitých separačních a analytických metod vycházejí z postupů přesně popsanych v publikaci Chemická laboratorní technika pro farmaceuty, Hrabálek A. z roku 2000 [38] laboratoří Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Případné odlišnosti od standardních metodik jsou v dalším textu vždy přesně specifikovány.

5.4.1 Filtrace

Filtrace se používá, pakliže je nutno oddělit pevnou látku od kapalné. Spočívá v nalití suspenze na pórovitou přepážku tj. filtr, který je schopen propustit pouze kapalnou složku suspenze (filtrát), zatímco částičky pevné látky se na něm zachytí. Zásady filtrace jsou dokonalost a rychlost. O tom, do jaké míry bude dokonalá rozhodují jak vlastnosti filtrované látky, tak i filtr, který je používán. U rychlosti záleží především na velikosti pórů a filtrační plochy, typu filtrované látky, viskozitě rozpouštědla a přetlaku filtrované kapaliny. K běžné filtraci se nejčastěji používá filtrační papír s náležitou velikostí pórů dle velikosti částic, které jsou filtrovány. Pakliže je ale filtrován silně kyselý či alkalický roztok, používají se porézní destičky ze slinutého skla nebo skelná vata.

Při experimentální části byla uplatněna filtrace za normálního tlaku, kdy byla suspenze nalita na filtr a filtrát protekl působením gravitace. K filtraci za normálního tlaku byla použita nálevka s krátkým či delším stonkem a kousek vaty. Dalším druhem filtrace je filtrace za sníženého tlaku. Podstatou filtrace za sníženého tlaku je odsávání. Aparatura se skládá z Büchnerovy nálevky, jež je připojena k odsávací baňce za pomoci vrtané gumové zátky nebo guko-těsnění (konického gumového prstence). Odsávací baňka je tubusem napojena přes pojistnou nádobu

na vodní vývěvu. Perforované dno Büchnerovy nálevky je pokryto filtračním papírem tak, aby překrýval všechny otvory. Před začátkem filtrace je papír navlhčen rozpouštědlem, aby lépe přilnul ke dnu. Během filtrace je nutno dát pozor, aby koláč nepopraskal z důvodu špatného promývání. Po odsátí kapaliny následuje promývání, kdy se zavzdušní pojistná nádoba a k pevné látce je přidáno rozpouštědlo, směs je promíchána a vývěva je opět připojena.



Obrázek 15: Filtrace **a)** přes chomáček vaty, **b)** za sníženého tlaku. *Převzato z citace: [38]*

5.4.2 Extrakce

Rozhodujícím faktorem pro provedení extrakce je rozpustnost látek v rozdílných rozpouštědlech. Díky extrakci můžeme rozdělit směs dvou látek na základě rozdílných vlastností obsažených složek (rozpustnost v určitém rozpouštědle). Dle provedení se rozeznávají jednotlivé druhy extrakcí (extrakce tuhé látky kapalinou, tj. macerace, digesce; extrakce kapaliny kapalinou - vytřepávání).

Při našem výzkumu byla použita nejjednodušší forma extrakce, čili vytřepávání. Při této extrakci byla upotřebena dělicí nálevka společně s vhodnými rozpouštědly. Surový produkt byl extrahován mezi dvěma vzájemně nemísitelnými rozpouštědly. V našem případě byly použity voda a ethyl-acetát. Po vnesení produktu do systému dvou rozpouštědel, dělicí nálevka byla uzavřena, po převratu byl kohout povel, aby došlo k uvolnění tlaku. Poté byl kohout opět uzavřen a směs byla protřepána. Následně byla nálevka upevněna k laboratornímu stojanu a po chvíli se rozpouštědla rozdělila na 2 vrstvy.



Dělicí nálevka

Vrstva organického rozpouštědla
(ethyl-acetát)

Vrstva vodní

Laboratorní stojan

Kádinka

Obrázek 16: Extrakce (Autorka práce, 2019)

5.4.3 Kolonová chromatografie

Obecně se chromatografie řadí mezi separační metody, jelikož zde dochází k dělení směsi látek na jednotlivé složky. Chromatografie je založena na rozdílné interakce složek směsi v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpouštědlo). Jedním z druhů chromatografie je kolonová (neboli sloupcová) chromatografie, která se sestává ze tří hlavních kroků, tedy nanesení vzorku na kolonu, dělicího procesu a detekce.

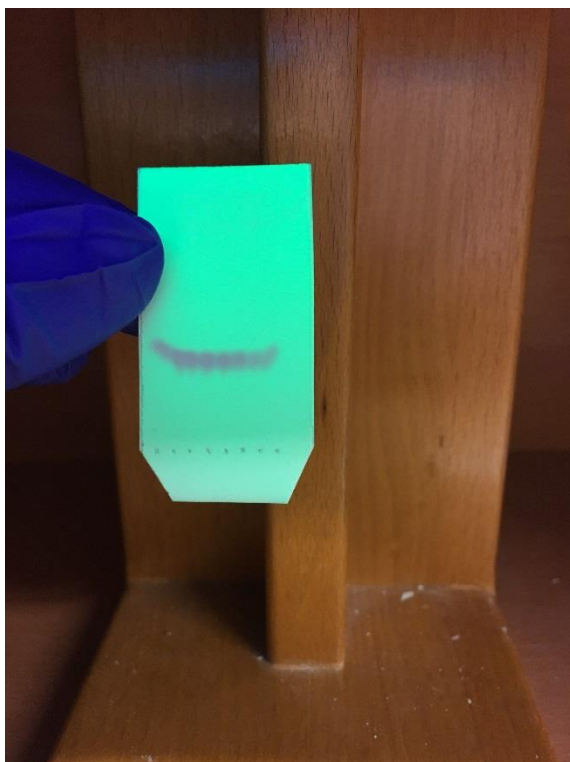


Obrázek 17: Kolonová chromatografie (Autorka práce, 2019)

Při kolonové neboli sloupcové chromatografii byla nejprve kolona připevněna k laboratornímu stojanu. Ve svislé poloze bylo její ústí ucpáno kouskem vaty a poté byl do ní při otevřeném kohoutě vlit adsorbent (silikagel) jako suspenze v mobilní fázi. Následně byl nanesen produkt adsorbovaný na silikagel (v suchém, sypkém stavu) a nakonec byl na koncovou část sloupce napojen zásobník na mobilní fázi. Při experimentální části byla využita především chromatografie za pomoci zvýšeného tlaku: na zásobník byla připevněna hadice se skleněným kohoutem, který byl upevněn klipsnou a byl zapnut stlačený vzduch, který urychloval protékání mobilní fáze přes sloupec. Vytékající frakce byly poté zachycovány do Erlenmeyerových baněk a přítomnost produktů byla detekována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) pod UV lampou. Pakliže se produkt objevil, tak se deska zabarvila do fialova, pokud ne, zůstala bezbarvá.

5.4.4 TLC (chromatografie na tenké vrstvě)

TLC, neboli *Thin-Layer Chromatography*, je dalším použitým typem chromatografie. Stejně jako u kolonové chromatografie, tak i u TLC je dělení jednotlivých složek směsi založeno na rozdílné interakci mezi mobilní a stacionární fází. Vzhledem k tomu, že TLC má spíše analytický charakter, stačí k ní pouze malý vzorek směsi.



Obrázek 18: TLC s produktem (Autorka práce, 2019)

K provedení TLC byl potřeba vhodný ústřížek hliníkové desky, na kterém je vrstva sorbentu většinou silikagelu, a chromatografická komora. Na desku s ustříženými růžky se tužkou označil start a do výšky cca 0,5 cm ode dna chromatografické komory se nalila náležitá mobilní fáze. Důležité bylo pracovat obezřetně, aby nebyla vrstva sorbentu narušena. Vzorek byl nanesen na start TLC pomocí kapiláry a vložen do chromatografické komory. Vztlínání hladiny mobilní fáze bylo pozorováno, a jakmile hladina dosáhla okraje ustřížené desky, byl chromatogram vyndán. Pakliže se jedná o nebarevnou látku absorbující UV záření, obsahuje

TLC i vrstvu lumiforu⁴⁰ a je tudíž hodnocena po UV lampou. Látka, která překrývá lumifor, nefluoreskuje a je dobře viditelná.

Jak už víme, TLC se řadí mezi analytické metody. Každá látka, kterou nanese na TLC, má vlastní retenční faktor. Retenční faktor je poměrem rychlosti pohybu studované látky a rychlosti pohybu ideálního standardu (mobilní fáze). Prakticky, retenční faktor se určuje jako poměr vzdálenosti středu skvrny studované látky od startu (namalovaná čára tužkou před začátkem vývoje) a vzdálenost čela chromatogramu od startu. Rozdílnost retenčních faktorů výchozích látek a produktu dá využít ke zjištění průběhu reakce. Nanese-li na start i standard výchozí látky, v rámci porovnání s reakční směsí můžeme určit, zda-li reakce proběhla nebo ne. Pokud se kromě skvrny produktu, vyskytne i skvrna reaktantu, který se shoduje se skvrnou standardu, znamená to, že reakce ještě neproběhla. Toto hodnocení bylo také využito v experimentální části práce.

⁴⁰ Lumifor- látka schopná pohlcovat energii a následně ji vyzařovat ve formě světla

6 SYNTÉZA CÍLOVÝCH LÁTEK

6.1 Syntéza 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazolů

6.1.1 Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (NM5a)

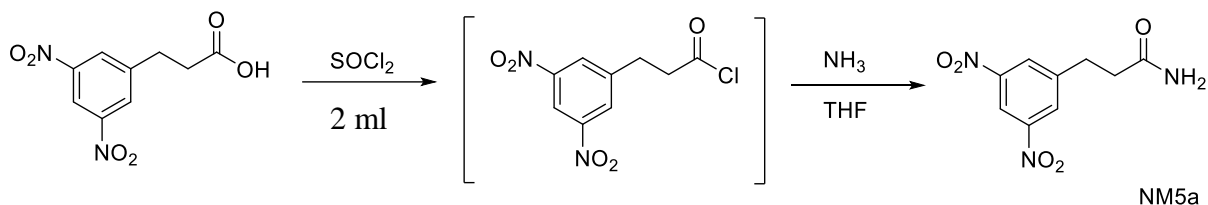


Schéma 1: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (NM5a)

Roztok 3-(3,5-dinitrofenyl)-propanové kyseliny (0,5 g; 240,17 g/mol; 2,081 mmol) ve 7 ml thionyl chloridu byl zahříván k varu 3 hodiny. Došlo ke vzniku 3-(3,5-dinitrofenyl)propanoylchloridu. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs smíchána s 15 ml hexanu a následně byla odpařena na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku. Do baňky se surovým 3-(3,5-dinitrofenyl)propanoylchloridem byl přidán suchý tetrahydrofuran (7 ml) a směs byla probublána amoniakem za neustálého míchání na magnetické míchačce míchadlem. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 2 hodin. Jelikož se požadovaný produkt, amid, vykristalizoval jen v malém množství, byl do baňky přidán ethyl-acetát (30 ml) a 5 % roztok uhlíčitanu sodného (30 ml) a byla provedena extrakce. Cílový produkt zůstává v organickém rozpouštědle (ethyl-acetátu), zatímco vzniklý chlorid amonný a nezreagovaný meziproduct přetrvávají ve vodní fázi. Následně byla organická vrstva promyta 1 % kyselinou chlorovodíkovou (1 × 20 ml) a čistou vodou (2 × 20 ml), vysušena bezvodým síranem sodným (který byl poté odfiltrován prostou filtrací přes vatu) a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku. Požadovaná látka (NM5a) byla získána v dostatečné čistotě, aby mohla být použita v dalších krocích syntézy bez dalšího čištění. Čistota produktu byla ověřena pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethylacetát 3:1).

Charakterizace 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (NM5a)

Molekulová hmotnost: 239,19 g/mol

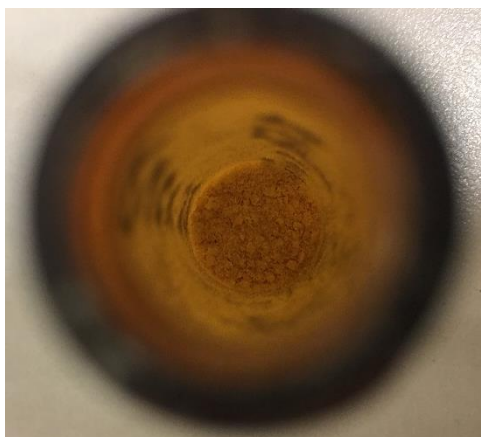
Teoretický výtěžek: 0,498 g

Praktický výtěžek: 0,3 g (60 %)

Vzhled: nažloutlá sypká krystalická látka

Teplota tání: 107-108 °C

NMR spektrum: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,67 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,54 (d, *J* = 2,2 Hz, 2H), 7,33 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 3,08 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,51 – 2,48 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172,85, 148,08, 146,45, 129,27, 116,48, 35,69, 30,11.



Obrázek 19: 3-(3,5-Dinitrofenyl)propanamid (NM5a)

6.1.2 Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitrilu (NM6a)

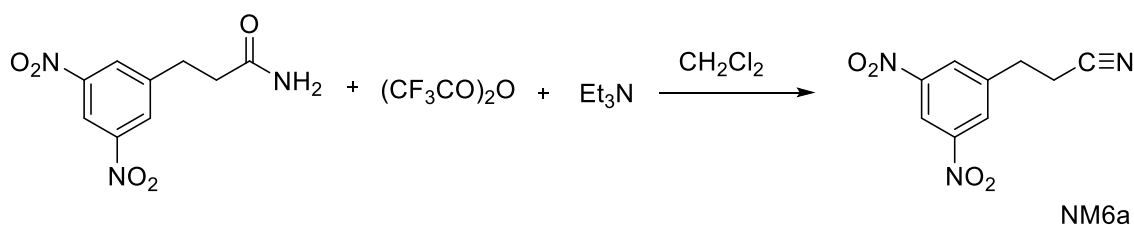


Schéma 2: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitrilu (NM6a)

Do roztoku 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (0,27 g; 239,19 g/mol; 1,128 mmol) v 7 ml dichlormethanu byl přidán triethylamin (0,171 g; 0,24 ml; 101 g/mol; $\rho = 0,726$ g/ml; 1,693 mmol) a trifluoroacetanhydrid (0,355 g; 0,24 ml; 210,03 g/mol; $\rho = 1,49$ g/ml; 1,69 mmol). Reakční směs byla přes noc míchána za laboratorní teploty. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 3:1). Jakmile vzorek reakční směsi již neobsahoval výchozí amid, bylo míchání reakce ukončeno a reakce zpracována.

K reakční směsi byl přidán hydrogenuhličitan sodný za účelem neutralizace vzniklé kyseliny trifluoroctové. Následně byl k reakční směsi přidán další dichlormethan (20 ml) a vzniklé vrstvy (organické rozpouštědlo a vodní fáze) byly odděleny v dělicí nálevce. Organická fáze byla následně promyta čistou vodou (2 × 20 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. K organické fázi byl přidán silikagel, aby absorboval produkt, a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku. Cílový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 4:1). Zhruba po 6 frakcích se objevil produkt, kterého bylo sesbíráno celkem 8 frakcí po 15 ml. Všechny frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny.

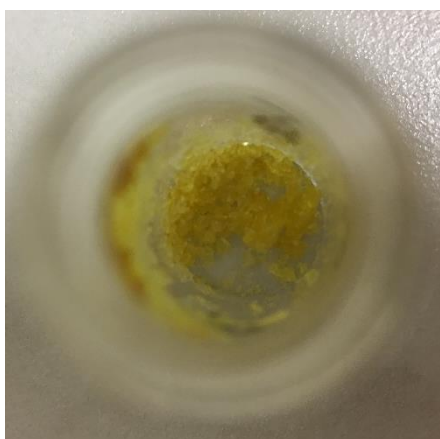
Charakterizace 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitrilu (NM6a)

Molekulová hmotnost: 221,17 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,25 g

Praktický výtěžek: 0,19 g (76 %)

Vzhled:	sytě žlutá krystalická látka
Teplota tání:	106-107 °C
NMR spektrum:	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,71 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 8,65 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 3,18 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,94 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 148,57, 144,03, 130,00, 120,28, 117,73, 30,09, 18,07.



Obrázek 20: 3-(3,5-Dinitrofenyl)propannitril (NM6a)

6.1.3 Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM1a)

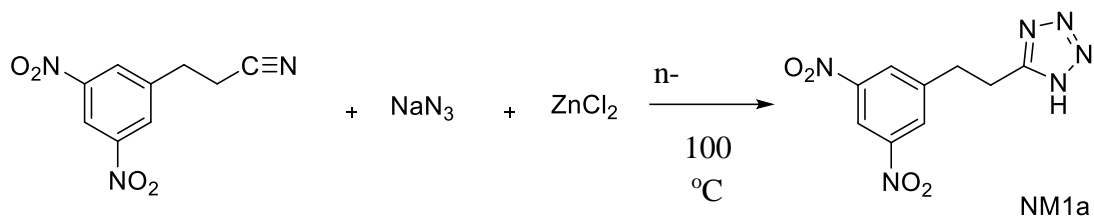


Schéma 3: Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM1a)

Suspenze 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitrilu (1 g; 221,17 g/mol; 4,52 mmol), azidu sodného (0,353 g; 65 g/mol; 5,42 mol) a chloridu zinečnatého (0,616 g; 136,28 g/mol; 4,52 mmol) v 20 ml n-butanolu byla ohřívána 18 hodin na 100 °C.

Pomocí TLC jsme porovnali standart výchozí látky a reakční směs (mobilní fáze: hexan/ethylacetát 3:1). Byl určen konec reakce a zároveň bylo zjištěno, že v reakční směsi vznikají vedlejší nežádoucí produkty. Po ochlazení reakce na laboratorní teplotu byla provedena filtrace za sníženého tlaku. Sraženina na filtru byla seškrabána do kádinky a smíchána s 10 % roztokem hydroxidu sodného (20 ml). Vzniklý roztok byl extrahován s ethyl-acetátem (EtOAc 30 ml). EtOAc byl oddělen v dělicí nálevce od vodní vrstvy a zlikvidován. K vodní vrstvě byla přidávána HCl (do pH \approx 2) za účelem zvýšení acidity, což vedlo ke vzniku krystalků 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM1a). Vzniklé krystalky byly odfiltrovány za sníženého tlaku, promyty destilovanou vodou do neutrálního pH a pak vysušeny v exsikátoru nad oxidem

fosforečným (jako sušidlem). Produkt NM1a byl získán v dostatečné čistotě, aby byl použit v dalším reakčním kroku syntézy.

Charakterizace 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM1a)

Molekulová hmotnost: 264,20 g/mol

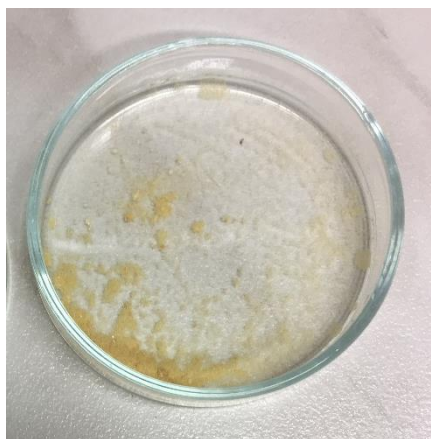
Teoretický výtěžek: 1,19 g

Praktický výtěžek: 0,394 g (33 %)

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Teplota tání: 174-175 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,66 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 8,56 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 3,31 (s, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 148,53, 145,21, 129,87, 117,29, 32,09, 24,31.



Obrázek 21: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-1H-tetrazol (NM1a)

6.1.4 Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM2a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM2b)

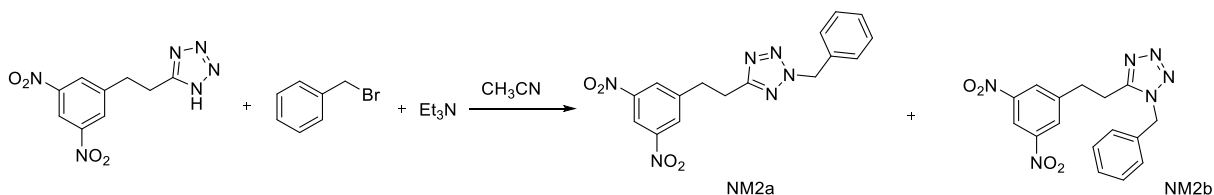


Schéma 4: Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM2a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM2b)

K roztoku 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (0,2 g; 264,20 g/mol; 0,757 mmol) v 10 ml acetonitrilu byl přidán triethylamin (0,1 g; 0,14 ml; 101,19 g/mol; $\rho = 0,726$ g/ml; 0,984 mmol) a následně přidán benzylbromid (0,155 g; 0,107 ml; 171,04 g/mol; $\rho = 1,44$ g/ml; 0,908 mmol), jakožto alkylační činidlo. Reakce byla míchána 8 hod při laboratorní teplotě na magnetické

míchačce. Neboť reakce neproběhla kompletně, byla poté reakční směs zahřívána k varu po dobu 4 hodin.

Po ukončení reakce, byla reakční směs NM2 odpařena na rotační vakuové odparce a následně byl produkt extrahován mezi 5 % roztokem uhličitanu sodného (25 ml) a ethyl-acetátem (25 ml). Požadované produkty NM2a a NM2b a zbytky alkylačního činidla zůstávají v organické fázi, zatímco triethylamonium bromid a popřípadě nezreagovaný tetrazol jsou rozpuštěny ve vodné fázi. Organická vrstva byla oddělena od vodní, promyta čistou vodou (2 × 20 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. Po filtraci přes kousek vaty byl k filtrátu přidán silikagel za účelem adsorbce produktů a ethyl-acetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Produkty byly separovány a přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 2:1). Byly sesbírány jednotlivé frakce (po 15 ml). Podle TLC bylo zjištěno, v jakých frakcích se nachází jaký produkt. Frakce byly následně příslušně smíchány a odpařeny. Takto došlo k oddělení 2 finálních produktů.

Charakterizace 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM2a)

Molekulová hmotnost: 354,33 g/ mol

Teoretický výtěžek: 0,268 g

Praktický výtěžek: 0,063 g (24 %)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 76-77 °C

NMR spektrum: ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ 8,85 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,35 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,40 – 7,28 (m, 5H), 5,68 (s, 2H), 3,37 – 3,33 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ 164,71, 148,41, 144,52, 132,96, 129,09, 129,00, 128,85, 128,33, 117,02, 56,76, 33,13, 26,26.



Obrázek 22: 2-Benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol (NM2a)

Charakterizace 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM2b)

Molekulová hmotnost: 354,33 g/ mol

Teoretický výtěžek: 0,268 g

Praktický výtěžek:	0,027 g (10 %)
Vzhled:	světle žlutá krystalická látka
Teplota tání:	132-133 °C
NMR spektrum:	¹ H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ 8,84 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,25 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2H), 7,41 – 7,33 (m, 3H), 7,19 – 7,12 (m, 2H), 5,54 (s, 2H), 3,26 (t, <i>J</i> = 7,4 Hz, 2H), 3,10 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 2H). ¹³ C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ 152,94, 148,49, 143,45, 132,99, 129,46, 129,29, 128,75, 127,30, 117,36, 51,00, 31,80, 24,48.



Obrázek 23: 1-Benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazol (NM2b)

6.1.5 Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2*H*-tetrazolu (NM3a) a 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-tetrazolu (NM3b)

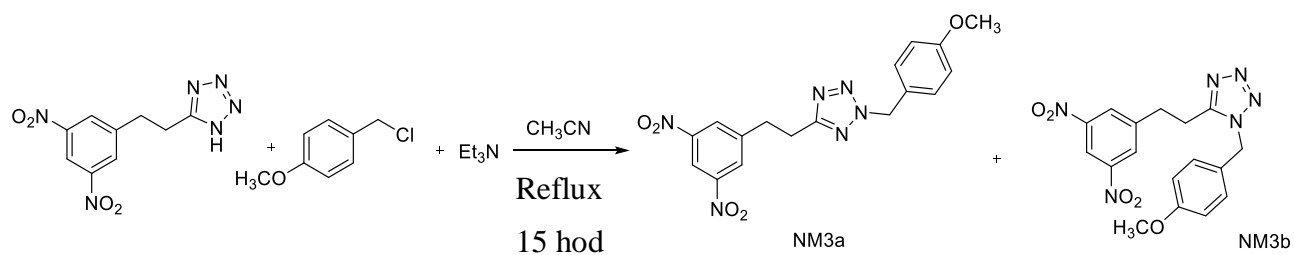


Schéma 5: Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2*H*-tetrazolu (NM3a) a 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1*H*-tetrazolu (NM3b)

K roztoku 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolu (0,2 g; 264,20 g/mol; 0,757 mmol) v 10 ml acetonitrilu byl přidán triethylamin (0,1 g; 101 g/mol; 1 mmol) a následně byl přidán 4-methoxybenzyl chlorid (0,142 g; 156,61 g/mol; 0,91 mmol) a byla směs zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 15 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze hexan/ethylacetát 2:1)

Po ochlazení reakční směs byla odpařena na rotační vakuové odparce a následovala její extrakce vytřepáním mezi ethyl-acetátem (25 ml) a 5 % roztokem uhličitanu sodného (25 ml). Požadované produkty NM3a a NM3b a zbytky alkylačního činidla zůstávají v organické fázi,

zatímco triethylamonium-chlorid a popřípadě nezreagovaný tetrazol jsou rozpuštěny ve vodní fázi. Organická vrstva byla oddělena od vodní, promyta čistou vodou (2 × 20 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. Po filtraci přes kousek vaty byl k filtrátu přidán silikagel, aby absorboval produkty, a ethyl-acetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Produkty byly separovány a přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 5:1→4:1)

Zhruba po 15 frakcích se objevil první produkt (NM3a) a bylo sesbíráno celkem osm 15 ml frakcí s ním. Tyto frakce byly slity do baňky a odpařeny. Sloupcová chromatografie pokračovala a cca po 13 frakcích se objevil druhý produkt (NM3b), jehož bylo sesbíráno celkem šest frakcí po 15 ml. Druhý produkt byl také odpařen.

Charakterizace 5-(3,5-dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2H-tetrazolu (NM3a)

Molekulová hmotnost: 384,35 g/mol

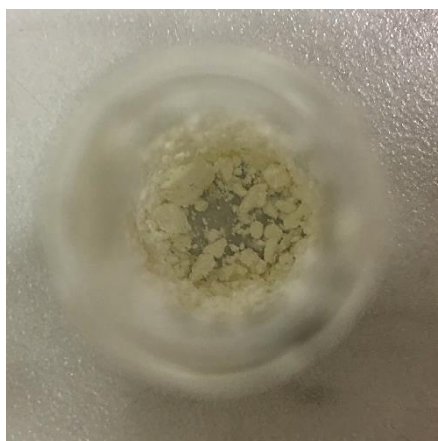
Teoretický výtěžek: 0,231 g

Praktický výtěžek: 0,065 g (28 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 135-136 °C

NMR spektrum: ¹H NMR (500 MHz, Aceton-d₆) δ 8,76 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,56 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 7,29 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,72 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,45 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,37 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Aceton-d₆) δ 149,28, 130,68, 130,04, 127,02, 117,33, 114,89, 56,51, 55,55, 33,50, 26,81.



Obrázek 24: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2H-tetrazol (NM3a)

Charakterizace 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-tetrazolu (NM3b)

Molekulová hmotnost: 384,35 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,231 g

Praktický výtěžek: 0,058 g (25 %)

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Teplota tání:	119-120 °C
NMR spektrum:	^1H NMR (500 MHz, Aceton- d_6) δ 8,76 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8,53 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7,21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6,88 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 5,60 (s, 2H), 3,79 (s, 3H), 3.45 (s, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, Aceton- d_6) δ 160,73, 154,56, 149,29, 145,72, 130,08, 130,02, 127,30, 117,55, 115,05, 55,55, 50,44, 32,50, 24,83.



Obrázek 25: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-tetrazol (NM3b)

6.1.6 Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM4a) a 1-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM4b)

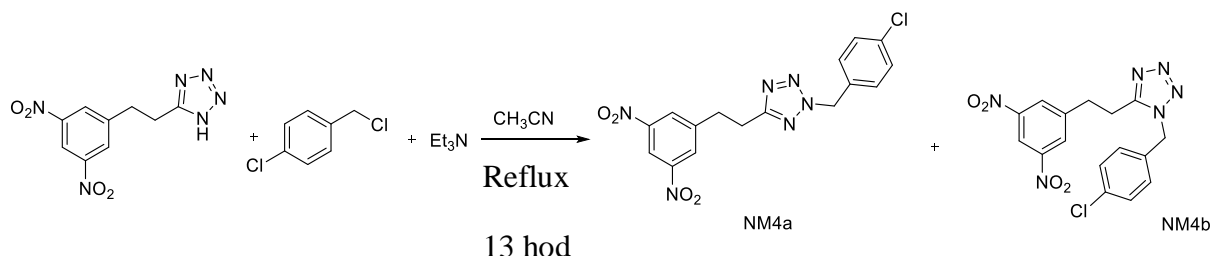


Schéma 6: Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM4a) a 1-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM4b)

K roztoku 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (0,2 g; 264,20 g/mol; 0,757 mmol) v 10 ml acetonitrilu byl přidán triethylamin (0,1 g; 101 g/mol; 1mmol) a následně byl přidán 4-chlorbenzyl chlorid (0,114 g; 161,03 g/mol; 0,708 mmol) a reakční směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 13 hodin. Konec reakce byl určen TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát, 2:1).

Po ochlazení bylo rozpouštědlo odpařeno a surový produkt byl extrahován mezi ethyl-acetátem (25 ml) a 5 % roztokem uhličitanu sodného (25 ml). Požadované produkty NM4a a NM4b a zbytky alkylačního činidla zůstávají v organické fázi, zatímco triethylamonium-chlorid a popřípadě nezreagovaný tetrazol jsou rozpuštěny ve vodní fázi. Organická vrstva byla oddělena od vodní, promyta čistou vodou (2 × 20 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. Po filtraci

přes kousek vaty, byl k filtrátu přidán silikagel, aby absorboval produkty, a ethyl-acetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Produkty byly separovány a přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 4:1→2:1). První produkt (NM4a) se objevil po 9 frakcích a bylo sesbíráno 8 frakcí po 15 ml. Standardní TLC byla provedena s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 2:1. Frakce s produktem NM4a byly slity do baňky a odpařeny. Druhý produkt (NM4b) byl odhalen po 17 frakcích a bylo jej sesbíráno 5 frakcí po 15 ml. Následně byla vykonána TLC s mobilní fází hexan/ethylacetát 1:1 a čistota produktu se potvrdila. Frakce s produktem NM4b byly slity do baňky a odpařeny.

Charakterizace 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolu (NM4a)

Molekulová hmotnost: 388,77 g/mol

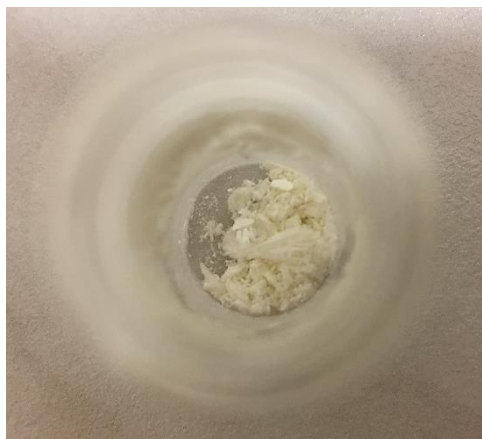
Teoretický výtěžek: 0,294 g

Praktický výtěžek: 0,086 g (36 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 123-124 °C

NMR spektrum: ¹H NMR (500 MHz, Aceton-d₆) δ 8,77 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,57 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,84 (s, 2H), 3,47 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,34 – 3,37 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Aceton-d₆) δ 166,17, 149,31, 146,31, 134,97, 134,05, 130,94, 130,04, 129,71, 117,35, 56,12, 33,46, 26,81.



Obrázek 26: 2-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol (NM4a)

Charakterizace 1-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu (NM4b)

Molekulová hmotnost: 388,77 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,294 g

Praktický výtěžek: 0,073 g (25 %)

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Teplota tání: 107-108 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (500 MHz, Aceton- d_6) δ 8,78 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 8,57 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,29 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 5,71 (s, 2H), 3,54 – 3,46 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, Aceton- d_6) δ 149,33, 145,75, 134,75, 134,43, 130,31, 130,10, 129,83, 117,56, 50,07, 32,44, 24,72.



Obrázek 27: 1-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazol (NM4b)

6.2 Syntéza 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolů

6.2.1 Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (NM10a)

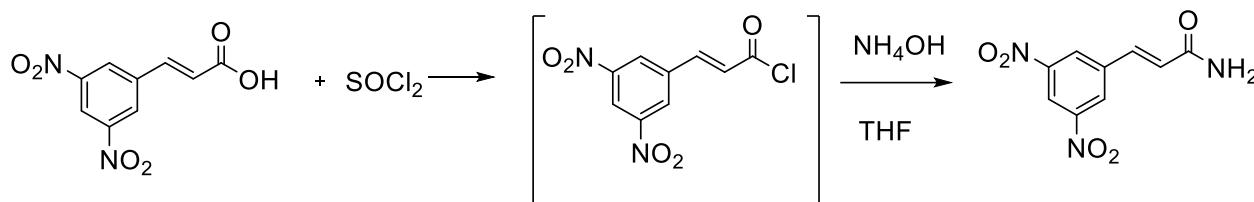


Schéma 7: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (NM10a)

Roztok 3-(3,5-dinitrofenyl)-akrylové kyseliny (2,5 g; 238,16 g/mol; 10,4 mmol) byl s 15 ml thionyl chloridu zahříván k varu po dobu 3 hodin. Tímto způsobem došlo ke vzniku 3-(3,5-dinitrofenyl)akryloylchloridu, k němuž bylo po ochlazení na laboratorní teplotu přidáno 15 ml hexanu. Směs byla následně odpařena na vakuové odparce za sníženého tlaku. Do baňky se surovým 3-(3,5-dinitrofenyl)-akryloylchloridem byl následně přidán tetrahydrofuran (20 ml) a vzniklý roztok byl pomalu přidán do baňky s vodným roztokem amoniaku (25-27 %) za chlazení v ledové lázni. Po hodině promíchání reakční směsi míchadlem na magnetické míchače byl roztok odpařen. Vzniklý surový produkt, amid, byl následně extrahován mezi ethyl-acetátem (70 ml) a 5 % roztokem uhličitanu sodného (30 ml). Organická vrstva byla oddělena od vodní, promyta čistou vodou (2 × 20 ml), vysušena bezvodým síranem sodným a přefiltrována přes vat. K filtrátu byl přidán silikagel a roztok byl odpařen za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Mezitím byla připravena kolona k sloupcové chromatografii, jejíž mobilní fáze se sestávala z hexan/ethyl-acetátu v poměru 1:1. Celkem bylo nasbíráno 8 frakcí

po 40-50 ml. Tyto frakce byly slity do baňky a odpařeny za sníženého tlaku. Poté byla finální látka (NM10a) již dostatečně čistá, aby mohla být použita v dalších krocích.

Charakterizace 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (NM10a)

Molekulová hmotnost: 237,17 g/mol

Teoretický výtěžek: 3,08 g

Praktický výtěžek: 2,34 g (76 %)

Vzhled: tmavě žlutá krystalická látka

Teplota tání: 74 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,75 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H), 8,72 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,81 – 7,24 (m, 2H), 7,32 (s, 1H), 6,94 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 166,11, 149,04, 139,10, 135,63, 128,19, 127,80, 118,89.



Obrázek 28: 3-(3,5-Dinitrofenyl)akrylamid (NM10a)

6.2.2 Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (NM11a)

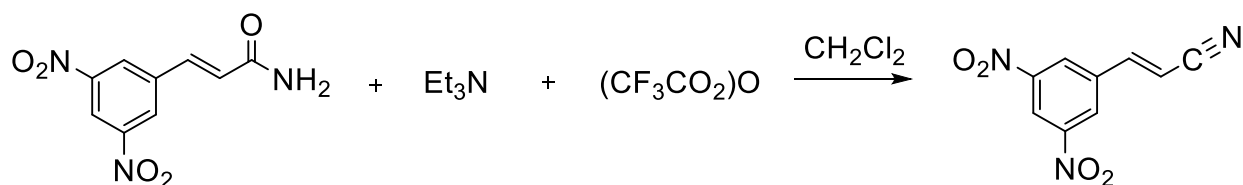


Schéma 8: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (NM11a)

Reakční směs se sestávala z roztoku 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (2,34 g; 237,17 g/mol; 9,87 mmol) ve 100 ml dichlormethanu, do kterého byl přidán triethylamin (1,5 g; 2,06 ml; $\rho = 0,726$ g/ml; 14,85 mmol) a trifluoroacetanhydrid (3,11 g; 1,9 ml; $\rho = 1,641$ g/ml; 14,81 mmol). Směs byla za laboratorní teploty míchána přes noc. Dále bylo provedeno TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1), které určilo konec reakce.

Po ukončení reakce, byl do ní přidán hydrogenuhličitan sodný v rámci neutralizace. Následovala extrakce za použití dichlormethanu jako organického rozpouštědla. Vzniklá organická fáze byla oddělena od vodní, promyta čistou vodou (2 x 50 ml), vysušena bezvodým síranem sodným a filtrována přes vatku. Výsledný produkt se nacházel již v dostatečné čistotě, aby mohl být použit v dalším kroku syntézy.

Charakterizace 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (NM11a)

Molekulová hmotnost: 219,16 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,16g

Praktický výtěžek: 1,87 g (87 %)

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Teplota tání: 81 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,93 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 8,83 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 16,7$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 148,72, 146,71, 137,17, 127,87, 119,93, 118,02, 102,86.



Obrázek 29: 3-(3,5-Dinitrofenyl)akrylonitril (NM11a)

6.2.3 Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM12a)

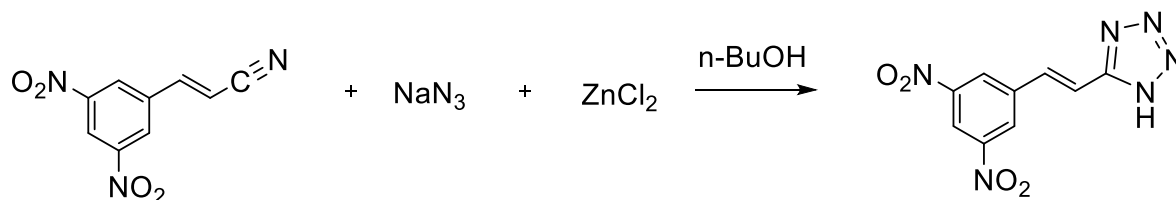


Schéma 9: Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM12a)

Suspenze 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (1,82 g; 219,16 g/mol; 8,30 mmol), azidu sodného (0,65 g; 65 g/mol; 10 mmol) a chloridu zinečnatého (1,13 g; 136,29 g/mol; 8,29 mmol) ve 30 ml n-butanolu byla zahřívána na teplotu 100 °C pod zpětným chladičem po dobu 7 hodin.

Konec reakce byl určen pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1) se standardem výchozí látky. Takto bylo také zjištěno, že se v ní nacházejí i nežádoucí produkty, které je potřeba eliminovat. Po ochlazení reakce na laboratorní teplotu byla provedena filtrace za sníženého tlaku. Následně byl filtrační koláč sesbírán do kádinky a promíchán s 10 % roztokem hydroxidu sodného (40 ml) na magnetickém míchadle. Vzniklý roztok byl extrahován s ethyl-acetátem (EtOAc 40 ml). Vrstva EtOAc byla oddělena od vodní vrstvy a zlikvidována. Vodní vrstva byla dále okyselena pomocí HCl (do pH \approx 2), tím pádem došlo ke vzniku krystalků 5-(3,5-dinitrostryryl)-1H-tetrazolu (NM12a). Vytvořené krystalky byly odfiltrovány za sníženého tlaku a promyty destilovanou vodou do neutrálního pH. Posledním krokem bylo TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát/octová kyselina, 20:10:1), které potvrdilo čistotu požadovaného produktu NM12a.

Charakterizace 5-(3,5-dinitrostryryl)-1H-tetrazolu (NM12a)

Molekulová hmotnost: 262,19 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,18 g

Praktický výtěžek: 1,29 g (59 %)

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Teplota tání: 164 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,94 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 8,74 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 155,78, 149,13, 139,28, 133,68, 127,86, 118,79, 117,20.



Obrázek 30: 5-(3,5-Dinitrostryryl)-1H-tetrazol (NM12a)

6.2.4 Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)- 2H-tetrazolu (NM14a)

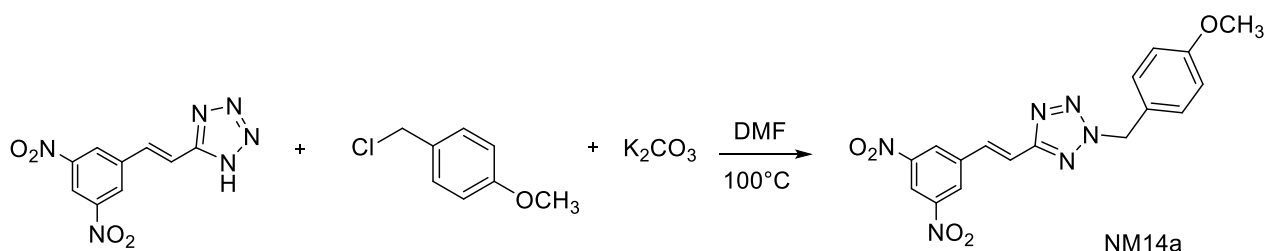


Schéma 10: Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)- 2H-tetrazolu (NM14a)

Reakční směs sestávající se z 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (0,2 g; 262,19 g/mol; 0,76 mmol), uhličitanu draselného (0,137 g; 138 g/mol; 0,99 mmol) a 4-methoxybenzyl chlorid (0,143 g; 156,61 g/mol; 0,91 mmol) v 15 ml dimethylformamidu, byla zahřívána na 100 °C po dobu 10 hodin.

Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 2:1). Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo (DMF) odpařeno na rotační vakuové odparce. Dále byl surový produkt rozpouštěn v 50 ml ethyl-acetátu a byl promyt vodou (2 x 50 ml) a roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Organická vrstva obsahující finální produkt byla oddělena od vodní, vysušena bezvodým síranem sodným a filtrována přes vat. K roztoku byl přidán silikagel a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Dále byla provedena sloupcová chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 3:1 → 2:1). Podle TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1) bylo zjištěno, v jakých frakcích se nachází produkt. Frakce byly následně příslušně smíchány a odpařeny.

Během syntézy byla pozorována tvorba obou regioisomerů: 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů. Avšak 1,5-derivát vznikal v malém množství a nepodařilo se ho izolovat v čistém stavu.

Charakterizace 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)- 2H-tetrazolu (NM14a)

Molekulová hmotnost: 382,34 g/mol

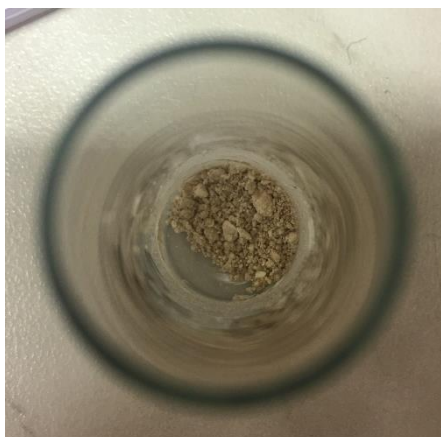
Teoretický výtěžek: 0,29 g

Praktický výtěžek: 0,11 g (38 %)

Vzhled: béžová krystalická látka

Teplota tání: 199,5 °C

NMR spektrum: ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,01 (s, 2H), 8,74 (s, 1H), 7,93 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,89 (s, 2H), 3,74 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163,08, 159,67, 148,77, 139,36, 131,99, 130,31, 127,41, 126,02, 119,40, 118,13, 114,40, 55,90, 55,35.



Obrázek 31: 5-(3,5-Dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)-2H-tetrazol (NM14a)

6.2.5 Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolu (NM15a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM15b)

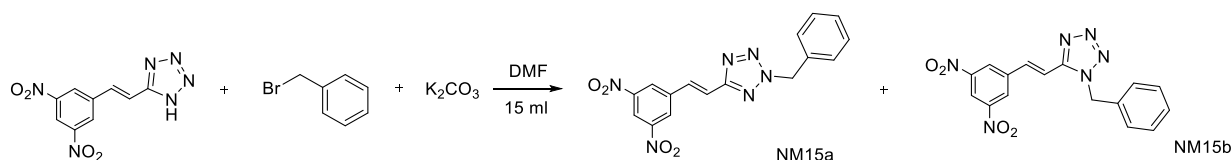


Schéma 11: Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolu (NM15a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM15b)

K roztoku 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (0,2 g; 262,19 g/mol; 0,76 mmol) v 15 ml dimethylformamidu byl přidán uhličitán draselný (0,14 g; 138,2 g/mol; 1,01 mmol) a benzylbromid (0,16 g; 171,04 g/mol; 0,94 mmol), který hrál roli alkylačního činidla. Směs reaktantů byla zahřívána na 100 °C po dobu 7 hodin.

Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo (DMF) odpařeno na rotační vakuové odparce. Dále bylo produkt rozpouštěn v 50 ml ethyl-acetátu a byl promyt vodou (2 x 50 ml) a roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Organická vrstva obsahující finální produkty byla oddělena od vodní, vysušena bezvodým síranem sodným a filtrována přes vat. K roztoku byl přidán silikagel a rozpouštědlo bylo odpařeno. Dále byla provedena sloupcová chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 3:1 a následně 2:1). Podle TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1) bylo zjištěno, v jakých frakcích se nachází jaký produkt. Frakce byly následně příslušně smíchány a odpařeny. Takto došlo k oddělení 2 finálních produktů NM15a a NM15b.

Charakterizace 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazolu (NM15a)

Molekulová hmotnost: 352,84 g/mol

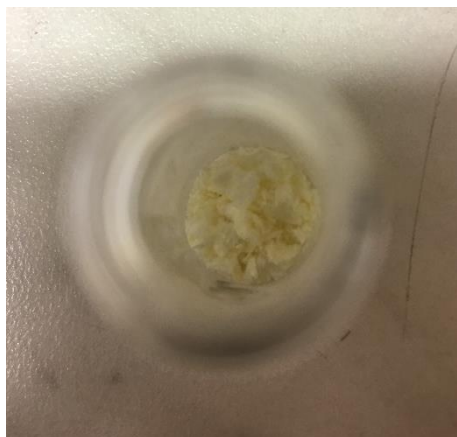
Teoretický výtěžek: 0,29 g

Praktický výtěžek: 0,12 g (41 %)

Vzhled: lehce nažloutlá krystalická látka

Teplota tání: 154 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,01 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 8,74 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H), 7,42 – 7,39 (m, 5H), 5,98 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163,17, 148,76, 139,35, 134,16, 132,08, 129,06, 128,82, 128,60, 127,41, 119,36, 118,14, 56,30.



Obrázek 32: 2-Benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazol (NM15a)

Charakterizace 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazolu (NM15b)

Molekulová hmotnost: 352,84 g/mol

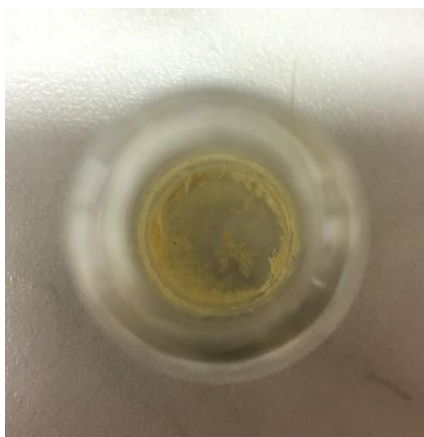
Teoretický výtěžek: 0,3 g

Praktický výtěžek: 0,08 g (27 %)

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Teplota tání: 122 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,12 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 8,80 (t, $J = 2,1$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H), 8,06 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H), 7,44 – 7,30 (m, 5H), 5,92 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 152,14, 148,82, 138,74, 135,54, 135,15, 129,11, 128,56, 128,01, 127,94, 118,85, 113,82, 49,86.



Obrázek 33: 1-Benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazol (NM15b)

6.2.6 Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolu (NM16a)

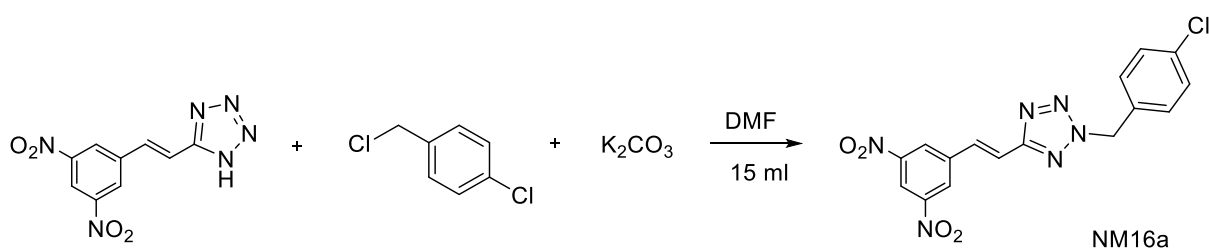


Schéma 12: Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolu (NM16a)

K roztoku 5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolu (0,2 g; 262,19 g/mol; 0,76 mmol) v 15 ml dimethylformamidu byl přidán uhličitán draselný (0,14 g; 138,2 g/mol; 1,01 mmol) a 4-chlorbenzyl chlorid (0,15 g; 161,03 g/mol; 0,93 mmol), jakožto alkylační činidlo.

Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo (DMF) odpařeno na rotační vakuové odparce. Dále produkt byl rozpouštěn v 50 ml ethyl-acetátu a byl promyt vodou (2 x 50 ml) a roztokem chloridu sodného (1 x 30 ml). Organická vrstva obsahující finální produkty byla oddělena od vodní, vysušena bezvodým síranem sodným a filtrována přes vat. K roztoku byl přidán silikagel a rozpouštědlo bylo odpařeno. Dále byla provedena sloupcová chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 3:1 a následně 2:1). Podle TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1) bylo zjištěno, v jakých frakcích se nachází produkt. Frakce byly následně příslušně smíchány a odpařeny.

Během syntézy byla pozorována tvorba obou regioisomerů: 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů. Avšak 1,5-derivát vznikal v malém množství a nepodařilo se ho izolovat v čistém stavu.

Charakterizace 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolu (NM16a)

Molekulová hmotnost: 386,75 g/mol

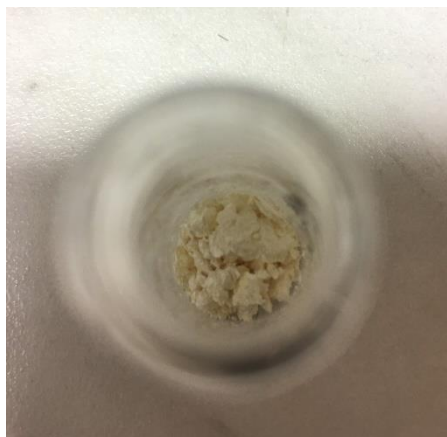
Teoretický výtěžek: 0,29 g

Praktický výtěžek: 0,08 g (28 %)

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 223 °C

NMR spektrum: ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,01 (d, $J = 2,1$ Hz, 2H), 8,74 (s, 1H), 7,94 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,00 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 163,25, 148,78, 139,35, 133,64, 133,14, 132,20, 130,67, 129,11, 127,47, 119,32, 118,21, 55,46.



Obrázek 34: 2-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazol (NM16a)

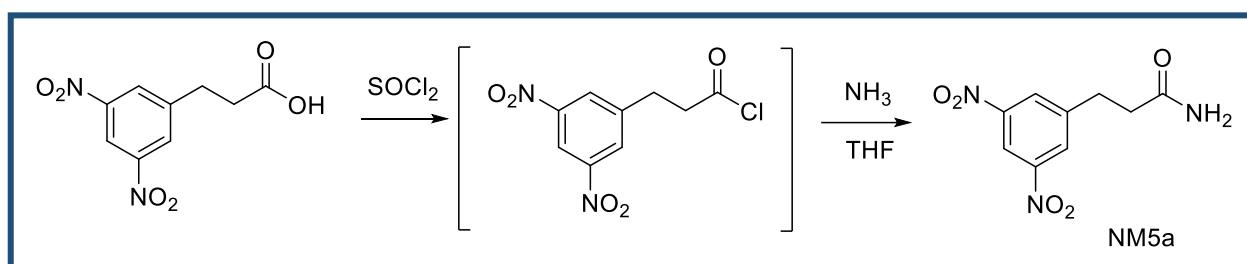
7 MECHANISMY REAKCÍ PROVEDNÝCH V TÉTO PRÁCI

Při laboratorní činnosti bylo provedeno 6 různých typů reakcí, kterými byly připraveny požadované produkty. V této kapitole jsou popsány mechanismy provedených reakcí pro fenethylové deriváty. Mechanismy reakcí pro styryl-deriváty jsou stejné.

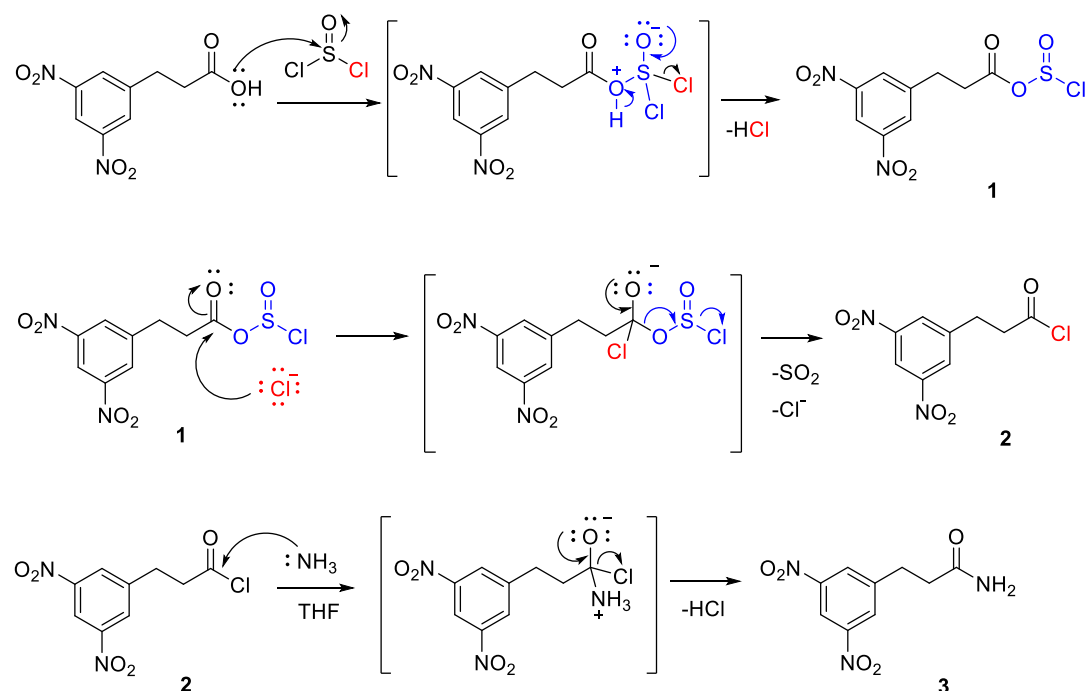
7.1 Syntéza amidu kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové:

První sloučeninou, která byla syntetizována, je amid kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové. Syntéza látky se skládala ze dvou kroků: v prvním kroku byl z odpovídající karboxylové kyseliny připraven chlorid kyseliny, který se ve druhém kroku přeměnil na amid.

Schéma reakce:



Mechanismus reakce:



7.1.1 Reakce karboxylové kyseliny s thionyl-chloridem

Atom kyslíku karboxylové kyseliny, který má nepárové elektrony a nese parciálně záporný náboj, je připojen na atom síry thionyl chloridu (vlivem atomů chloru a posunem elektronové hustoty ke kyslíku získává síra parciálně kladný náboj). Pro vytvoření meziproduktu (uveden v závorce), opouští jeden atom chloru a atom vodíku molekulu a vzniká smíšený anhydrid

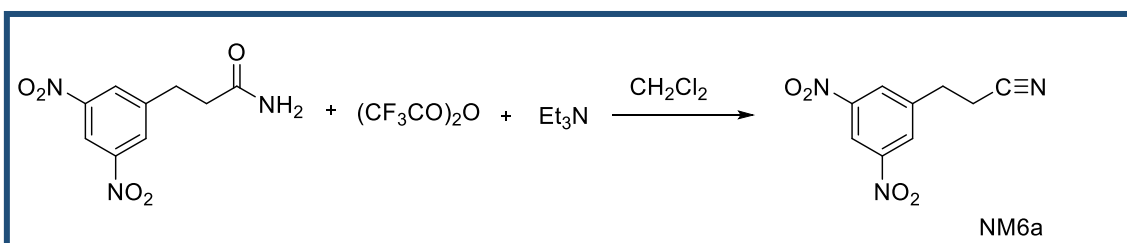
kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové a kyseliny chlorsiřičité (**1**). Meziprodukt **1** obsahuje dobře odstupující skupinu (modrá barva na schématu). Atom chloru (červená barva), který byl uvolněn v prvním stupni, se vrátí a nahrazuje odstupující skupinu obsahující síru, čímž vzniká chlorid kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové (**2**).

7.1.2 Reakce chloridu kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové (**2**) s amoniakem

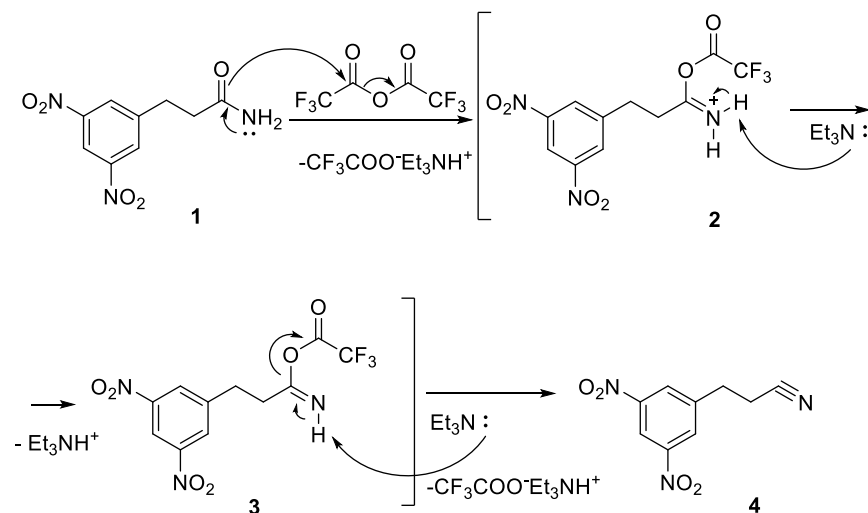
Atom uhlíku chloridu kyseliny **2** získává působením atomu chloru a posunem elektronové hustoty k atomu kyslíku parciálně kladný náboj, a proto snadno podléhá nukleofilní substituci. Amoniak NH_3 se připojuje na uhlík chloridu kyseliny **2** za vzniku intermediátu uvedeného v závorce. Eliminací atomu chloru a atomu vodíku dojde ke vzniku požadovaného amidu kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové **3**.

7.2 Syntéza (3,5-dinitrofenyl)propannitrilu

Schéma reakce:



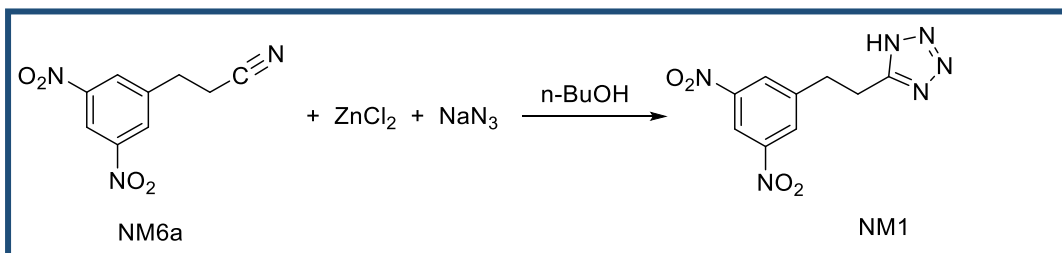
Mechanismus reakce:



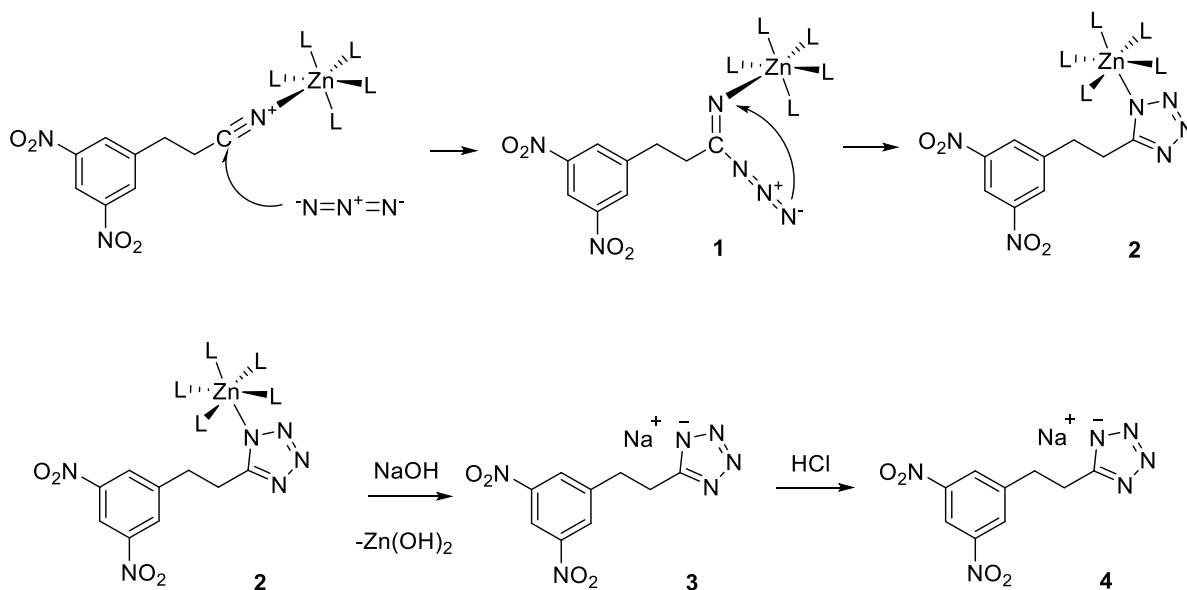
Reakce je zahájena reakcí amidu kyseliny **1** na atomu kyslíku, který na sebe odtahuje elektronovou hustotu a tím získává záporný parciální náboj. Tento atom se napojuje na uhlík trifluoroacetanhydridu, který má kladný parciální náboj, za vzniku meziproductu **2** a za odstoupení triethylamonium-trifluoroacetátu. V následujících krocích odtrhává báze (Et_3N) protony za vzniku meziproductu **3** a požadovaného nitrilu **4**. Během posledního kroku při odštěpení protonu (působením báze) odstupuje trifluoroacetátová skupina (je dobrou a stabilní odstupující skupinou) za vzniku triethylamonium-trifluoroacetátu.

7.3 Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu

Schéma reakce:



Mechanismus reakce:

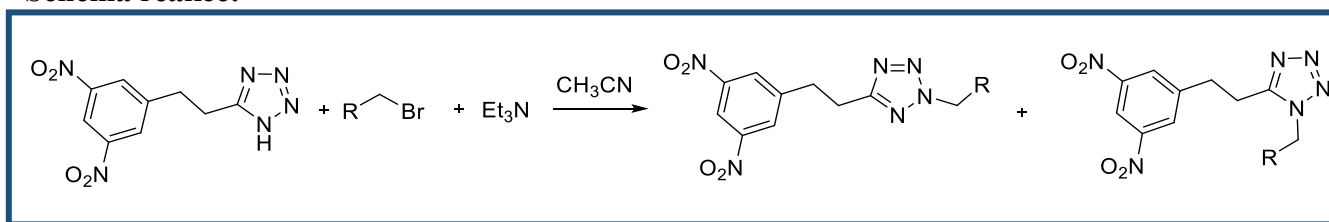


L = ligandy (Cl, N₃, BuOH, H₂O)

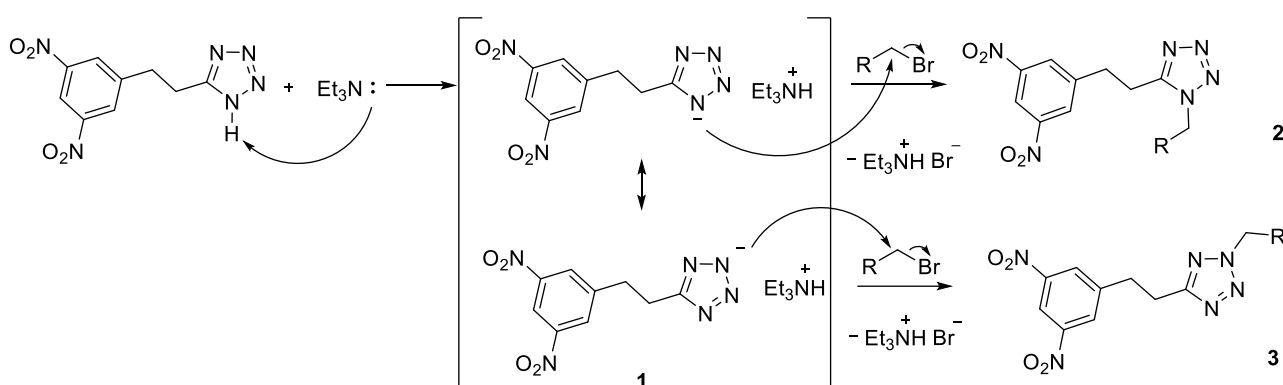
Mechanismus tvorby tetrazolového cyklu z odpovídajícího nitrilu a azidu je [2+3] cykloadice. V prvním okamžiku reakce (3,5-dinitrofenyl)propannitril vytváří komplex s chloridem zinečnatým, čímž se nitril aktivuje pro adici azidu. Vznikající komplex je dále stabilizován molekulami rozpouštědla. Azid sodný je 1,3-dipolární sloučenina, která vstupuje do reakce dipolární cykloadice nukleofilní adicí azidu na atom uhlíku, jež náleží komplexu nitrilu se zinkem. Dochází ke vzniku meziprojektu **1**. V dalším kroku probíhá uzavření tetrazolového cyklu – vzniká komplex požadovaného tetrazolu se zinkem **2**. Pro získání 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolu **4** se meziprojekt **2** rozpouští v hydroxidu sodném – komplex **2** se rozpadá na hydroxid zinečnatý a sodnou sůl tetrazolu **3**. Působením koncentrované chlorovodíkové kyseliny získáváme 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazol **4**.

7.4 Syntéza 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazolů a 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazolů:

Schéma reakce:



Mechanismus reakce:



Působením triethylaminu na 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1H-tetrazol vzniká triethylamonná sůl **1**. Negativní náboj tetrazolu může být lokalizován na dusíku N¹ nebo N² tetrazolového cyklu. Atom dusíku tedy vystupuje jako nukleofil a navazuje se na atom uhlíku alkylačního činidla R-CH₂-Br, který působením halogenu má parciální kladný náboj. Během reakce se odštěpuje atom bromu za vzniku triethylamonium-bromidu a vznikají dva finální produkty: 1,5- (**2**) a 2,5- (**3**) disubstituované tetrazoly, které se liší polohou substituentu na tetrazolovém cyklu (což je vysvětleno právě lokalizací nábojů v cyklu). Hlavním produktem většinou bývá ze sterických důvodů 2,5-disubstituovaný tetrazol **3**, avšak nastavením reakčních podmínek (vhodné rozpouštědlo, zvýšení reakční teploty) lze získat i 1,5-disubstituovaný tetrazol **2** v uspokojivém výtěžku.

8 SHRUTÍ HLAVNÍCH VÝSLEDKŮ

V průběhu zpracování tohoto projektu bylo připraveno celkem 18 sloučenin. Dvě látky - 3-(3,5-dinitrofenyl) propanoylchlorid a 3-(3,5-dinitrofenyl)-akryloylchlorid – byly připraveny, izolovány, ale nebyly charakterizovány, jelikož byly ihned použity v dalším kroku syntézy. U ostatních 16 sloučenin byla změřena NMR-spektra (uvedena v charakterizacích sloučenin, grafy uvedeny v příloze), zhotovena CHNS analýza (uvedena v příloze) a stanovena teplota tání. Všechny finální produkty byly připraveny v dostatečném množství, aby je bylo možno odeslat na hodnocení antimykobakteriální aktivity.

8.1 Vyhodnocení získaných produktů

Během práce bylo v rámci syntézy finálních produktů provedeno celkem 5 základních kroků a to jak při přípravě sloučenin s jednoduchou vazbou, tak i těch s vazbou dvojnou. Byly to konkrétně přeměna kyseliny 3,5-dinitrofenylpropionové či 3,5-dinitrofenyl-akrylové na příslušný chlorid a dále na odpovídající amid, syntéza nitrilu, syntéza 1*H*-tetrazolu a 3 reakce alkylace získaného 1*H*-tetrazolu vhodnými alkylačními činidly.

Produkty 3-(3,5-Dinitrofenyl)propanamid a odpovídající nitril byly získány ve vysokých výtěžcích: 60 % za dva kroky a 76 %, resp. Odpovídající tetrazol byl získán ve výtěžku 33 %. Nízký výtěžek byl zapříčiněn hlavně tím, že po izolaci čistých krystalů tetrazolu filtrací byl zlikvidován další podíl tetrazolu získaného extrakcí a to z důvodu jeho velkého znečištění vedlejšími nežádoucími látkami. Alkylací 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolu vhodnými alkylačními činidly byla připravena série 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolů ve výtěžku 10-25 % a série 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazolů ve výtěžku 24-36 %. Jelikož během alkylace vznikají dva produkty- 1,5- a 2,5-regioizomery, tak byl celkový výtěžek reakcí alkylace 34 až 61 %. 2-Alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazoly vznikají ze sterických důvodů ve vyšším výtěžku.

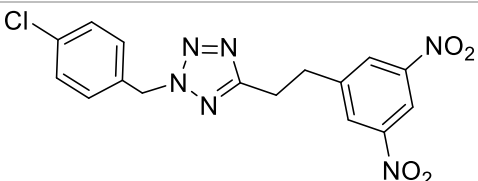
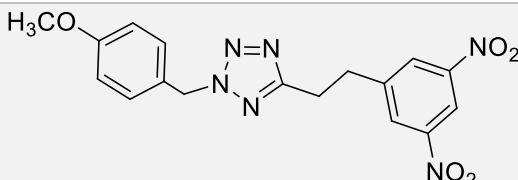
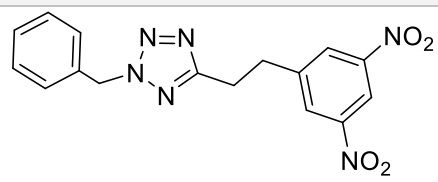
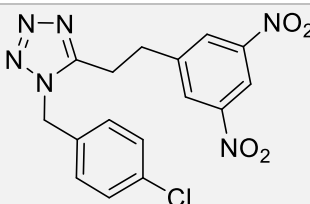
Produkty 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamid a příslušný nitril byly získány ve vysokých výtěžcích, tedy 76 % a 87 % za 2 kroky. Požadovaný tetrazol byl získán v 59 % výtěžku, což je obtožné množství, jelikož byl také znečištěn. Alkylací 5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolu vhodnými alkylačními činidly vznikl 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)-2*H*-tetrazol ve výtěžku 38 %, dále 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazol (41 %), 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazol (27 %) a 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazol, který dosahoval výtěžku 28 %.

U všech získaných produktů (meziproduktů a finálních sloučenin) byla změřena NMR-spektra a zhotovena CHNS analýza pro ověření čistoty a totožnosti látek. Každá sloučenina byla rovněž charakterizována teplotou tání. Finální sloučeniny: 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazoly, 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazoly, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazoly a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazoly byly připraveny v dostačujícím množství, aby je bylo možné odeslat na testování antimykobakteriální aktivity.

8.1.1 Antimykobakteriální aktivita finálních produktů

Deset finálních látek bylo otestováno na *in vitro* antimykobakteriální aktivitu vůči *M.tuberculosis* CNCTC⁴¹ My 331/88, *M.kansasii* CNCTC My 235/80 a *M.avium* CNCTC My 330/88. Testování bylo provedeno na Oddělení bakteriologie a mykologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. *In vitro* antimykobakteriální aktivita byla stanovena po inkubaci látek s mykobakteriemi v Šulově půdě při 37 °C po 14/21 dnů pro *M.tuberculosis* a *M.avium*, a po 7/14/21 dnech pro *M.kansasii*. Aktivita sloučenin je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) v $\mu\text{mol/L}$, což je koncentrace sloučeniny, která viditelně inhibuje růst ≥ 99 % mykobakterií. Do tabulky 2 jsou přidány hodnoty *in vitro* antimykobakteriálních aktivit předlokových látek – 1-benzyl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1*H*-tetrazolu a 2-benzyl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-2*H*-tetrazolu a aktivita léčiva první volby – isoniazidu.

Tabulka 2: *In vitro* antimykobakteriální aktivity fenethyl a styryl derivátů vyjádřená jako MIC ($\mu\text{mol/L}$)

		<i>M.tb</i>	<i>M.avium</i>	<i>M.kansasii</i>
		<i>My 331/88</i>	<i>My 330/88</i>	<i>My 235/80</i>
		14 /21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
NM4a		8	500nárůst	32
		16	500nárůst	>32
NM3a		8	500nárůst	>32
		16	500nárůst	>32
NM2a		8	500nárůst	16
		16	500nárůst	32
NM4b		8	500nárůst	16
		16	500nárůst	>32

⁴¹ CNCTC- Česká národní sbírka typových kultur

NM3b		1	500nárůst	8
		1	500nárůst	16 32
NM2b		8	500nárůst	16
		8	500nárůst	32 >32
NM16a		16	500nárůst	>32
		16	500nárůst	>32 >32
NM14a		8	500nárůst	16
		8	500nárůst	32 >32
NM15a		16	500nárůst	32
		16	500nárůst	>32 >32
NM15b		8	500nárůst	16
		16	500nárůst	32 >32
Předložené sloučeniny		1	62	8
		1	125	16
				16
		1	25	2
	2	250	8	
			8	
Isoniazid		0,5	250	250

Legenda k tabulce 2: V tabulce 2 jsou uvedeny zkratky a strukturní vzorce finálních produktů, předlokové sloučeniny a jejich strukturní vzorce a nakonec isoniazid, antituberkulotikum první řady, pro porovnání. Tyto látky byly testovány na konkrétních kmenech mykobakterií z České národní sbírky typových kultur, a to *M.tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M.kansasii* CNCTC My 235/80 a *M.avium* CNCTC My 330/88. Uvedený počet dní zastává dobu, po kterou byly látky inkubovány s mykobakteriemi, číselné hodnoty pak udávají aktivitu sloučenin jako minimální inhibiční koncentraci (MIC) v $\mu\text{mol/L}$. To je právě taková koncentrace sloučeniny, u které je viditelně potvrzeno, že zpomaluje růst ≥ 99 % mykobakterií.

Při porovnání *in vitro* antimykobakteriálních aktivit nově připravených sloučenin s aktivitou předlokových látek je vidět (viz tabulka 2 na str. 65), že záměna síry za uhlík ve spojovacím řetězci vedla ke snížení účinnosti. Z tabulky 2 také vyplývá, že substituent vázaný na N^1 nebo N^2 -tetrazolu málo ovlivňuje účinek získaných sloučenin. Na aktivitu rovněž nemá vliv ani poloha substituentu na tetrazolovém cyklu. Aktivita NM3b může naznačovat, že je tato látka výjimečná - její aktivita je porovnatelná s aktivitou isoniazidu a předlokových sloučenin, ale také, že má tato látka vyšší toxicitu, což je potřeba ještě zkontrolovat a podrobněji ověřit. Porovnání aktivity fenethyl a styryl derivátů v tabulce 2 ukazuje, že sloučeniny s jednoduchou a dvojnou vazbou mají stejnou antimykobakteriální aktivitu.

9 DISKUSE

Tato práce navazuje na studii [32], ve které byl zkoumán vztah mezi strukturou benzylsulfanyltetrazolů a jejich antimykobakteriální aktivitou. V rámci této studie byly vyhodnoceny 1-alkyl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1*H*-tetrazoly jako nejúčinnější. V další studii [34] byla porovnána antimykobakteriální aktivita 1-alkyl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-2*H*-tetrazolů. V této studii bylo zjištěno, že 2,5- disubstituované tetrazoly prokázaly vyšší antituberkulotickou aktivitu a nižší toxicitu ve srovnání s 1,5 -regioizomery.

Cílem tohoto projektu byla syntéza nových derivátů na základě dříve studovaných tetrazolů, kde by byla skupina S-CH₂ v spojovacím řetězci nahrazena skupinou CH₂-CH₂ a CH=CH. Úkolem bylo syntetizovat sérii 1-alkyl-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolů, 2-alkyl-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazolů, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolů a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazolů. Cílové sloučeniny byly syntetizovány s dostatečným výtěžkem a následně hodnoceny mikrobiologicky *in vitro* pro zjištění antimykobakteriální aktivity proti *M.tb* CNCTC My 331/88 (H37Rv), netuberkulózním mykobakteriálním kmenům *M. avium* CNCTC My 330/88 a *M. kansasii* CNCTC My 235/80. Porovnáním antimykobakteriálních aktivit nově připravených 3,5-dinitrofenethyltetrazolů a 3,5-dinitrostyryltetrazolů s původními 3,5-dinitrobenzylsulfanyltetrazoly byl studován vliv spojovacího řetězce mezi 3,5-dinitrofenylovým fragmentem a tetrazolovým cyklem na jejich účinnost. Bylo stanoveno, že nové deriváty vykazují nižší antimykobakteriální aktivitu.

V rámci alkylace 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazolu byly připraveny oba požadované finální produkty: 1,5- a 2,5- disubstituované tetrazoly u fenethyl-derivátů. Z toho důvodu u nich bylo možné srovnat aktivitu obou regioizomerů a určit, že poloha substituentu na cyklu neovlivňuje účinek získaných sloučenin. Co se týká reakce alkylace 5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazolu, byl připraven pouze jeden pár regioisomerů, které vykazaly stejnou účinnost. V případě ostatních reakcí byl pozorován vznik obou regioisomerů, avšak 1,5-deriváty se nepodařilo izolovat v čistém stavu.

Porovnání aktivity fenylethyl a styryl derivátů ukázalo, že sloučeniny s jednoduchou a dvojnou vazbou mají stejnou antimykobakteriální aktivitu. Při dalším rozšíření projektu by se eventuálně dalo pokračovat ve zkoumání efektů spojovacího řetězce mezi substituovaným fenylovým a tetrazolovým fragmentem a to konkrétně vložením trojné vazby.

10 ZÁVĚR

V průběhu zpracování tohoto projektu bylo připraveno celkem 18 sloučenin, z čehož bylo 10 finálních produktů. Mezi těmito nově připravenými látkami byly následnou analýzou vyhledávány sloučeniny s potenciální antimykobakteriální aktivitou. Dvě látky, tj. 3-(3,5-dinitrofenyl)-propanoylchlorid a 3-(3,5-dinitrofenyl)-akryloylchlorid – byly připraveny, izolovány, ale nebyly charakterizovány, jelikož byly ihned použity v dalším kroku syntézy. U ostatních 16 sloučenin byla změřena NMR-spektra, zhotovena CHNS analýza pro ověření čistoty a totožnosti látek a stanovena teplota tání. Finální sloučeniny: 1-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1*H*-tetrazoly, 2-alkyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2*H*-tetrazoly, 1-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1*H*-tetrazoly a 2-alkyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2*H*-tetrazoly byly připraveny v dostačujícím množství za účelem testování jejich antimykobakteriální aktivity.

Při porovnání *in vitro* antimykobakteriálních aktivit nově připravených sloučenin s aktivitou předlohových je možné formulovat závěr, že záměna 3,5-dinitrobenzylsulfanylové skupiny za 3,5-dinitrofenethylovou či 3,5-dinitrostyrylovou skupinu ve spojovacím řetězci vedla ke snížení účinnosti. Aktivita látky NM3b může naznačovat, že je tato látka unikátní- její aktivita je porovnatelná s aktivitou isoniazidu a předlohových sloučenin, ale bude ještě nutné testovat míru toxicity této látky. Porovnání aktivity fenethyl- a styryl-derivátů ukazuje, že sloučeniny s jednoduchou a dvojnou vazbou mají stejnou antimykobakteriální aktivitu. Z výsledků dále vyplývá, že substituent vázaný na N^1 nebo N^2 -tetrazolu ovlivňuje účinek získaných sloučenin pouze nevýrazně. Na antimykobakteriální aktivitu rovněž nemá vliv ani poloha substituentu na tetrazolovém cyklu.

Všechny nové získané poznatky jsou přínosem pro studium vztahů mezi strukturou a aktivitou připravených látek a stanou se možným podkladem pro další studie.

11 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOMOLKA, Jiří a Vladimír VOTAVA. Tuberkulóza. 3. vyd. Praha: Karolinum, **2003**. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0630-5.
- [2] Global Tuberculosis Report 2019. In: Who.int [online]. Switzerland: World Health Organisation, **2019** [cit. 2020-01-31]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>
- [3] Ukraine- Tuberculosis profile. In: Tuberculosis country profiles [online]. WHO Headquarters in Geneva, **2019** [cit. 2020-1-31]. Dostupné z: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=UA&LAN=EN&outtype=html
- [4] Czechia- Tuberculosis profile. In: Tuberculosis country profiles [online]. WHO Headquarters in Geneva, **2019** [cit. 2020-1-31]. Dostupné z: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=CZ&LAN=EN&outtype=html
- [5] BAJAN, Anton. Tuberkulóza. Martin: Osveta, **1990**, 218 s. ISBN 80-217-0078-5.
- [6] HERZOG, H. History of Tuberculosis. Basel, **1998**. Academic article. S. Karger AG.
- [7] Ayvazian LF: History of tuberculosis; in Reichman LB, Hershfield (eds): Tuberculosis. New York, Dekker, **1993**
- [8] Historie onemocnění tuberkulózou. Ceskatelevize.cz [online]. Česká republika: Česká televize, **2011** [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://www.ceskatelevize.cz/porady/10104119181-osm-dni-zdravi-v-evrope/1505-historie-onemocneni-tuberkulozou/>
- [9] HAMPLOVÁ, Lidmila. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, **2015**, 263 s. ISBN 978-80-7387-934-1
- [10] BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, **1996**, 558 s.
- [11] KARABANOVICH, Galina. Synthesis and structure-antimycobacterial activity relationship study of dinitrobenzylsulfanyl heteroaromates. Hradec Králové, **2014**. PhD Thesis. Charles university in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Inorganic and Organic Chemistry.
- [12] Antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny: Buněčná stěna mykobakterií. *Mikrobiologie.xf.cz* [online]. Česká republika: Autor stránek mikrobiologie.xf.cz, **2020** [cit. 2020-03-08]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>

- [13] BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Colorado, USA, **2003**. Academic article. Department of Microbiology, B308 Microbiology Building, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA.
- [14] BHAMIDI, Suresh, Michael S. SCHERMAN, Christopher D. RITHNER, Jessica E. PRENNI, Delphi CHATTERJEE, Kay-Hooi KHOO a Michael R. MCNEIL. The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **2008**, 283(19), 12992-13000 [cit. 2019-01-07]. DOI: 10.1074/jbc.M800222200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M800222200>
- [15] NAVRÁTIL, Leoš. Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, **2017**, 559 s. ISBN 978-80-271-0210-5.
- [16] ČEŠKA, Richard, TESAŘ, Vladimír, Petr DÍTĚ a Tomáš ŠTULC, ed. Interna. Praha: Triton, **2010**. ISBN 978-80-7387-423-0.
- [17] MUSIL, Jaromír, František PETŘÍK a Martin TREFNÝ. Pneumologie: (učebnice pro studenty lékařství). Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, **2005**, 248 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0993-2.
- [18] PERSON, Anna K., April C. PETTIT a Timothy R. STERLING. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection: an update. New York, **2013**. Respiratory infections article. Springer Science+Business Media New York.
- [19] ROŽÁNEK, Pavel a Vladimír MOLNÁR. Tuberkulóza a mykobakteriózy dnes. Praha: Ústav lékařské etiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, **1994**. ISBN 80-7066-690-0.
- [20] SMITHWICK, Ronald W. Tuberculosis bacteria. In: Pixnio.com [online]. USA: Pixnio, **2016**, 2016-08-10 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://pixnio.com/science/microscopy-images/mycobacterium-tuberculosis/m-tuberculosis-bacteria-glow-yellow-under-ultraviolet-light-microscopy>
- [21] *Mycobacterium tuberculosis* Ziehl-Neelsen stain. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001**- [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg
- [22] Mantouxova zkouška („mantoux“). Slovníky.cz [online]. Česká republika: © Maxdorf, **1998** [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/mantouxova-zkouska-mantoux-2
- [23] *Mycobacterium tuberculosis*. In: www.bacteriainphotos.com [online]. microbiologyinpictures.com, **2016** [cit. 2019-01-07]. Dostupné z:

<http://www.bacteriainphotos.com/photo%20gallery/Mycobacterium%20tuberculosis.jpg>

- [24] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. Farmakologie a toxikologie: 256 vyobrazení, 47 tabulek. 15., zcela přeprac. vyd., 2. české vyd. Praha: Grada, **2004**, 725 s. Avicenum. ISBN 80-247-0836-1.
- [25] Skeletal formula of isoniazid (isonicotinyl hydrazine, INH). In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001-**, 20.9.2007 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid#/media/File:Isoniazid_skeletal.svg
- [26] Skeletal formula of rifampicin (USAN: rifampin). In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001-**, 7.6.2008 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Rifampicin#/media/File:Rifampicin.svg>
- [27] Structural diagram of pyrazinamide. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001-**, 6.12.2006 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrazinamide#/media/File:Pyrazinamide.svg>
- [28] Skeletal formula of ethambutol. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001-**, 9.2.2009 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ethambutol#/media/File:Ethambutol.svg>
- [29] Streptomycin - strukturní vzorec. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, **2001-**, 6.3.2007 [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Streptomycin#/media/File:Streptomycin_structure.png
- [30] NOVÁK, Vlastimil. Tuberkulóza- současný stav: Situace tuberkulózy ve světě a v České republice. Euro.cz: ZAM- Zdravotnictví a Medicína [online]. Česká republika: Mladá Fronta, **2018**, 7.6.2011 [cit. 2018-12-22]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/tuberkuloza-soucasny-stav-460138>
- [31] Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens: New anti-tuberculosis drug development. Nature Reviews Drug Discovery [online]. Macmillian Publishers Limited, **2013**, 30.4.2013, (12.), 388-404 [cit. 2018-12-22]. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd4001>. ISSN 1474-1784. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrd4001#article-info>
- [32] KARABANOVICH, Galina, Jaroslav ROH, Tomáš SMUTNÝ, et al. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. European Journal of Medicinal Chemistry [online]. Czech Republic: Elsevier Masson SAS., **2019**, 23.7. 2014, (82), 324- 340 [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414005017>
- [33] ROH, Dr. Jaroslav. Development of new antituberculosis drugs: Main results since 2014. Www.faf.cuni.cz [online]. Akademia Heyrovského 1203, 500 05 Hradec

Králové, Česká republika: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2018** [cit. 2019-01-04]. Dostupné z: <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/Antibacterial-Antifungal-Antituberculosis-Drugs/Research/Antituberculosis-drugs/>

- [34] KARABANOVICH, Galina, Jaroslav ROH, Ondřej SOUKUP, et al. Tetrazole regioisomers in the development of nitro group-containing antitubercular agents. *MedChemComm* [online]. **2015**, 25.9.2014, 6(1), 174-181 [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.1039/C4MD00301B. ISSN 2040-2503. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4MD00301B>
- [35] KARABANOVICH, Galina, Júlia ZEMANOVÁ, Tomáš SMUTNÝ, et al. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **2016**, 59(6), 2362-2380 [cit. 2019-01-04]. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00608. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b00608>
- [36] KARABANOVICH, Galina, Jan NĚMEČEK, Lenka VALÁŠKOVÁ, et al. S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. Czech Republic: Elsevier Masson SAS, **2019**, 27.1.2017, (126), 369-383 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416309783>
- [37] ROH, Jaroslav, Galina KARABANOVICH, Hana VLČKOVÁ, et al. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. Czech Republic: Elsevier Masson SAS, **2019**, 23.7.2014, (82), 324-340 [cit. 2019-01-11]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414005017>
- [38] HRABÁLEK, CSC., Doc. PharmDr. Alexandr. *Chemická laboratorní technika pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, **2000**. ISBN 80-7184-698-8.
- [39] *Separční metody v analytické chemii - chromatografie*. Zshk.cz [online]. VOŠZ A SZŠ Hradec Králové: MultiMedia SoftWare, **2018** [cit. 2018-12-30]. Dostupné z: <https://anl.zshk.cz/vyuka/separacni-metody.aspx>

12 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Připojení mykolových kyselin k arabinogalaktanu.	16
Obrázek 2: Připojení arabinogalaktanu k peptidoglykanu.	17
Obrázek 3: Schématické znázornění mykobakteriální buněčné stěny	18
Obrázek 4: Schématické znázornění patogeneze primární TB.	21
Obrázek 5: Schématické znázornění patogeneze postprimární TB.	22
Obrázek 6: Mikroskopický průkaz mykobakterií fluorescenčním barvením.	24
Obrázek 7: Mikroskopický průkaz mykobakterií Ziehl-Neelsenovým barvením.	25
Obrázek 8: Průkaz mykobakterií při kultivaci na Löwenstein-Jensenově půdě.....	26
Obrázek 9: Antituberkulotika první volby a) Isoniazid, b) Rifampicin, c) Pyrazinamid, d) Ethambutol, e) Streptomycin	31
Obrázek 10: Grafický abstrakt studie zabývající se 1-substituovanými 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazoly a jejich isosterními analogy.....	32
Obrázek 11: Grafický abstrakt studie zabývající se tetrazolovými regioizomery.	32
Obrázek 12: Grafický abstrakt studie zabývající se 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1, 3,4-oxadiazoly a thiadiazoly.	33
Obrázek 13: Grafický abstrakt studie zabývající se reverzními analogy.	33
Obrázek 14: Grafický abstrakt studie zabývající se ve vodě rozpustnými 3,5-dinitrofenyltetrazolovými a oxadiazolovými látkami.	34
Obrázek 15: Filtrace a) přes chomáček vaty, b) za sníženého tlaku.	37
Obrázek 16: Extrakce.....	38
Obrázek 17: Kolonová chromatografie.....	38
Obrázek 18: TLC s produktem	39
Obrázek 19: 3-(3,5-Dinitrofenyl)propanamid (NM5a).....	42
Obrázek 20: 3-(3,5-Dinitrofenyl)propanitril (NM6a).....	43
Obrázek 21: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM1a)	44
Obrázek 22: 2-Benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM2a).....	45
Obrázek 23: 1-Benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM2b).....	46
Obrázek 24: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM3a)	47
Obrázek 25: 5-(3,5-Dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM3b)	48
Obrázek 26: 2-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM4a).....	49
Obrázek 27: 1-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM4b).....	50
Obrázek 28: 3-(3,5-Dinitrofenyl)akrylamid (NM10a)	51
Obrázek 29: 3-(3,5-Dinitrofenyl)akrylonitril (NM11a).....	52

Obrázek 30: 5-(3,5-Dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM12a)	53
Obrázek 31: 5-(3,5-Dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM14a)	55
Obrázek 32: 2-Benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM15a).....	56
Obrázek 33: 1-Benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazol (NM15b).....	57
Obrázek 34: 2-(4-Chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2 <i>H</i> -tetrazol (NM16a).....	58
Schéma 1: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamidu (NM5a).....	39
Schéma 2: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitrilu (NM6a).....	42
Schéma 3: Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM1a)	43
Schéma 4: Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM2a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM2b).....	44
Schéma 5: Syntéza 5-(3,5-dinitrofenethyl)-2-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM3a) a 5-(3,5-dinitrofenethyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM3b).....	46
Schéma 6: Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM4a) a 1-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM4b).....	48
Schéma 7: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamidu (NM10a)	50
Schéma 8: Syntéza 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitrilu (NM11a).....	51
Schéma 9: Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM12a)	52
Schéma 10: Syntéza 5-(3,5-dinitrostyryl)-2-(4-methoxybenzyl)- 2 <i>H</i> -tetrazolu (NM14a)	54
Schéma 11: Syntéza 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM15a) a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1 <i>H</i> -tetrazolu (NM15b).....	55
Schéma 12: Syntéza 2-(4-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2 <i>H</i> -tetrazolu (NM16a)	57
Tabulka 1: Léčebné kategorie pro antituberkulotickou léčbu.	28
Tabulka 2: <i>In vitro</i> antimykobakteriální aktivity fenethyl a styryl derivátů vyjádřená jako MIC (μmol/L).....	64
Tabulka 3: Elementární (CHNS) analýza připravených látek.....	76
Graf 1: Počet smrtí způsobených TB (na 100 tisíc obyvatel) podle SZO: a) V České republice. b) Na Ukrajině.....	12

13 PŘÍLOHA 1: ELEMENTÁRNÍ (CHNS) ANALÝZY PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

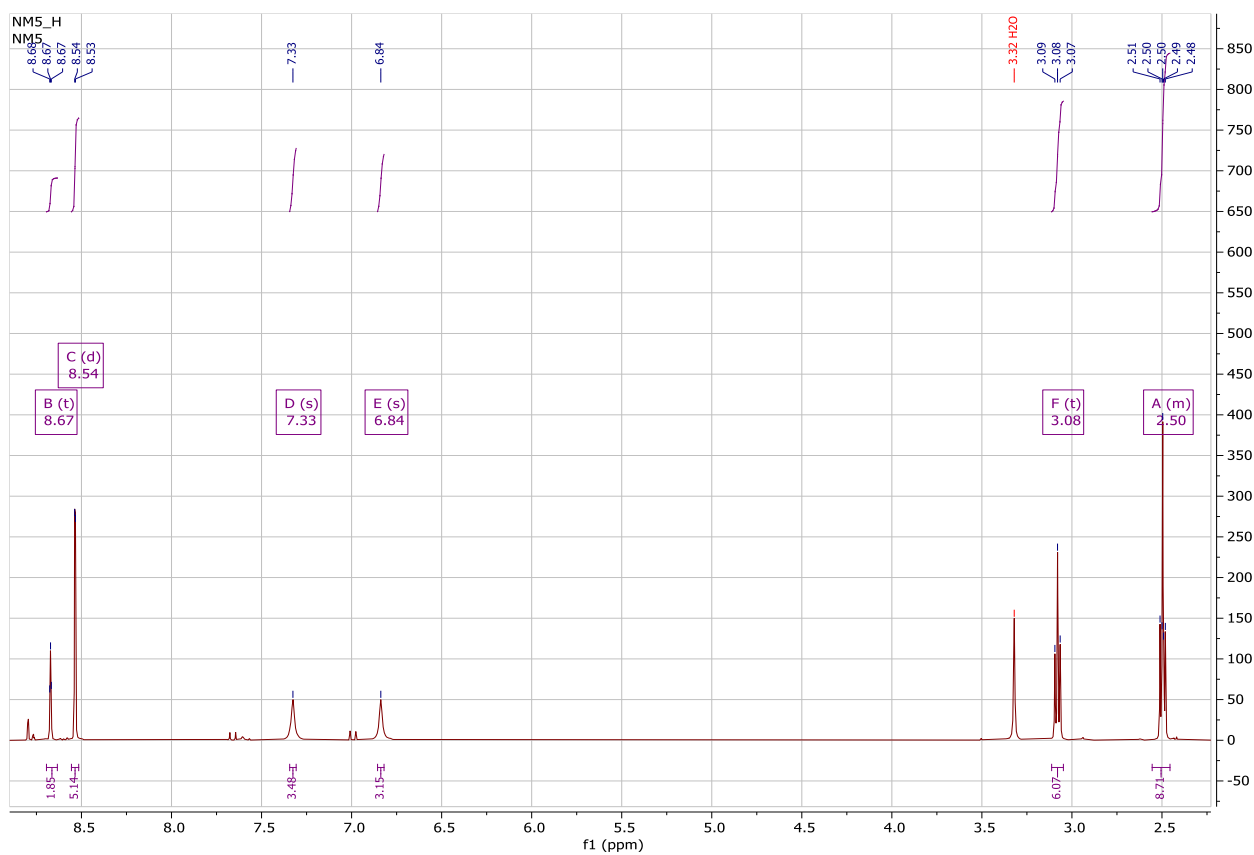
Kod	Sumární vzorec		C	H	N
Fenylethyl-deriváty					
NM5a* amid	C ₉ H ₉ N ₃ O ₅	Vypočítáno	45,19	3,79	17,57
		Zjištěno	45,26	3,64	17,55
NM6a nitril	C ₉ H ₇ N ₃ O ₄	Vypočítáno	48,88	3,19	19,0
		Zjištěno	48,87	2,96	19,03
NM1a* 1H-tetrazol	C ₉ H ₈ N ₆ O ₄	Vypočítáno	40,92	3,05	31,81
		Zjištěno	40,84	2,79	31,86
NM2a R=Bn	C ₁₆ H ₁₄ N ₆ O ₄	Vypočítáno	54,24	3,98	23,72
		Zjištěno	54,64	4,05	23,38
NM2b R=Bn	C ₁₆ H ₁₄ N ₆ O ₄	Vypočítáno	54,24	3,98	23,72
		Zjištěno	54,63	4,13	23,32
NM3a R=4-CH ₃ OBn	C ₁₇ H ₁₆ N ₆ O ₅	Vypočítáno	53,12	4,20	21,87
		Zjištěno	53,52	4,37	21,48
NM3b R=4-CH ₃ OBn	C ₁₇ H ₁₆ N ₆ O ₅	Vypočítáno	53,12	4,20	21,87
		Zjištěno	53,04	4,15	21,78
NM4a R=4-ClBn	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₆ O ₄	Vypočítáno	49,43	3,37	21,62
		Zjištěno	49,59	3,25	21,55
NM4b R=4-ClBn	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₆ O ₄	Vypočítáno	49,43	3,37	21,62
		Zjištěno	49,40	3,24	21,23

Styryl-deriváty					
NM10 amid	C ₉ H ₇ N ₃ O ₅	Vypočítáno	45,58	2,98	17,72
		Zjištěno	45,40	3,04	17,15
NM11* nitril	C ₉ H ₅ N ₃ O ₄	Vypočítáno	49,33	2,30	19,17
		Zjištěno	49,72	2,52	19,01
NM12* tetrazol	C ₉ H ₆ N ₆ O ₄	Vypočítáno	41,23	2,31	32,05
		Zjištěno	41,60	2,69	32,35
NM15a R=Bn	C ₁₆ H ₁₂ N ₆ O ₄	Vypočítáno	54,55	3,43	23,85
		Zjištěno	54,52	3,19	23,87
NM15b R=Bn	C ₁₆ H ₁₂ N ₆ O ₄	Vypočítáno	54,55	3,43	23,85
		Zjištěno	54,67	3,20	23,96
NM14a R=4-CH ₃ OBn	C ₁₇ H ₁₄ H ₆ O ₅	Vypočítáno	53,41	3,61	21,98
		Zjištěno	53,80	3,95	22,14
NM16a R=4-ClBn	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₆ O ₄	Vypočítáno	49,69	2,87	21,73
		Zjištěno	49,87	2,61	21,46

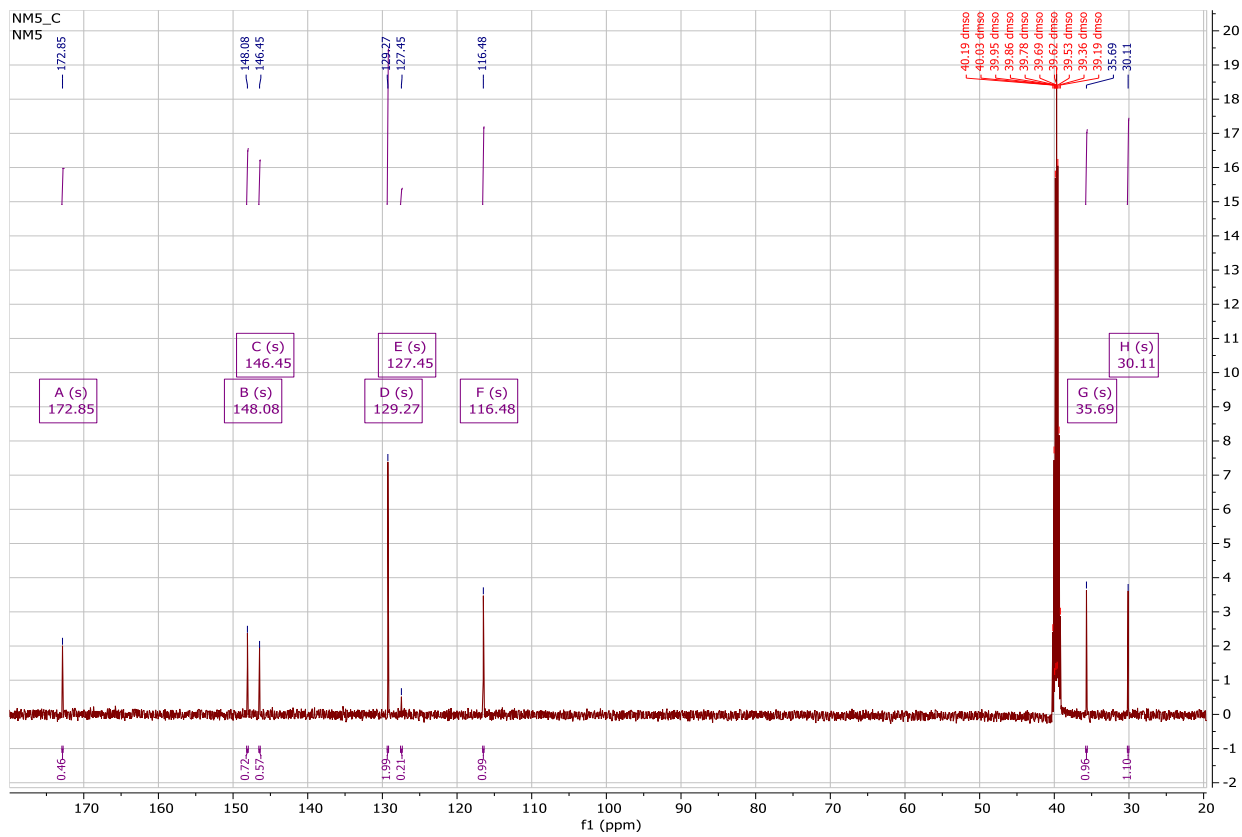
* - značí, že před provedením elementární analýzy bylo malé množství látky dočištěno sloupcovou chromatografií; Bn – benzyl

Tabulka 3: Elementární (CHNS) analýza připravených látek

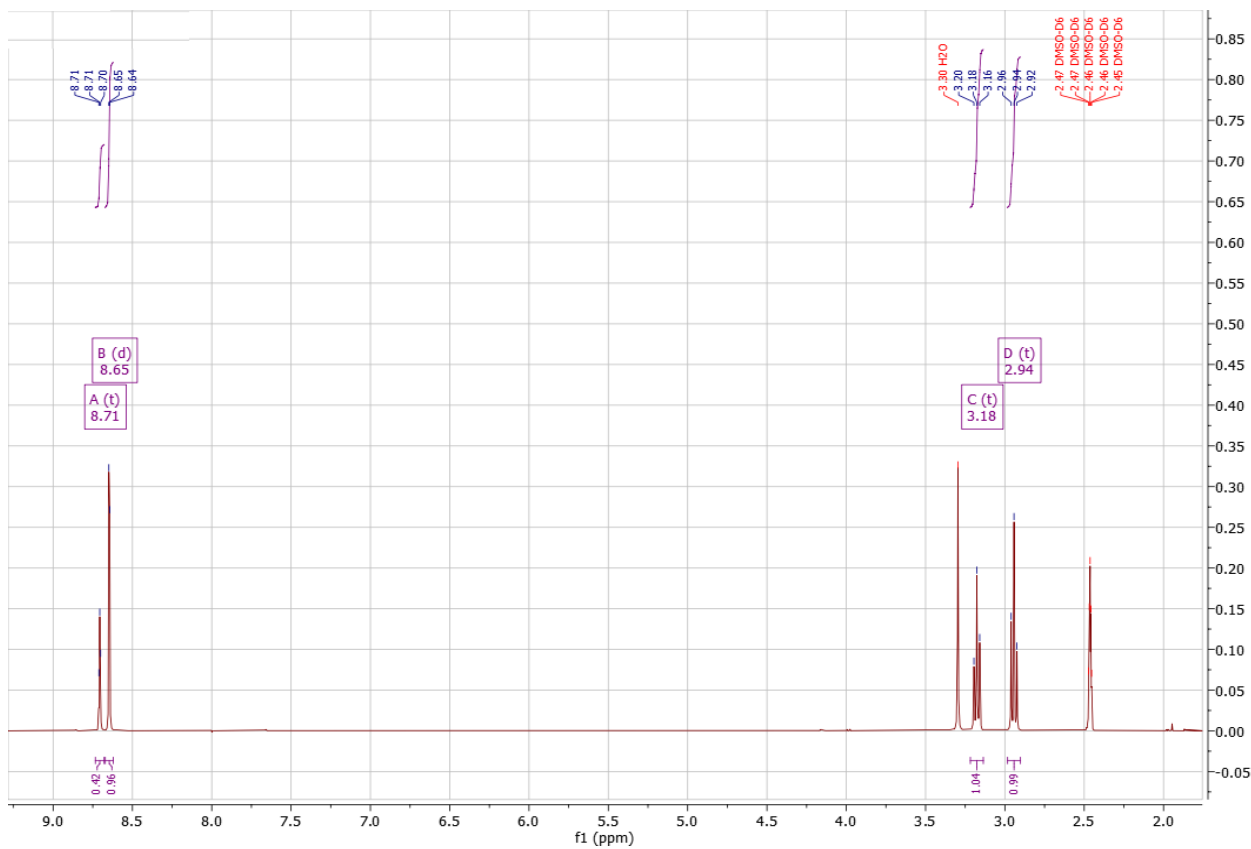
14 PŘÍLOHA 2: NMR SPEKTRA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK



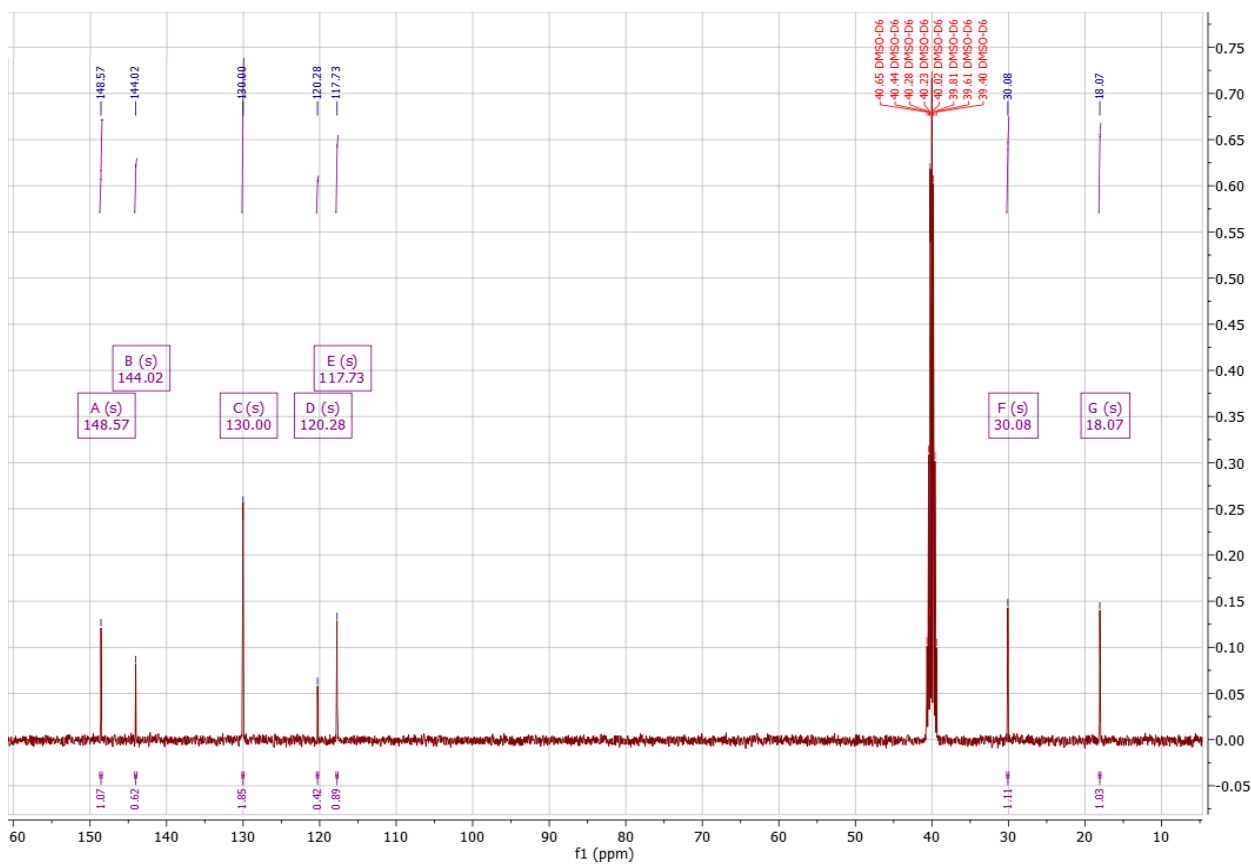
^1H NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamid: NM5a



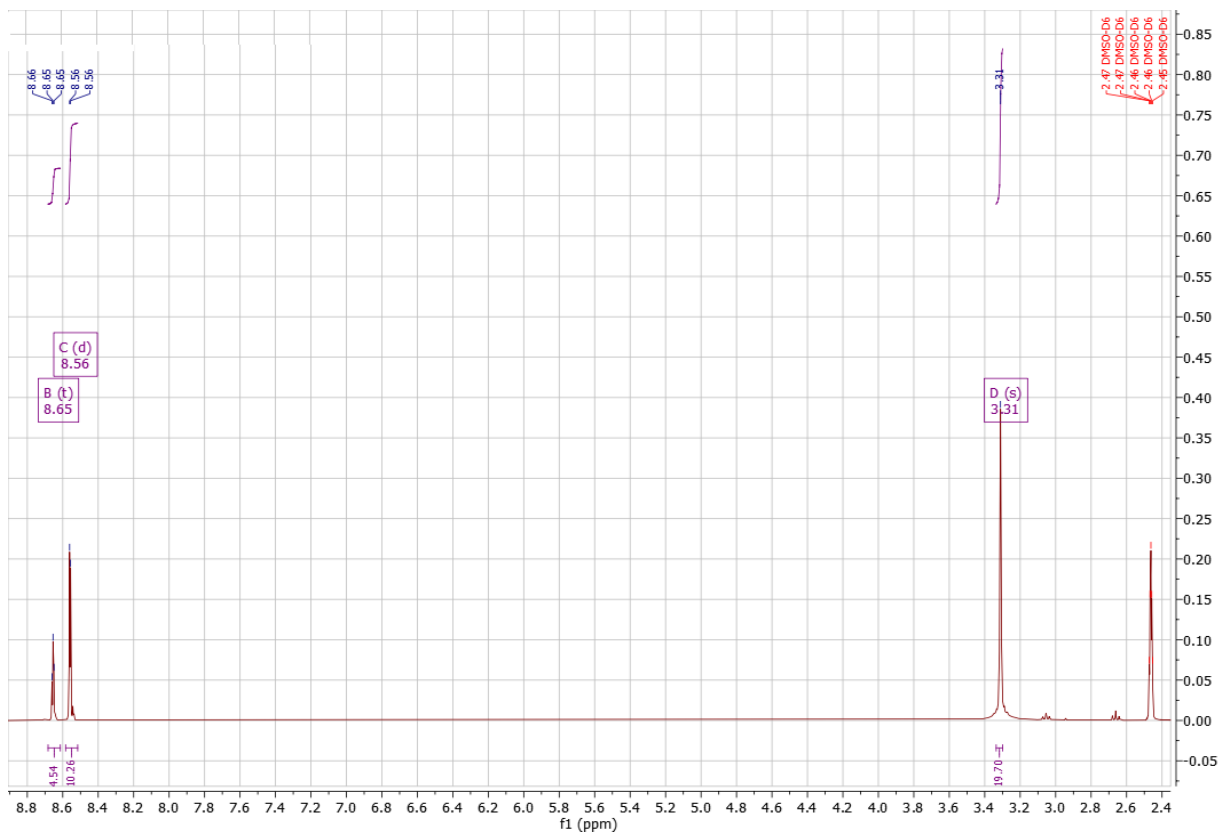
^{13}C NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)propanamid: NM5a



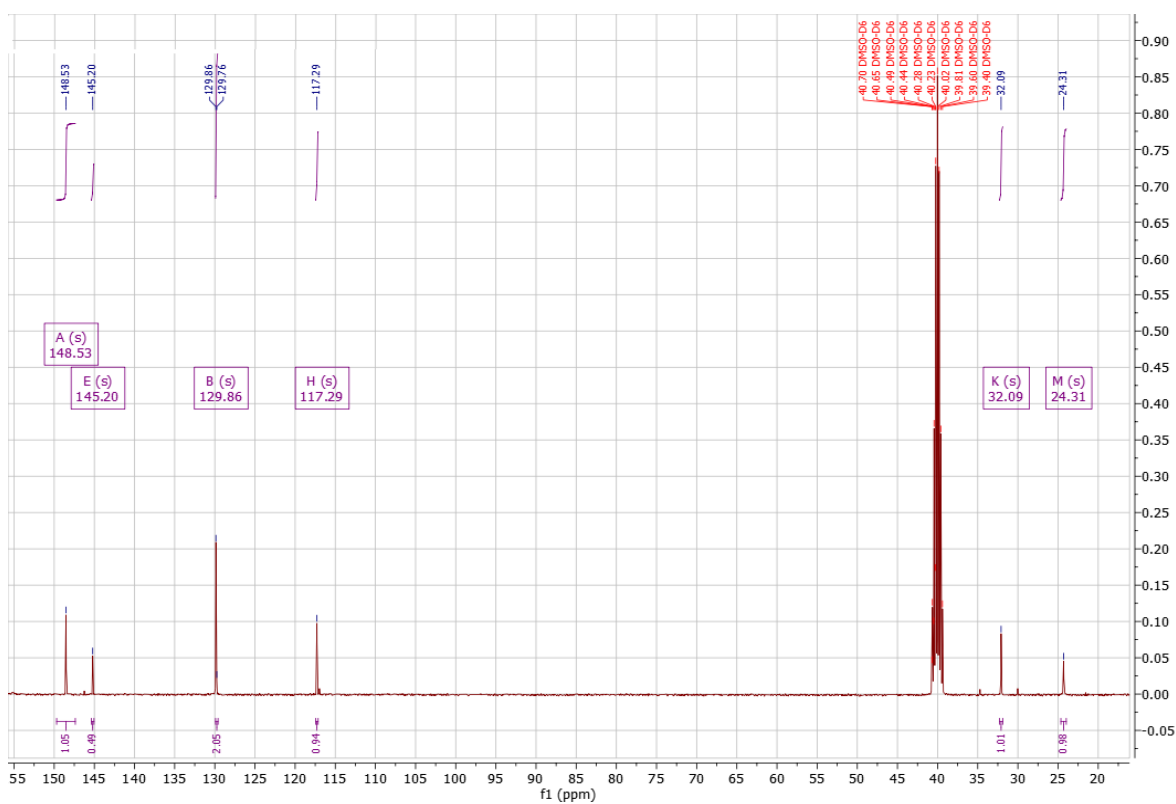
¹H NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitril: NM6a



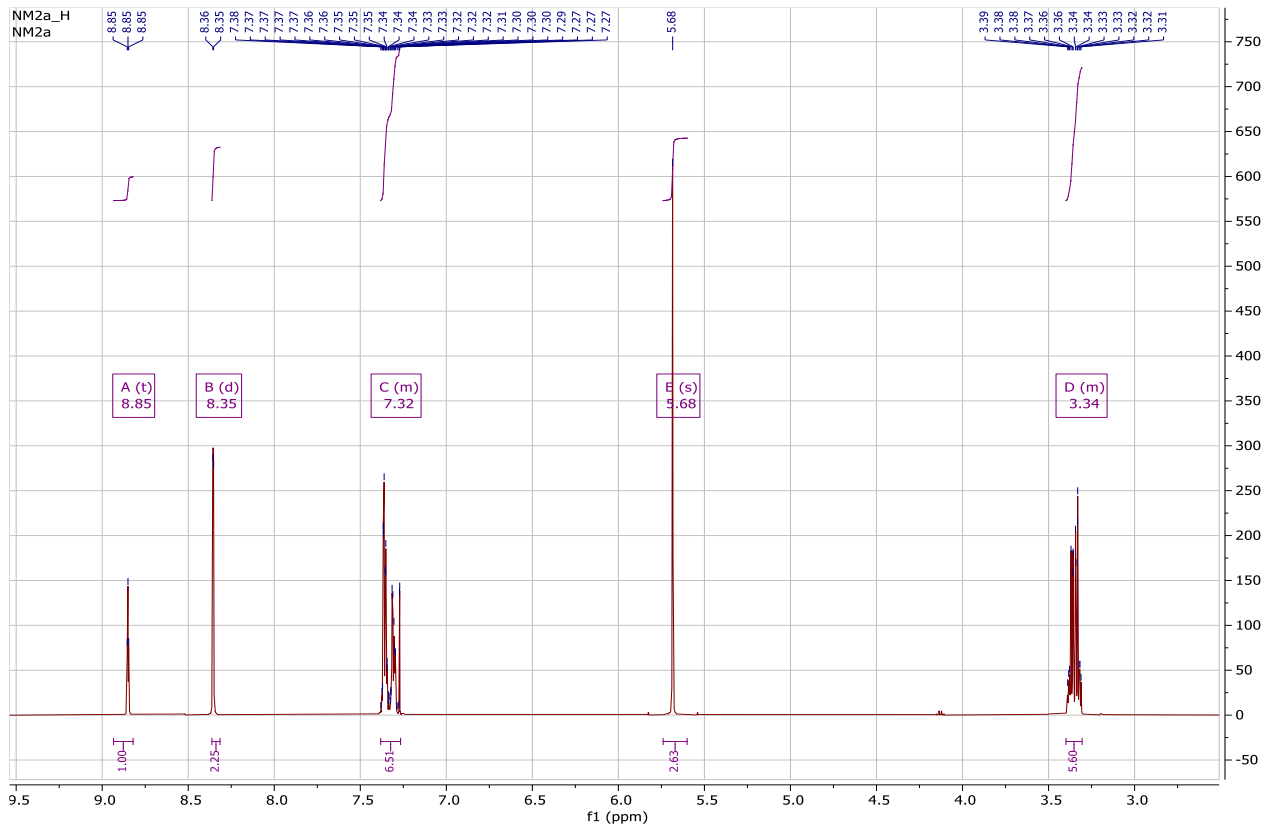
¹³C NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)propannitril: NM6a



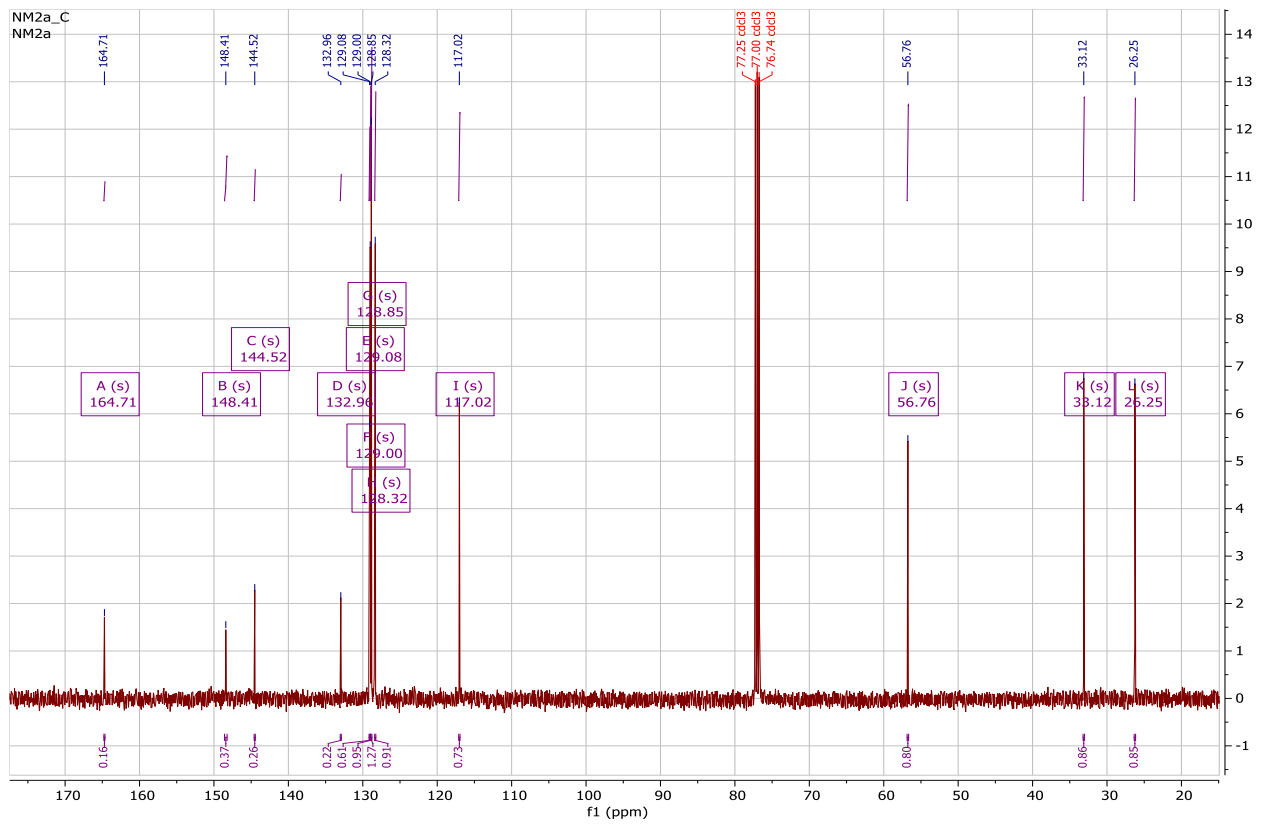
¹H NMR 5-(3,5-dinitrophenyl)-1H-tetrazol: NM1a



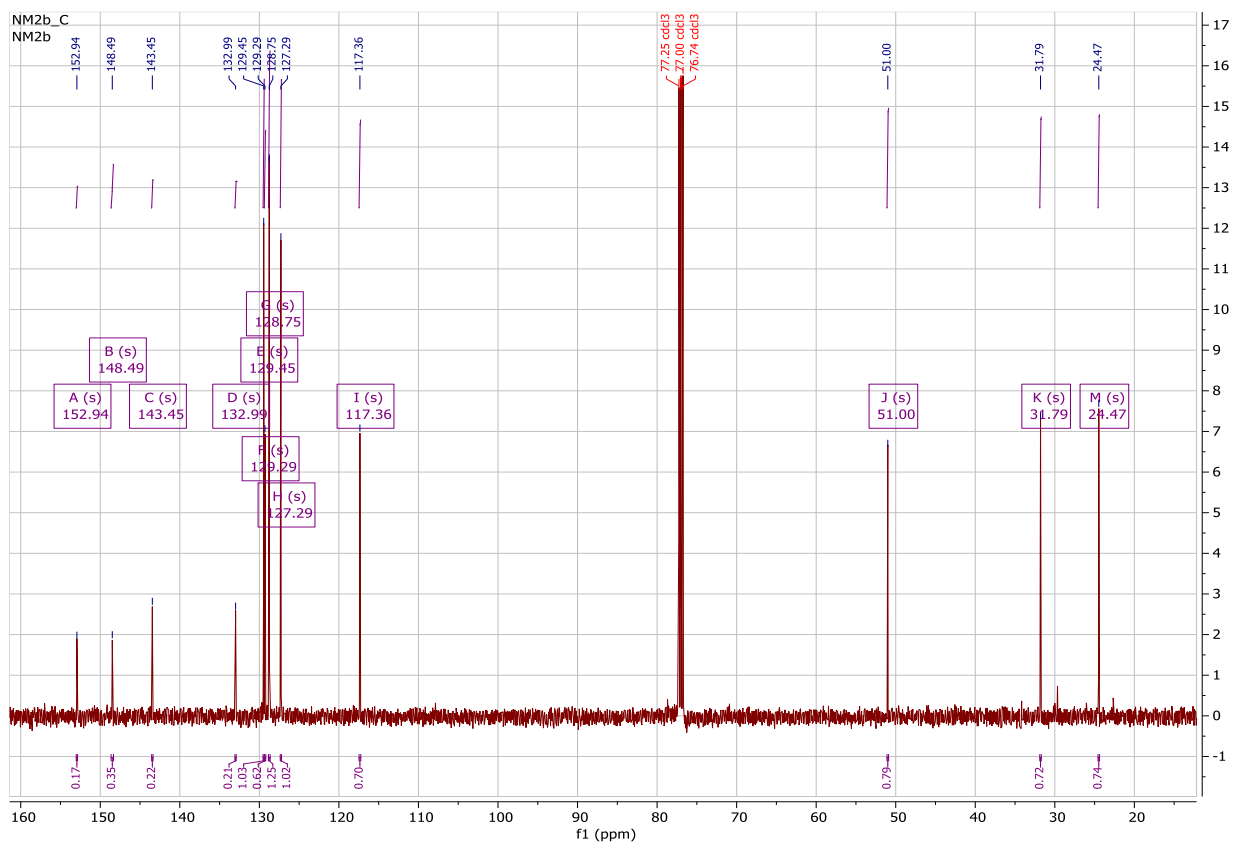
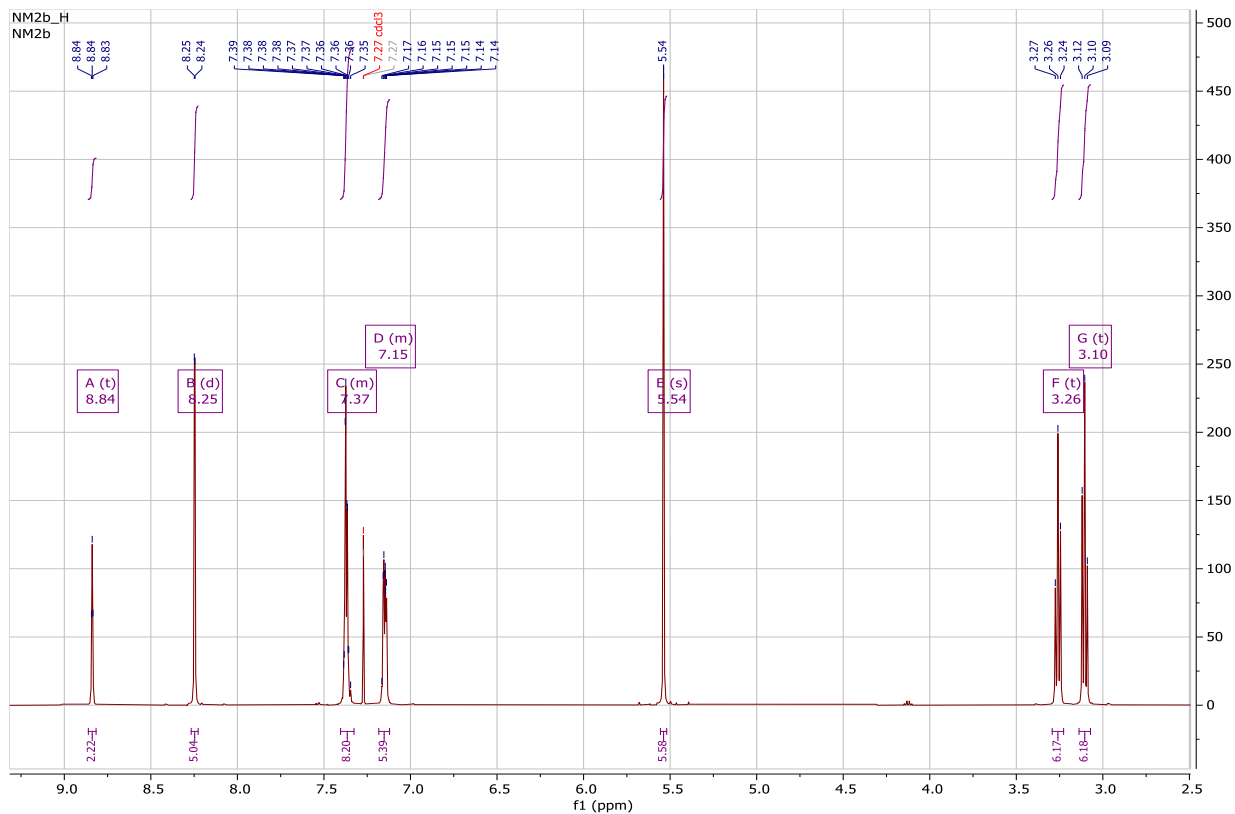
¹³C NMR 5-(3,5-dinitrophenyl)-1H-tetrazol: NM1a

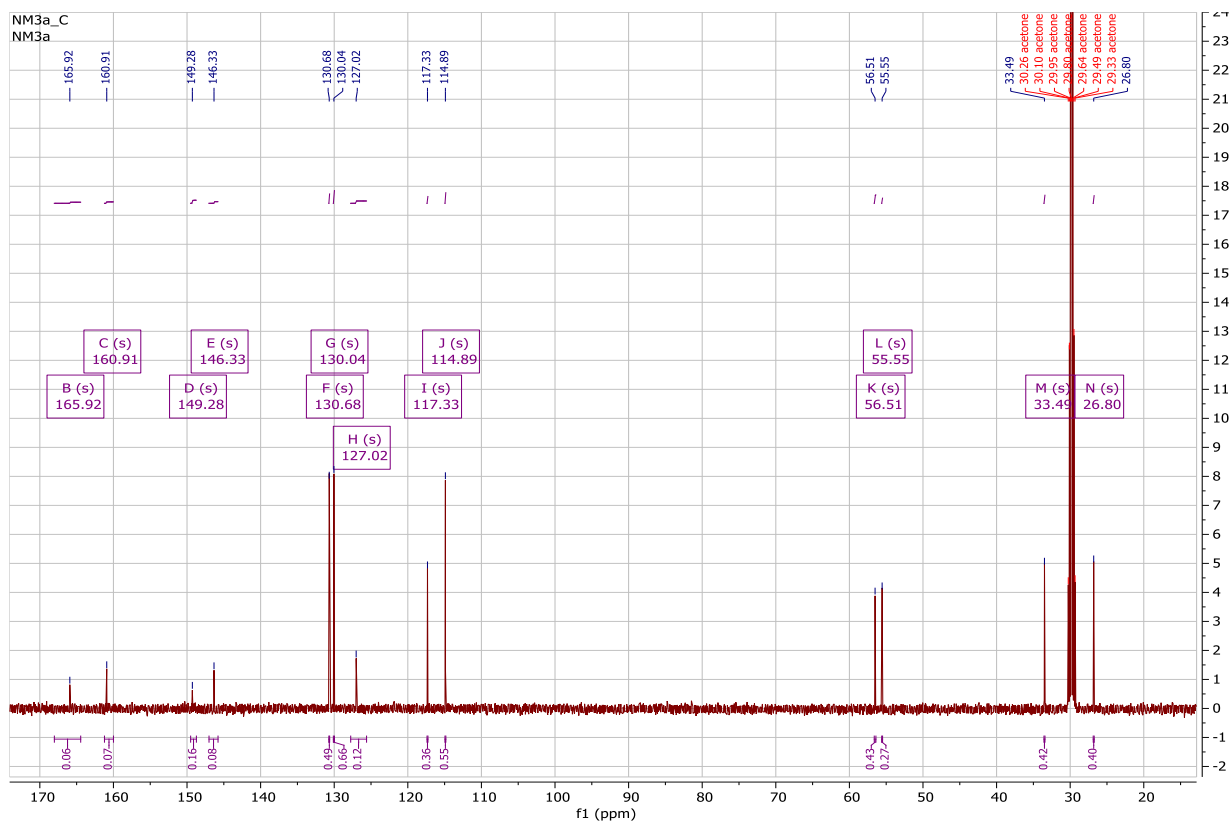
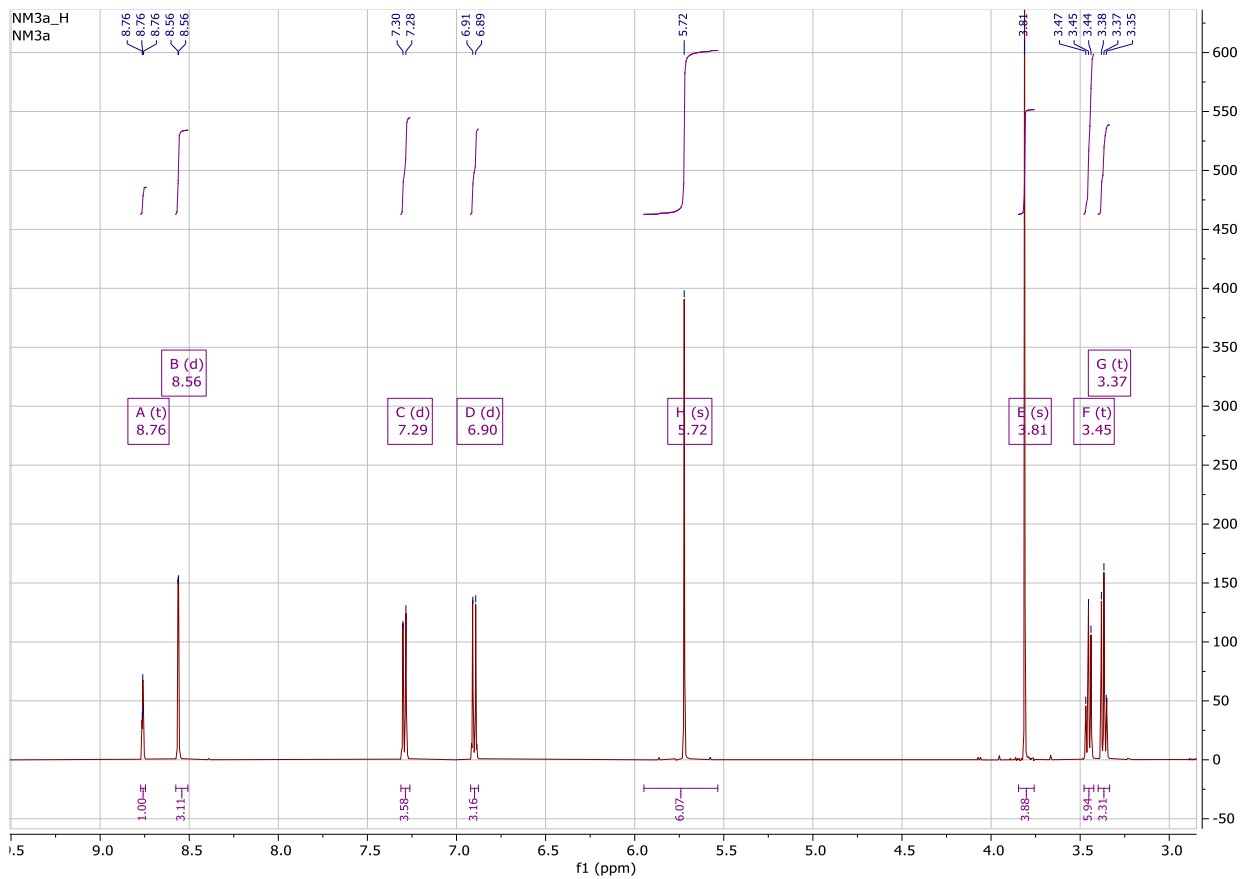


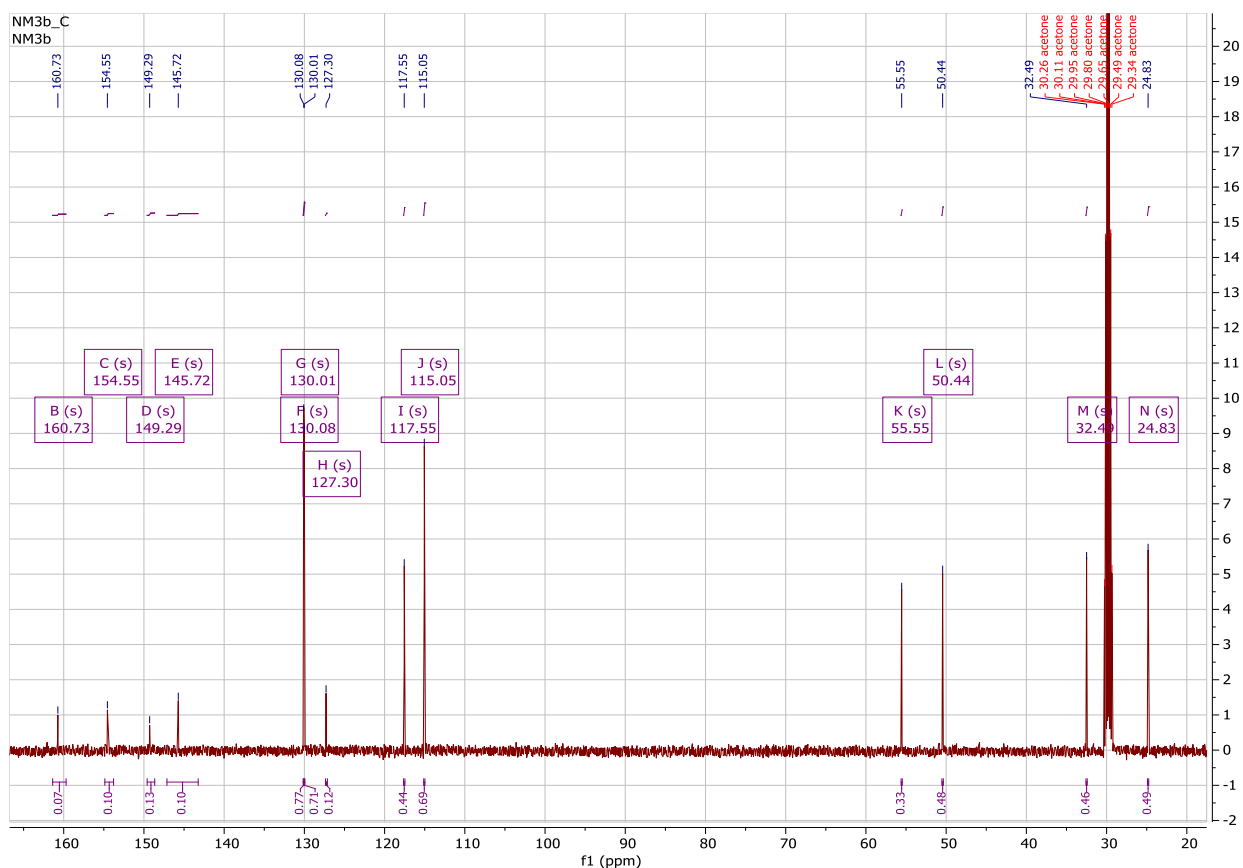
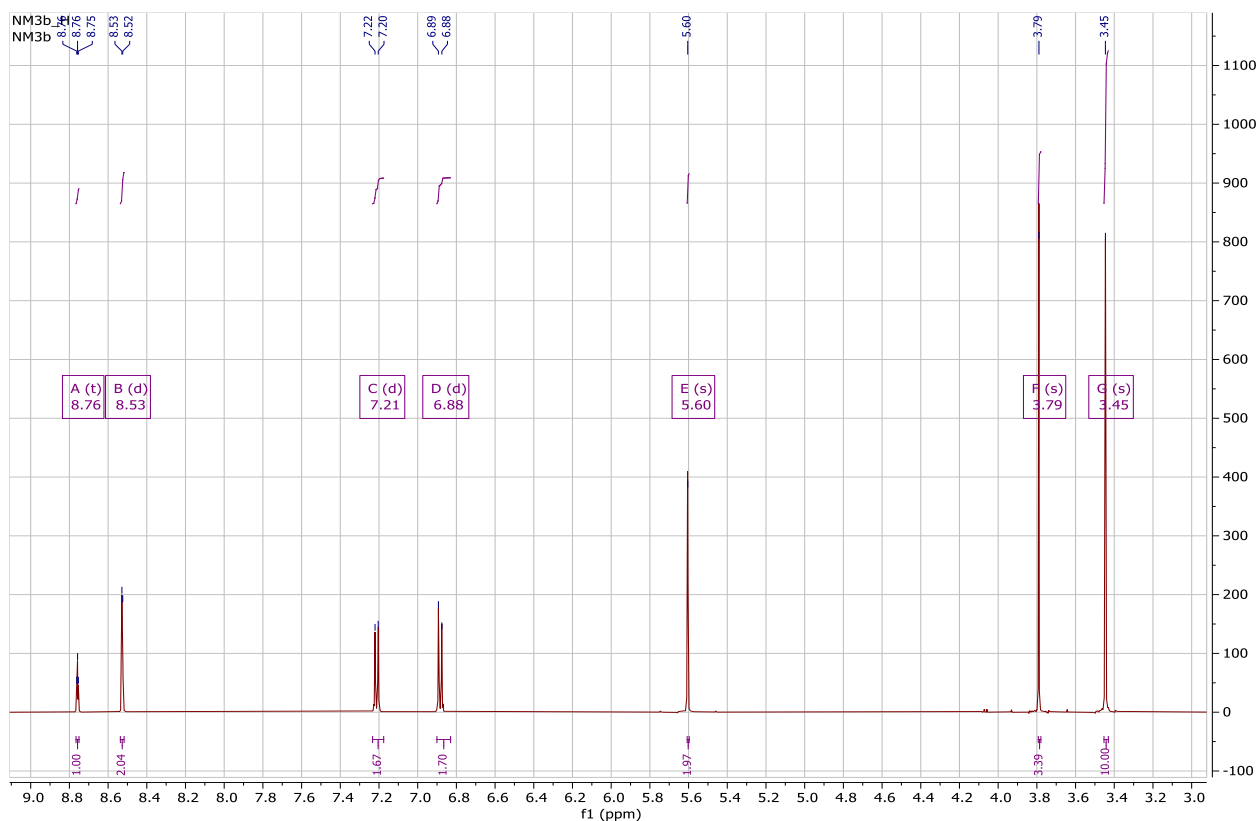
¹H NMR 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol: NM2a

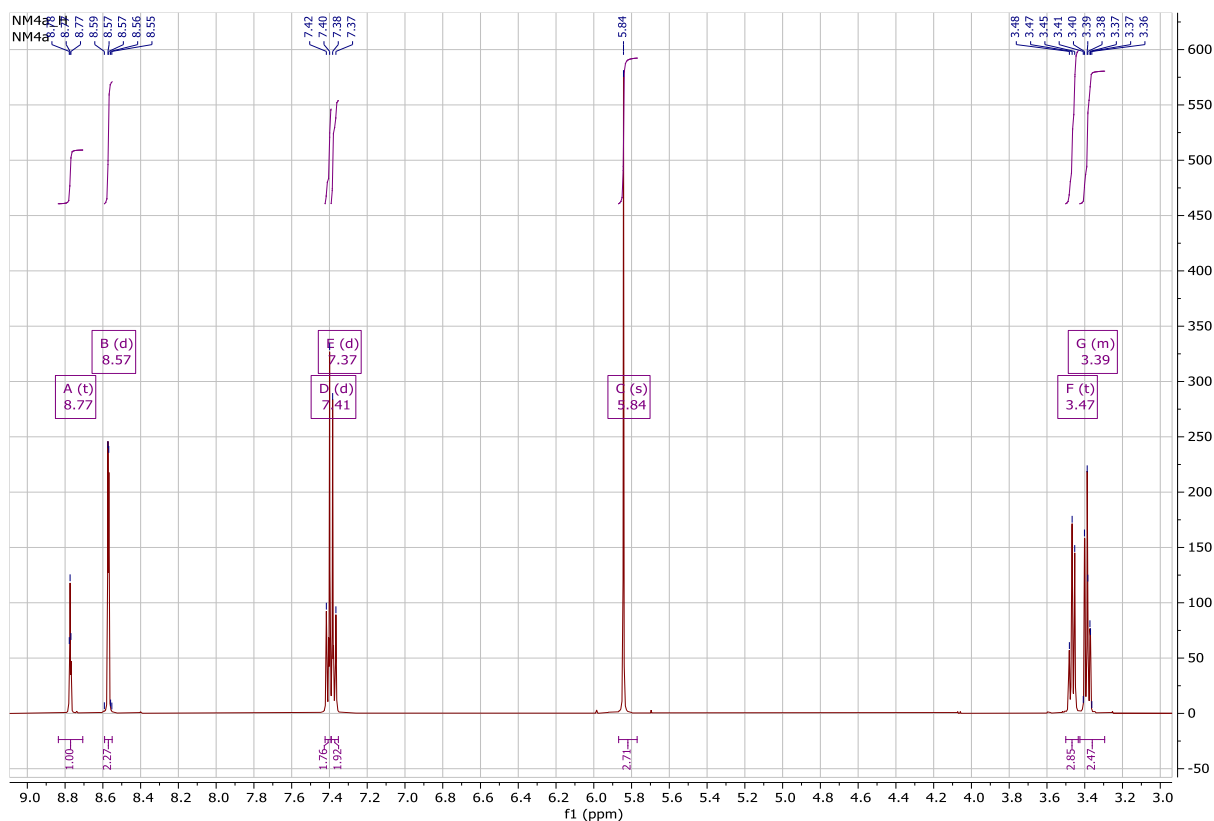


¹³C NMR 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol: NM2a

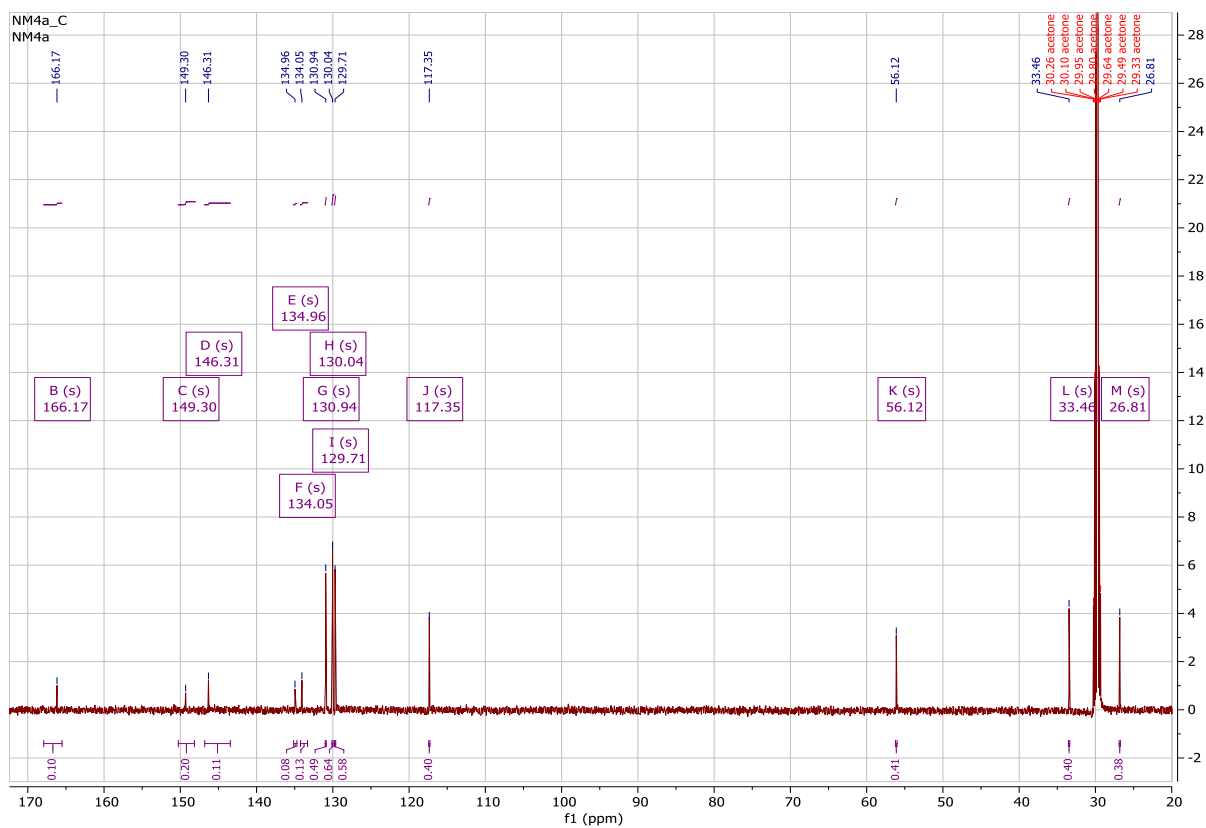




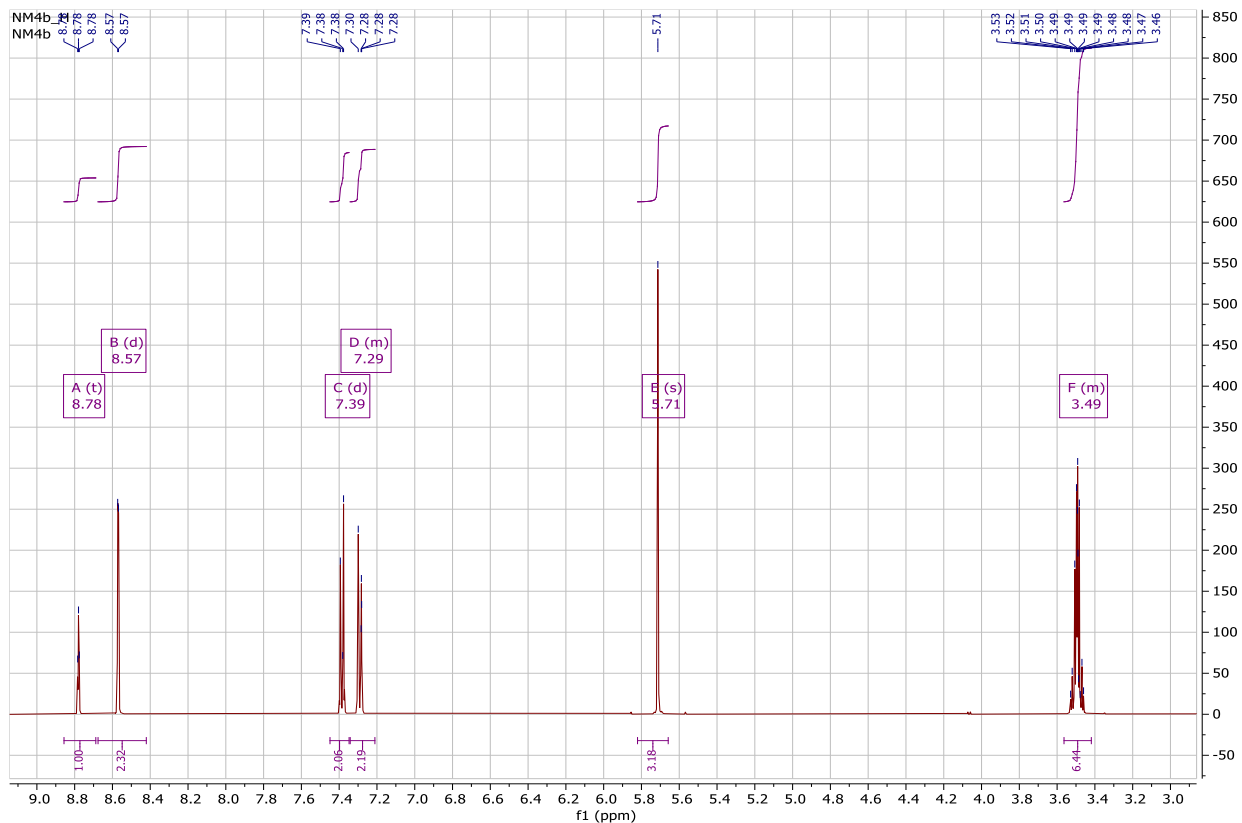




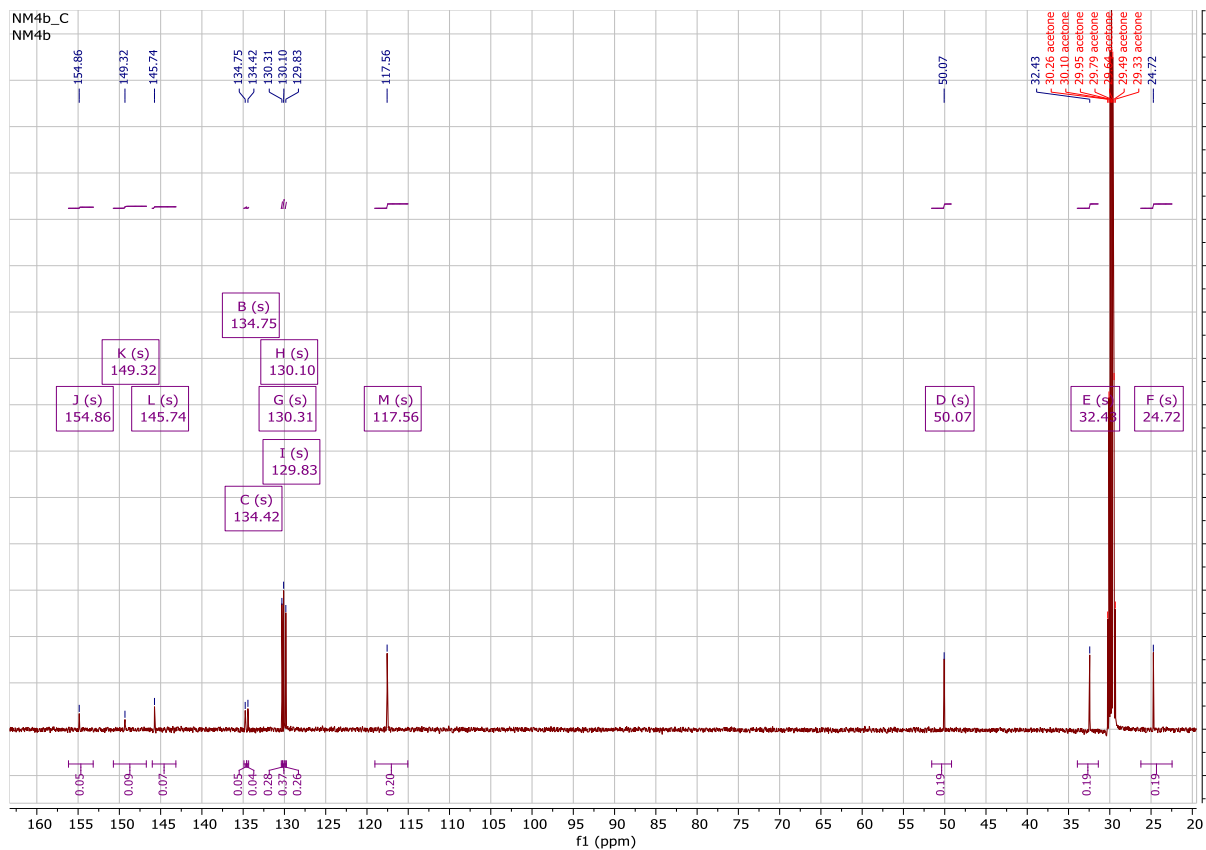
¹H NMR 2-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol: NM4a



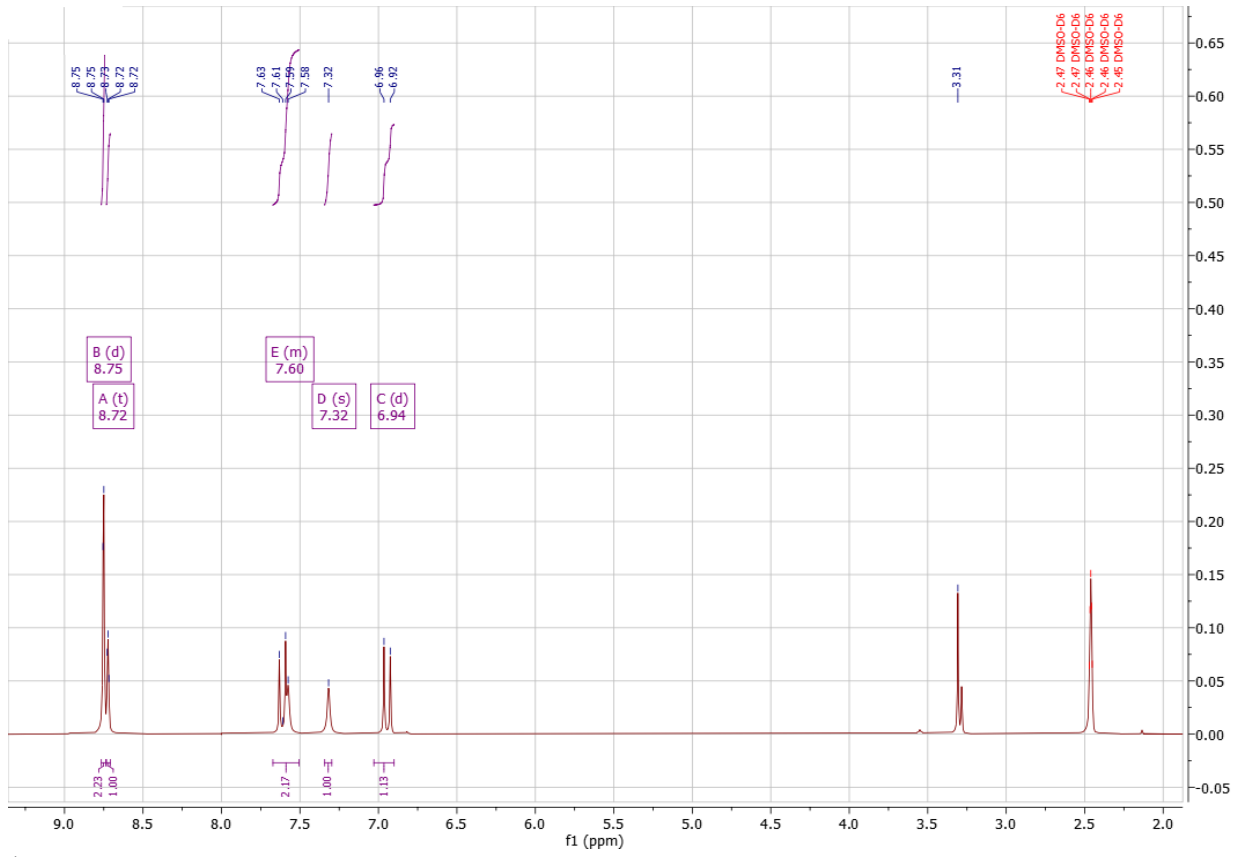
¹³C NMR 2-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrofenethyl)-2H-tetrazol: NM4a



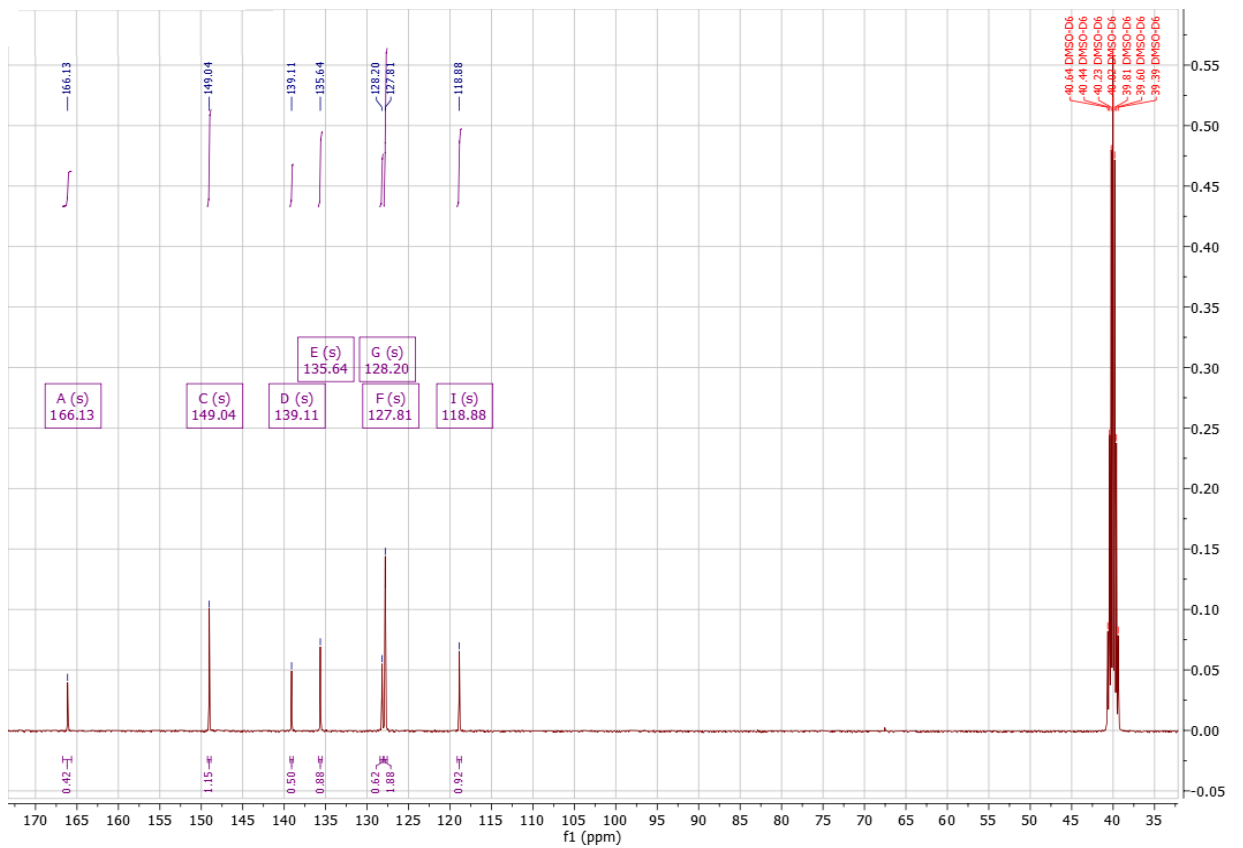
¹H NMR 1-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrophenethyl)-1H-tetrazol: NM4b



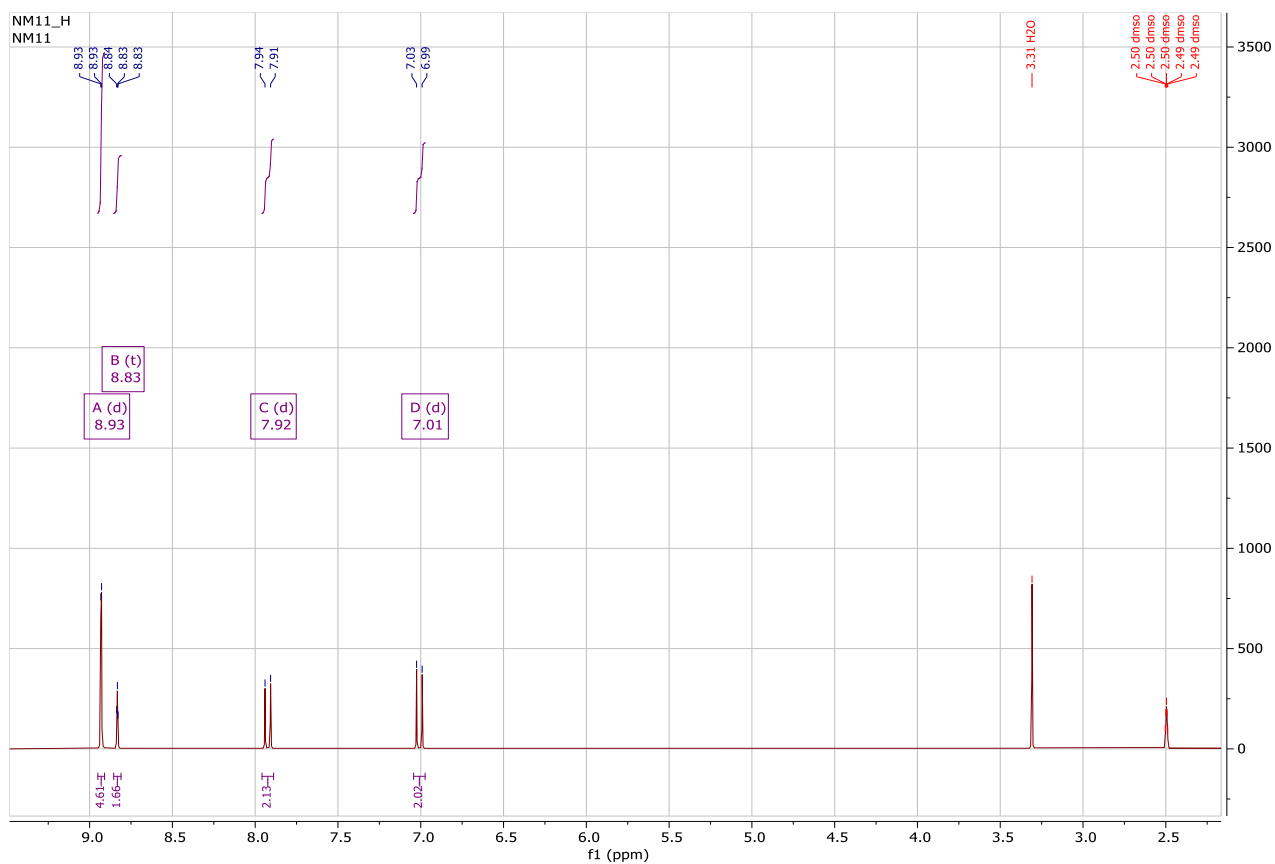
¹³C NMR 1-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrophenethyl)-1H-tetrazol: NM4b



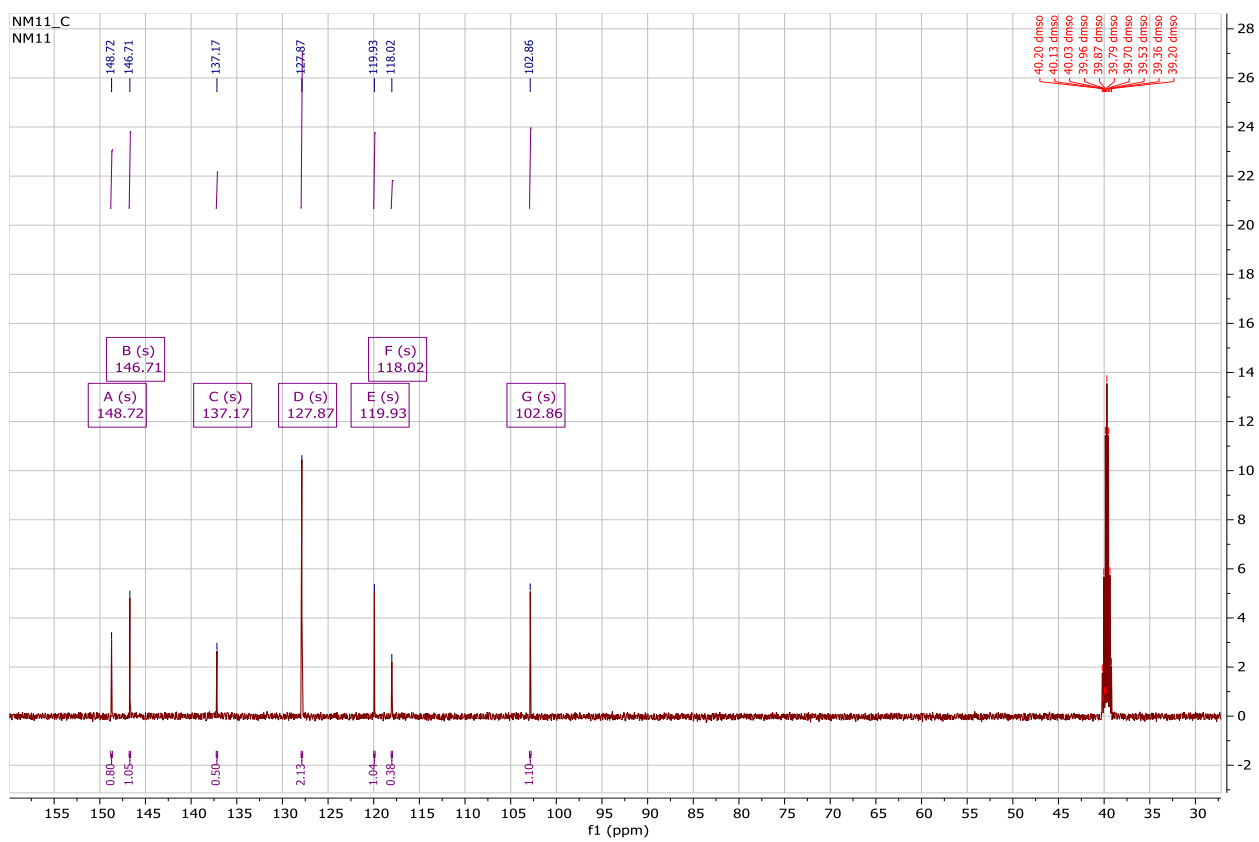
¹H NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamid: NM10



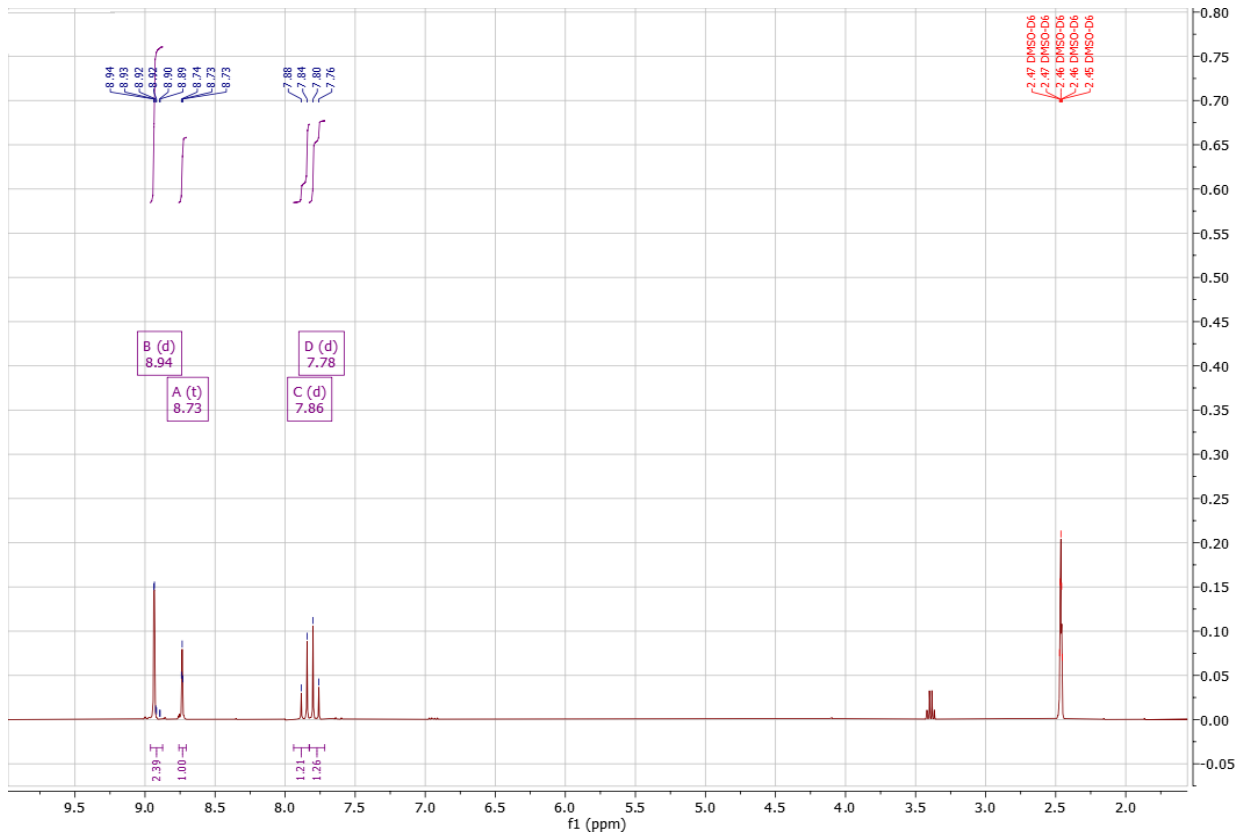
¹³C NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylamid: NM10



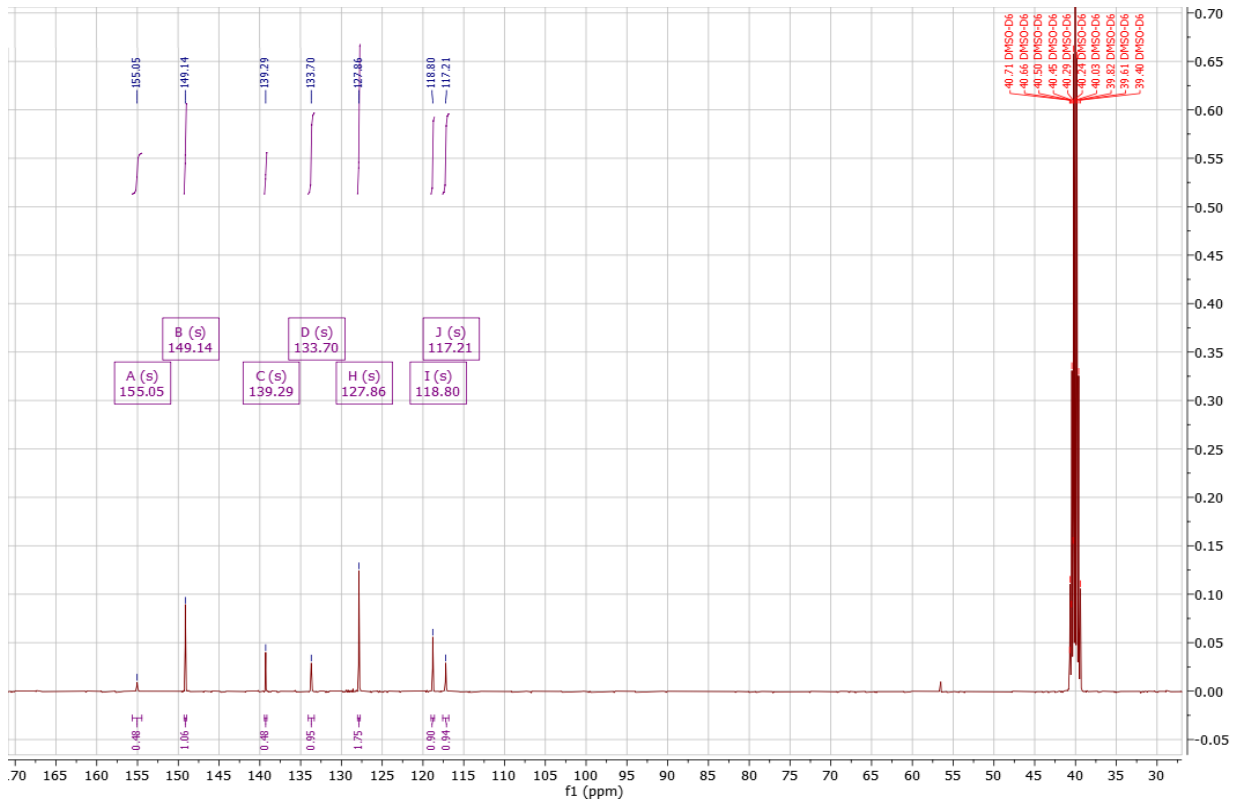
¹H NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitril: NM11



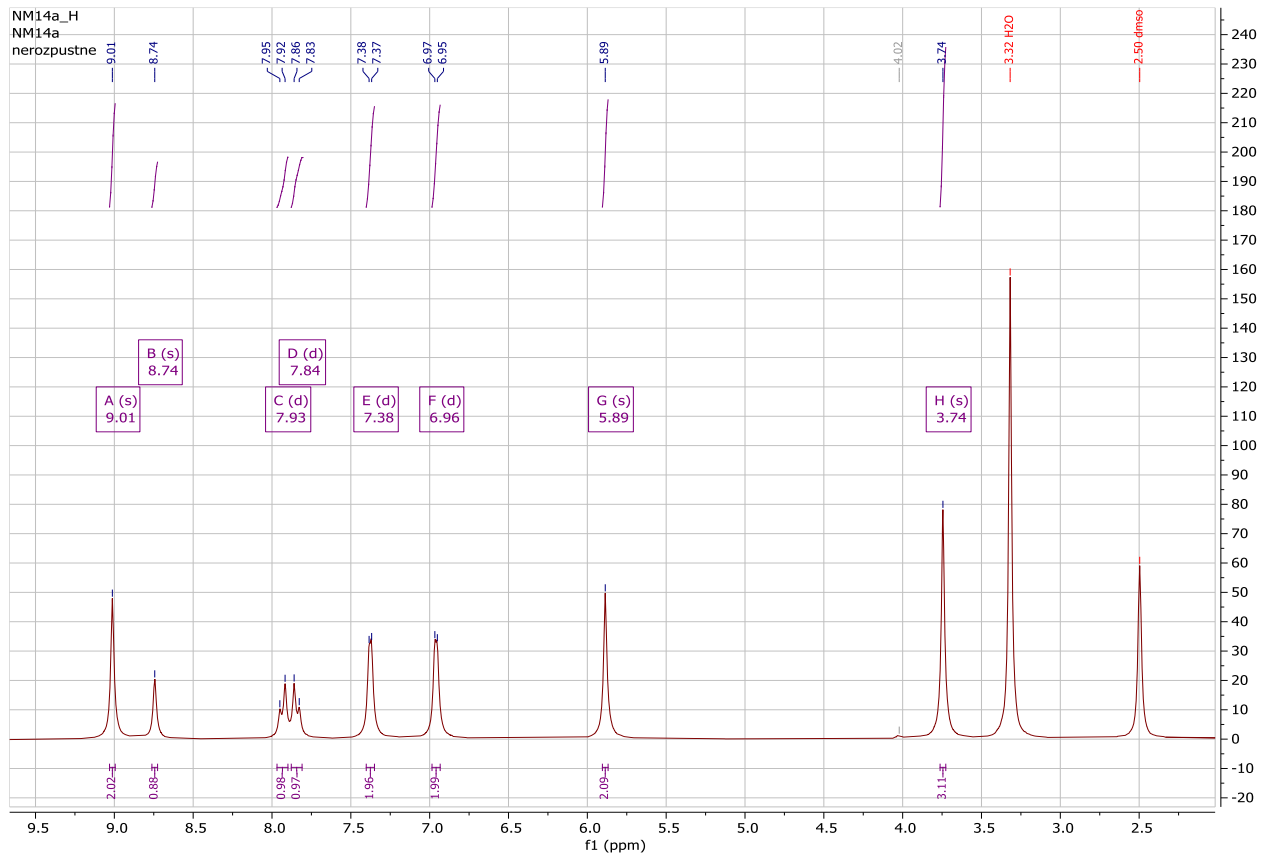
¹³C NMR 3-(3,5-dinitrofenyl)akrylonitril: NM11



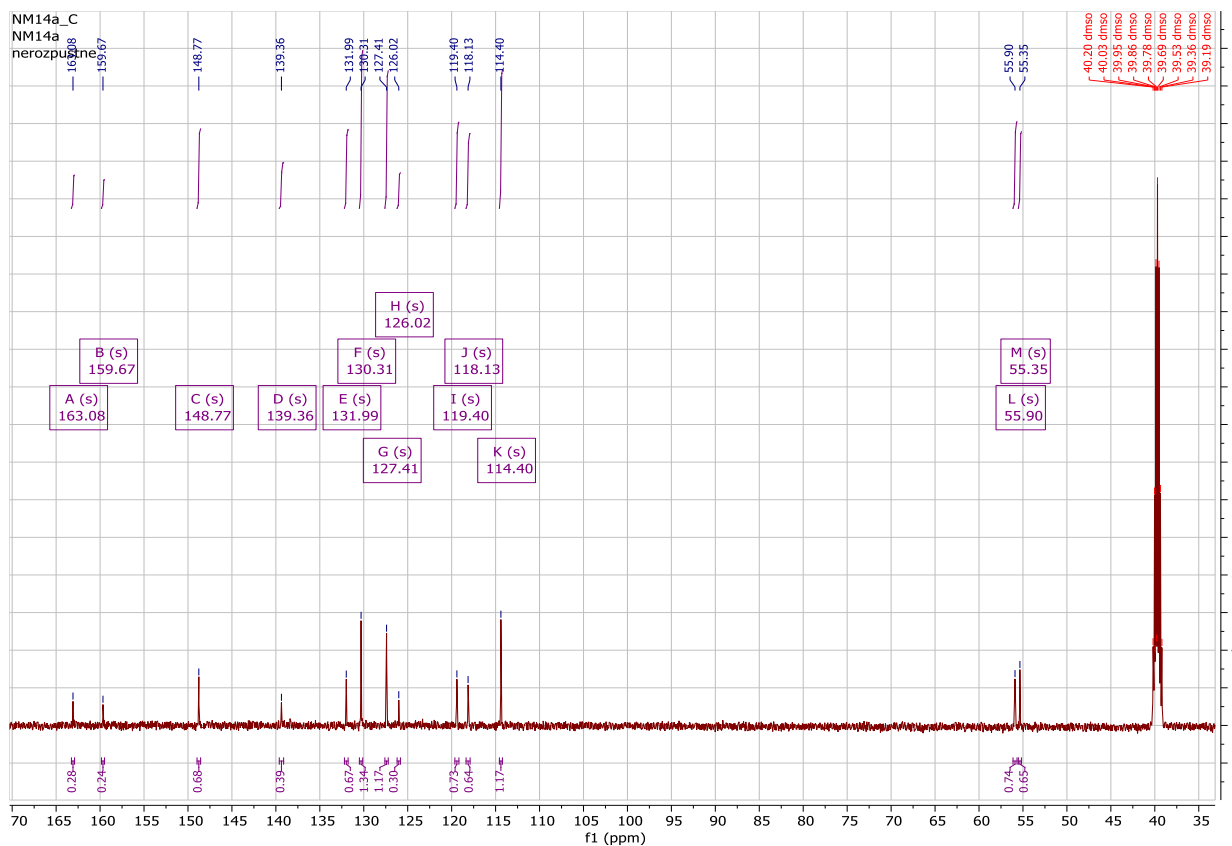
¹H NMR 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazol: NM12



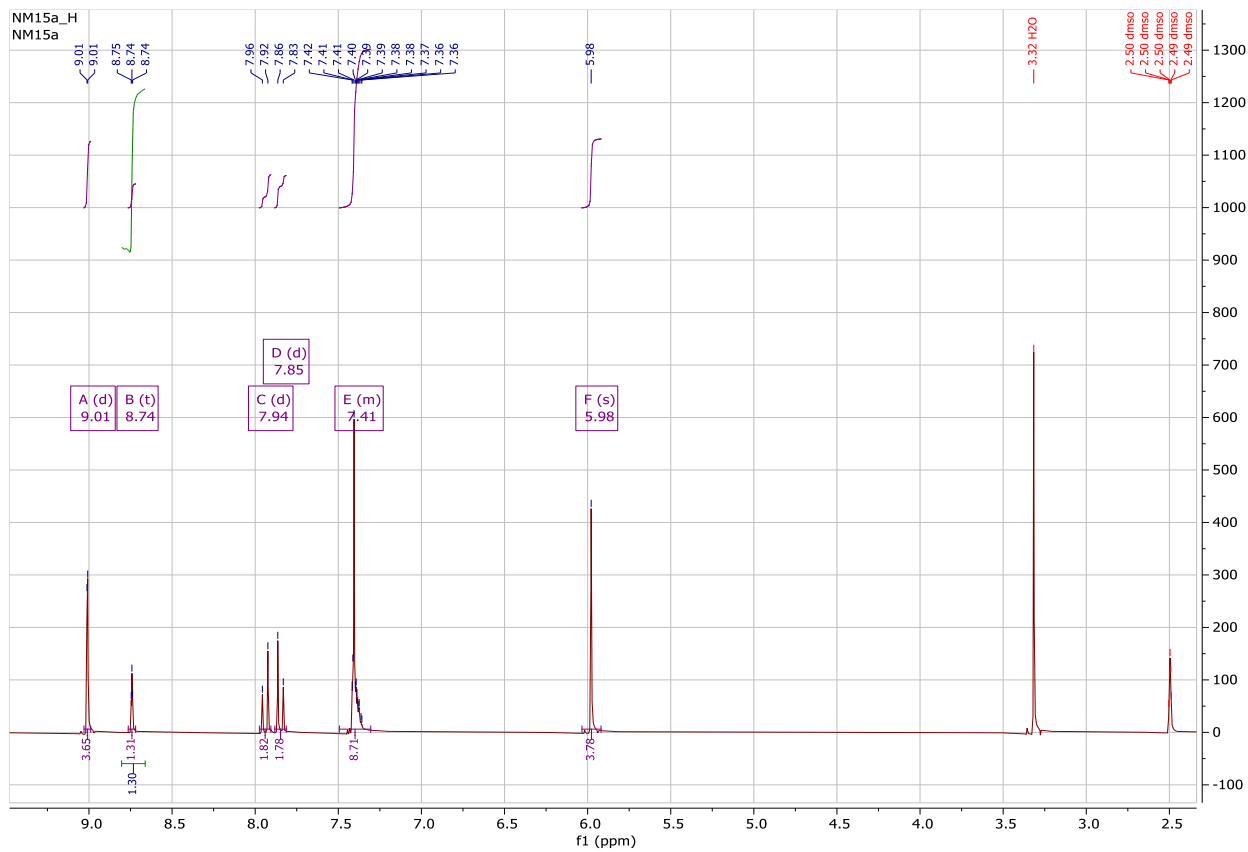
¹³C NMR 5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazol: NM12



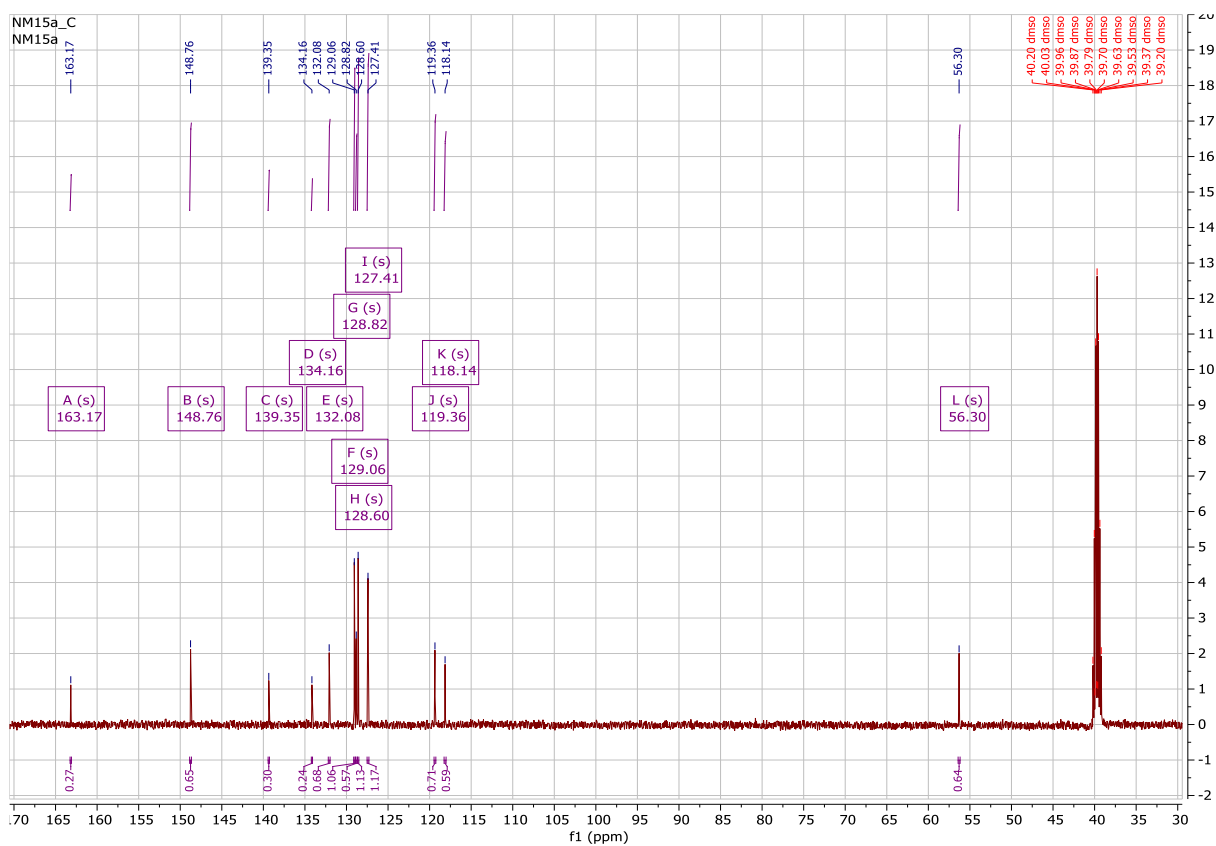
¹H NMR 2-(4-methoxybenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)- 2H-tetrazol: NM14a



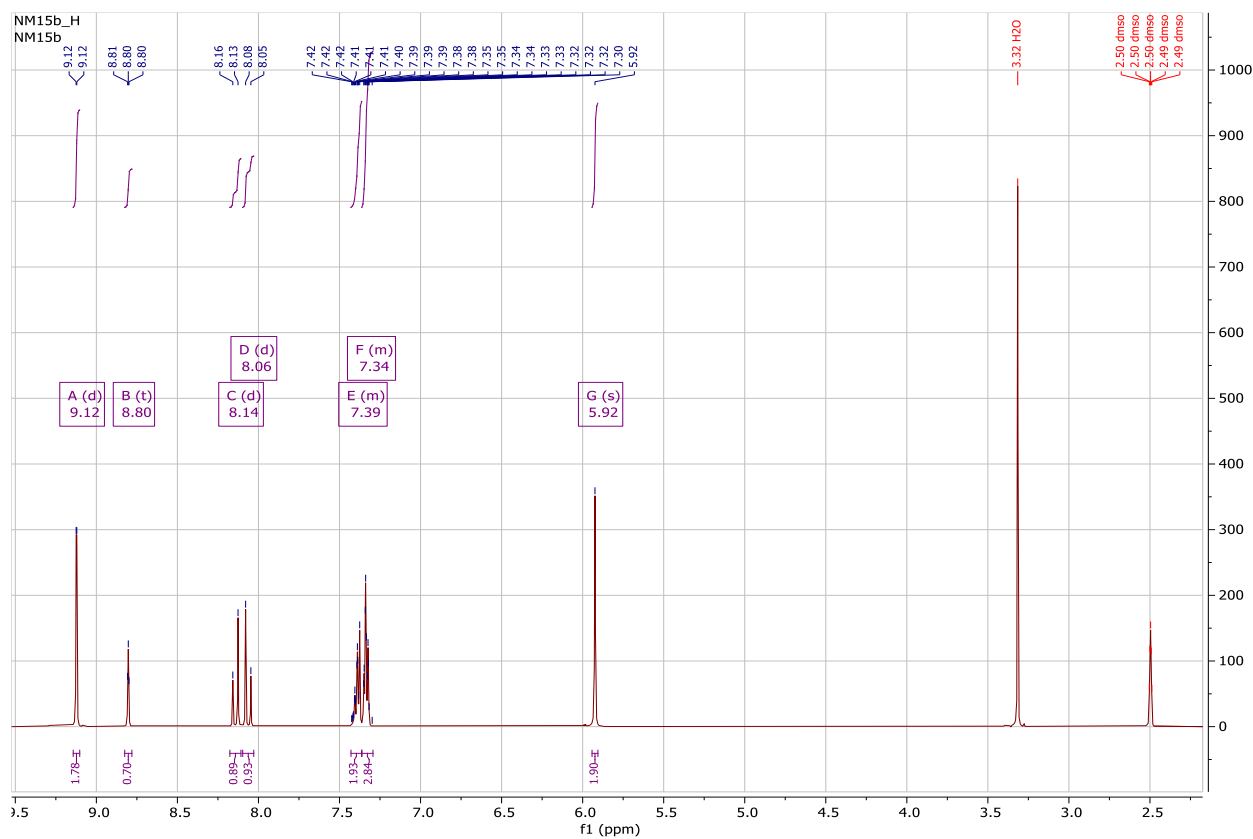
¹³C NMR 2-(4-methoxybenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)- 2H-tetrazol: NM14a



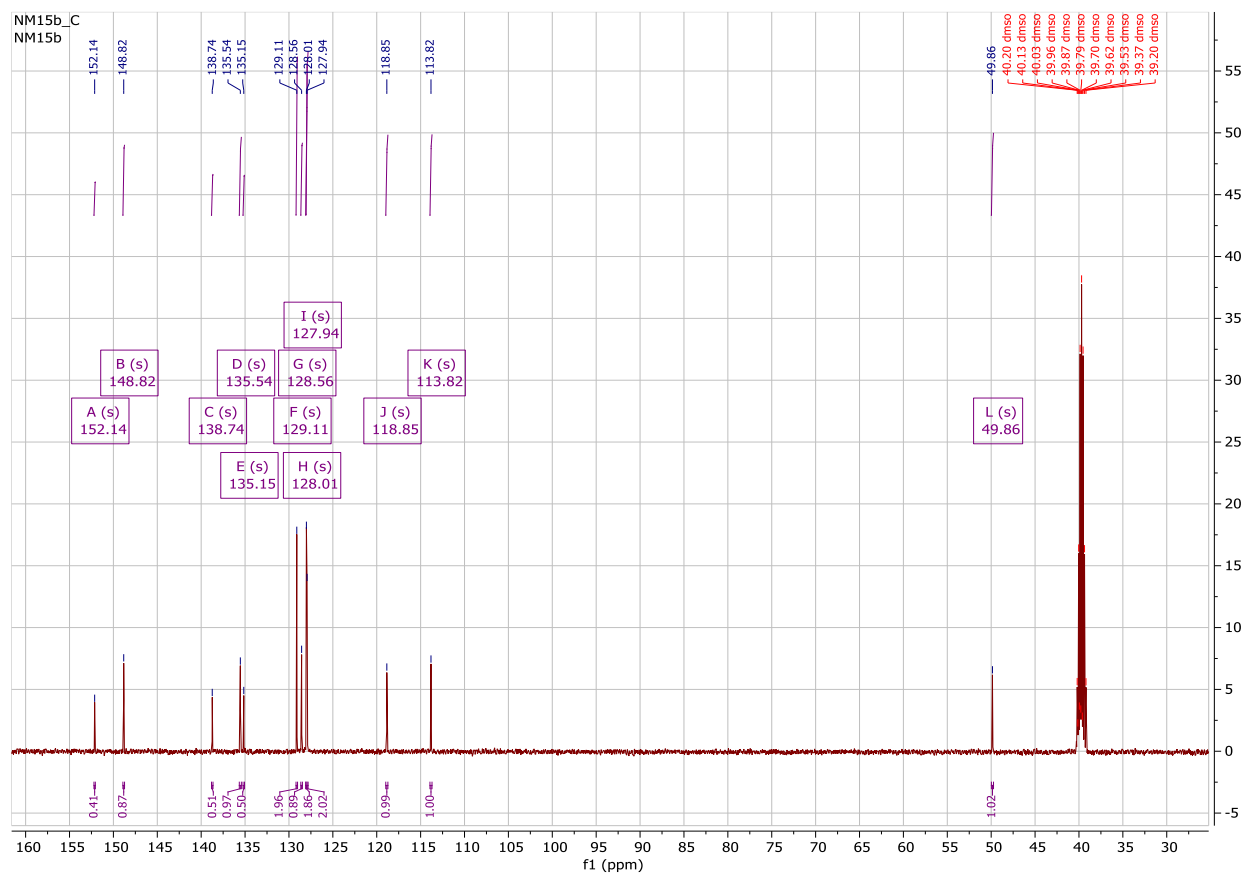
¹H NMR 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazol: NM15a



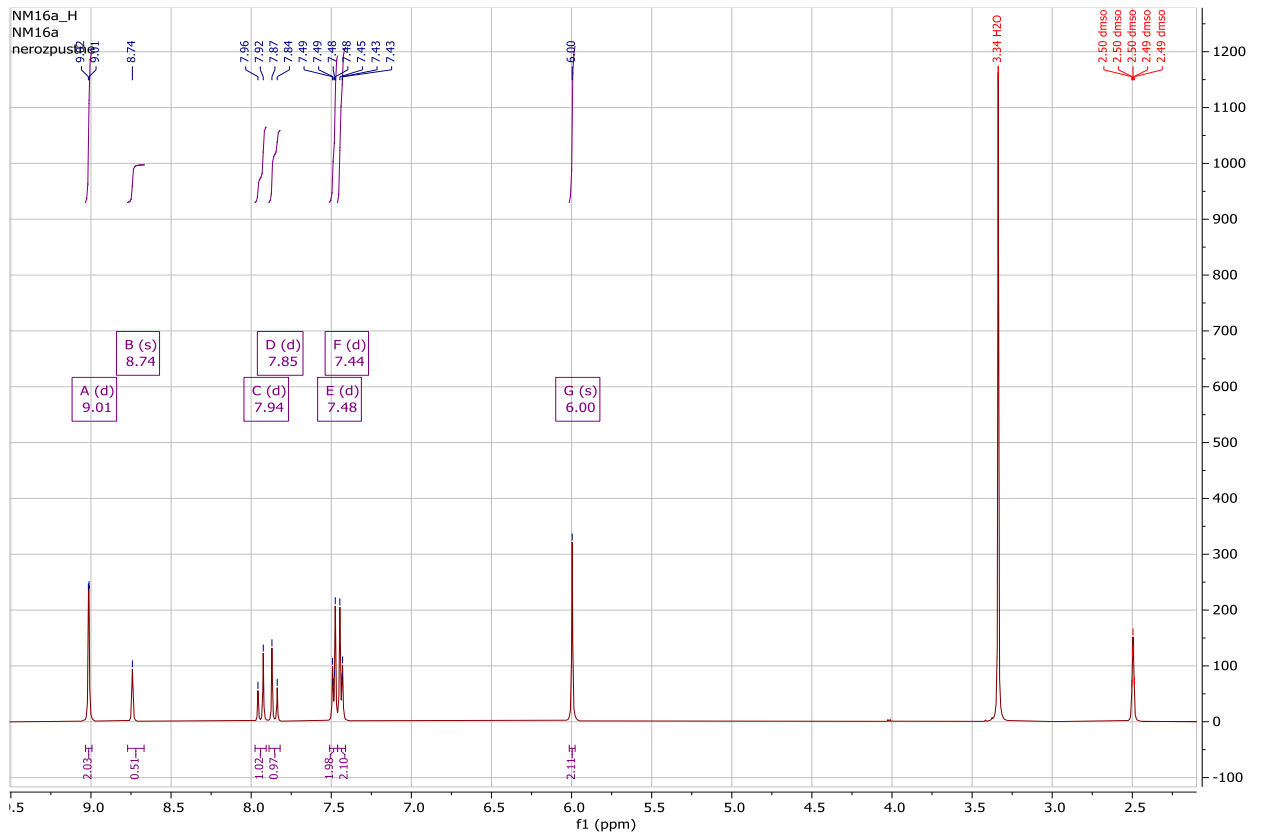
¹³C NMR 2-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazol: NM15a



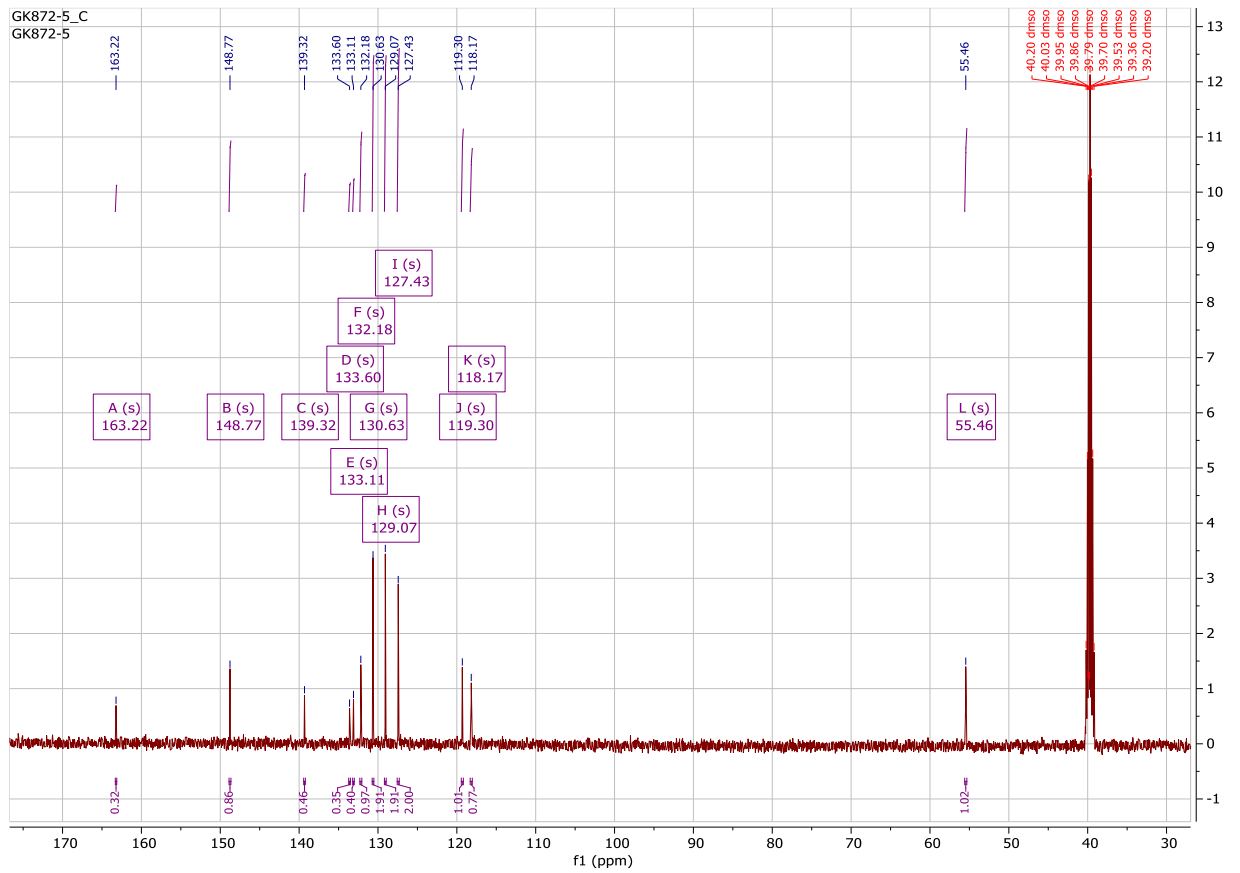
¹H NMR 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazol: NM15b



¹³C NMR 1-benzyl-5-(3,5-dinitrostyryl)-1H-tetrazol: NM15b



¹H NMR 2-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazol: NM16a



¹³C NMR 2-(4-chlorobenzyl)-5-(3,5-dinitrostyryl)-2H-tetrazol: NM16a