

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH  
SULFONAMIDŮ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Autor:** Bc. Benjamín Franko

**Vedoucí práce:** RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

**2021**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NOVEL SYNTHETIZED  
SULFONAMIDES**

DIPLOMA THESIS

**Author:** Bc. Benjamín Franko

**Supervisor:** RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

**2021**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
**(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)**

Jméno a příjmení: **Bc. Benjamín Franko**  
Osobní číslo: **C19583**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Antimikrobiální účinek nově syntetizovaných sulfonamidů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

**Zásady pro vypracování**

Teoretická část:

Vypracování rešerše zaměřené na sulfonamidy.  
Souhrn informací o vlastnostech sulfonamidů.  
Využití sulfonamidů v léčbě infekčních procesů.  
Metody testování citlivosti antimikrobiálních látek.  
Citlivost mikroorganismů na sulfonamidy.

Experimentální část:

Optimalizace metody testování citlivosti.  
Testování citlivosti vybraných mikroorganismů na sulfonamidy.  
Vyhodnocení výsledků a porovnání s publikovanými údaji.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.**  
**Katedra biologických a biochemických věd**  
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.**  
**Ústav organické chemie a technologie**  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.**  
vedoucí katedr

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH SULFONAMIDŮ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16.07.2021

Benjamín Franko

## **POĎAKOVANIE**

Veľké poďakovanie patrí vedúcej práce pani RNDr. Markéte Vydržalové, Ph.D., ktorá mi v stiesnených časových podmienkach pomáhala aj nad rámec svojich aktivít a vždy mi ochotne poskytla teoretické rady a praktické tipy. Rád by som poďakoval aj pani laborantke Janě Halákové, ktorá mi poskytla technickú podporu a laboratórne vybavenie. V neposlednom rade chcem poďakovať rodine a kamarátom za podporu a motiváciu.

Špeciálne poďakovanie patrí doc. Ing. Vladimírovi Pejchalovi, Ph.D. za poskytnutie testovaných chemických látok.

## **ANOTÁCIE**

Testovanie citlivosti bakteriálnych kmeňov a potencionálne patogénnych mikroorganizmov je nevyhnutnou súčasťou vývoja nových liečiv. Hľadanie nových zlúčenín je dôležitou súčasťou medicínskej liečby a prevencie voči patogénom, ktoré si stále vo väčšej miere osvojujú rezistenciu voči dostupným liečivám. Cieľom diplomovej práce je testovanie účinnosti nových derivátov sulfónamidov voči vybraným, bežne sa vyskytujúcim, mikroorganizmom, s možnosťou uplatnenia ako antibiotiká.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Sulfónamidy, citlivosť, účinnosť, rezistencia, AST, mikrodilučná metóda, MIC.

## **TITLE**

Antimicrobial activity of novel synthesized sulfonamides

## **ANNOTATION**

Susceptibility testing of bacterial strains and potentially pathogenic microorganisms is an essential part of new drug development. The search for new compounds is an important part of medical treatment and prevention against pathogens that are increasingly acquiring resistance to available drugs. The aim of the diploma thesis is to test the effectiveness of new sulfonamide derivatives against selected, commonly occurring microorganisms, with the possibility of application as antibiotics.

## **KEYWORDS**

Sulfonamides, susceptibility, effectiveness, resistance, AST, microdilution method, MIC.

# OBSAH

ZOZNAM OBRÁZKOV .....	27
ZOZNAM TABULIEK .....	28
ZOZNAM SKRATIEK.....	29
1. ÚVOD.....	17
2. TEORETICKÁ ČASŤ .....	18
2.1 História .....	18
2.2 Štruktúra a vplyv na účinok.....	20
2.3 Mechanizmus účinku.....	23
2.3.1 Štruktúra a vplyv na funkčnosť .....	23
2.3.2 Bakteriálny metabolizmus a PABA .....	23
2.3.3 Inhibícia dihydropteroátsyntázy .....	24
2.3.4 Inhibícia dihydrofolátreduktázy a ďalšie spôsoby inhibície .....	25
2.4 Základné vlastnosti sulfónamidov.....	26
2.4.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti.....	26
2.4.2 Farmakokinetické vlastnosti a metabolizácia niektorých typov liečiv .....	28
2.5 Rezistencia.....	31
2.5.1 Chromozomálna rezistencia.....	32
2.5.2 Plazmidovo viazaná rezistencia.....	33
2.6 Syntéza sulfónamidov .....	34
2.6.1 Klasická syntéza.....	34
2.6.2 Osvedčené spôsoby syntézy.....	35
2.6.3 Novšie spôsoby syntézy .....	38
2.6.3.1 Syntéza bez využitia sulfonylchloridov.....	38
2.6.3.2 Syntéza za miernych reakčných podmienok.....	39
2.6.3.3 Syntéza na základe p-toluénsulfonylchloridu .....	40
2.6.3.4 Syntéza alkylových a arylových derivátov .....	41
2.6.3.5 Syntéza väzbou na DNA.....	42
2.7 Príklady jednotlivých sulfónamidov .....	43
2.7.1 Sulfanilamid.....	43
2.7.2 Sulfametoxazol.....	44
2.7.3 Sulfadoxín.....	45
2.7.4 Sulfalén.....	46
2.7.5 Kotrimoxazol .....	47



2.8	Liečba nebakteriálnych patológií .....	49
2.8.1	Liečba diabetu .....	50
2.8.2	Sulfónamidy ako antidepresívum .....	51
2.8.3	Liečba rakoviny.....	52
2.8.4	Antiretrovirotický účinok .....	53
2.8.5	Herbicídy .....	55
2.9	Testovanie mikrobiálnej citlivosti .....	55
2.9.1	Všeobecná charakteristika .....	55
2.9.2	Typy metód .....	58
2.9.2.1	Makrodilučná bujónová metóda.....	58
2.9.2.2	Mikrodilučná metóda.....	58
2.9.2.3	Disková difúzna metóda.....	59
2.9.2.4	Technika riedenia agaru .....	60
2.9.2.5	Mikrokalorimetria .....	60
2.9.2.6	Etest.....	61
2.9.3	Postup metódy a média .....	61
2.10	Testovanie účinnosti sulfónamidov voči mikroorganizmom .....	62
2.10.1	<i>Escherichia coli</i> .....	62
2.10.1.1	Novosyntetizované sulfónamidy.....	62
2.10.1.2	Tiazolylové a benzotiazolylové sulfónamidy .....	62
2.10.1.3	Vplyv nových alifatických sulfónamidov .....	63
2.10.1.4	Účinok kurkumínových sulfónamidov .....	63
2.10.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
2.10.2.1	Sulfónamidy odvodené od furanylu s viazaným kovovým prvkom.....	64
2.10.2.2	Vplyv sulfónamidov na báze benzotiazolov .....	64
2.10.2.3	Alifatické sulfónamidy .....	65
2.10.3	<i>Bacillus subtilis</i> .....	65
2.10.3.1	Vplyv indolenyl sulfónamidov .....	65
2.10.3.2	Účinok sulfónamidových chromónov.....	65
2.10.3.3	Amidínové liečivá a benzénsulfónamidy.....	66
2.10.4	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	66
2.10.4.1	Účinok sulfónamidov konjugovaných s makrolidmi.....	66
2.10.4.2	Tiazolové a benzotiazolové sulfónamidy .....	66
2.10.5	<i>Proteus mirabilis</i> .....	67
2.10.5.1	Účinok fenylových derivátov sulfónamidov .....	67
2.10.5.2	Pyridínové deriváty sulfónamidov a benzamidov .....	67

2.10.5.3	Schiffove bázy sulfónamidov.....	67
2.10.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	68
2.10.6.1	Sulfónamidy na báze kovu .....	68
2.10.6.2	Vplyv sulfónamidov inhibujúcich LpxC .....	68
2.10.6.3	Sulfónamidy v komplexe so zlatom.....	68
2.10.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	69
2.10.7.1	Tetrazolové a oxadiazolové deriváty.....	69
2.10.7.2	Kovové komplexy sulfónamidu .....	69
2.10.7.3	Kumarínové sulfónamidy .....	69
2.10.8	<i>Salmonella sp.</i> .....	70
2.10.8.1	Vplyv kovových komplexov sulfónamidov .....	70
2.10.8.2	Pyrimidínové deriváty sulfónamidov .....	70
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	71
3.1	Materiál, reagenty a vybavenie .....	71
3.1.1	Reagenty, roztoky .....	71
3.1.2	Laboratórne vybavenie .....	71
3.1.3	Kultivačné média .....	72
3.2	Testované antibiotiká.....	72
3.3	Testované látky .....	73
3.4	Testované kmene .....	78
3.5	Pracovný postup.....	78
3.5.1	Prvotná príprava.....	78
3.5.2	Príprava mikrobiálnych suspenzií.....	79
3.5.3	Príprava testovaných antibiotík .....	79
3.5.4	Testované sulfónamidy a ich príprava .....	79
3.5.5	Príprava mikrotitračných doštičiek .....	80
3.6	Výsledky testovania minimálnej inhibičnej koncentrácie .....	81
3.6.1	Kontrola kvality mikrodilučnej metódy.....	82
3.6.2	Testovanie gram pozitívnych baktérii .....	82
3.6.3	Testovanie gram negatívnych baktérii .....	83
3.6.4	Testovanie kvasiniek .....	84
3.6.5	Testovanie bakteriostatického a baktericídneho účinku .....	84
4.	ZÁVER .....	87
5.	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	88

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Sulfónamidová skupina .....	22
Obr. 2: Vzorec sulfanilamidu .....	22
Obr. 3: Schéma syntézy sulfanilamidu .....	35
Obr. 4: Syntéza sulfónamidov z thiolov .....	36
Obr. 5: Syntéza využívajúca N-chlórsukcínimid .....	36
Obr. 6: Syntéza sprostredkovaná kyselinou sulfónovou .....	37
Obr. 7: Syntéza sprostredkovaná kyselinou sulfónovou .....	37
Obr. 8: Syntéza pomocou kyseliny sulfinovej .....	37
Obr. 9: Syntéza zo sulfénamidov .....	37
Obr. 10: Syntéza využívajúca prechodné kovy .....	38
Obr. 11: Aktivácia kys. sulfónovej pomocou PPh <sub>3</sub> .....	39
Obr. 12: Sulfonátové estery a sulfónamidy z kys. sulfónovej .....	40
Obr. 13: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom p-toluénsulfonylchloridu .....	41
Obr. 14: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom kys. sulfónovej a izokyanidu .....	42
Obr. 15: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom DNA a sulfinátu .....	43
Obr. 16: Sulfanilamid .....	44
Obr. 17: Sulfametoxazol .....	45
Obr. 18: Sulfadoxín .....	46
Obr. 19: Sulfalén .....	47
Obr. 20: Sulfamethoxazol .....	49
Obr. 21: Trimethoprim .....	49
Obr. 22: Makrodilučná metóda .....	58
Obr. 23: Disková difúzna metóda .....	60
Obr. 24: Etest .....	61
Obr. 25: Príklad morpholinomethylfenylbenzénsulfónamidu .....	74
Obr. 26: Morfolínový cyklus .....	74
Obr. 28: MSA II. ....	75
Obr. 27: MSA I. ....	75
Obr. 30: MSA IV. ....	75
Obr. 29: MSA III. ....	75
Obr. 31: MSA VI. ....	75
Obr. 32: MSA V. ....	75
Obr. 33: MSA VIII. ....	76
Obr. 34: MSA VII. ....	76
Obr. 35: MSA X. ....	76
Obr. 36: MSA IX. ....	76
Obr. 37: MSA XII. ....	76
Obr. 38: MSA XI. ....	76
Obr. 39: MSA XIV. ....	77
Obr. 40: MSA XIII. ....	77
Obr. 41: MSA XVI. ....	77
Obr. 42: MSA XV. ....	77
Obr. 43: schéma dvojkového riedenia na mikrotitračnej doštičke .....	81

## **ZOZNAM TABULIEK**

Tab. 1: Zoznam použitých médií .....	72
Tab. 2: Zoznam použitých antibiotík .....	73
Tab. 3: Zoznam testovaných sulfónamidov .....	74
Tab. 4: Minimálna inhibičná koncentrácia antibiotík na vybrané druhy baktérii .....	82
Tab. 5: Citlivosť na DMSO (hodnoty v percentách roztoku DMSO) .....	82
Tab. 6: Testovanie kvasiniek.....	82
Tab. 7: Hodnoty testovania pre gram pozitívne baktérie .....	85
Tab. 8: Hodnoty testovania pre gram negatívne baktérie.....	86
Tab. 9: Hodnoty testovania pre kvasinky .....	86

## **ZOZNAM SKRATIEK**

5-HT<sub>1A</sub> – 1A sérotonínový receptor (hydroxytryptamine 1A receptor)

5-HT<sub>2A</sub> - 2A sérotonínový receptor (hydroxytryptamine 2A receptor)

5-HT<sub>7</sub> - 7 sérotonínový receptor (hydroxytryptamine 7 receptor)

ALS – acetolaktát syntáza (acetolactate synthase)

AMK – aminokyselina (amino acid)

AST – testovanie mikrobiálnej citlivosti (antimicrobial susceptibility testing)

ATP – adenzíntrifosfát

CA enzým – enzým pre karboanhydrázu (carbonic anhydrase)

CDK2 - cyklín dependentná kináza 2 (cyclin-dependent kinase 2)

CN skupina – kyanoskupina

COX – cyklooxygenáza (cyclooxygenase)

cDNA – komplementárna DNA (complementary DNA)

CFU – jednotka tvoriaca kolónie (colony forming units)

D2 – dopamínový receptor 2 (Dopamine 2 Receptor)

D3 - dopamínový receptor 3 (Dopamine 3 Receptor)

DEL - DNA-kódovaná chemická knižnica (DNA-encoded library)

dfr gén – gén pre dihydroflavonol 4-reduktázu (dihydroflavonol 4-reductase)

DHF – dihydrofolát (dihydrofolate)

DHFR – dihydrofolátreduktáza

DHPS – dihydropteroátsyntáza

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)

DPP-4 - dipeptidylpeptidáza 4 (dipeptidyl peptidase-4)

dsDNA – dvojitá vlákenná DNA (double stranded DNA)

dTMP – deoxytymidínmonofosfát

dUMP – deoxyuridínmonofosfát

EUCAST – Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing)

FDA – Správa potravín a liečiv (Food and Drug Administration)

FdTS - thymidylát syntáza závislá na flavíne (flavin-dependent thymidylate synthase)

folP – gén pre dihydropteroát syntázu (dihydropteroate synthase)

GLP-1 - glukagón podobný peptid 1 (glucagon-like peptid 1)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíka

HIV – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (human immunodeficiency virus)

HCl – kyselina chlorovodíková

HLE - ľudská leukocytárna elastáza (human leukocyte elastase)

IgG – imunoglobulín G

ISO – Medzinárodná organizácia pre normalizáciu (International Organization for Standardization)

JNK 1 - c-Jun N-terminálna kináza (c-Jun N-terminal kinases)

K-ATP kanál – draslíkový kanál citlivý na ATP

K<sub>i</sub> – inhibičná konštanta

K<sub>m</sub> - Michaelisovej konštanta

KOH – hydroxid draselný

LpxC – UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglukosamín deacetyláza (UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase)

m-CPBA – kyselina meta-chloroperoxybenzoová (meta-chloroperoxybenzoic acid)

MBC - minimálna baktericídna koncentrácia (minimum bactericidal concentration)

MDD – depresívna porucha (major depressive disorder)

MgSO<sub>4</sub> – siričitan horečnatý

MH agar - Mueller-Hintonov agar

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia (minimum inhibitory concentration)

Mw – molekulárna hmotnosť (molecular weight)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – uhličitan sodný

NCCLS - Národný výbor pre klinické laboratórne normy (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

NCS - N-chlórsukcínimid (N-chlorosuccinimide)

NF-Y - nukleárny transkripčný aktivátor (nuclear transcription factor Y)

NH<sub>2</sub> skupina – aminová skupina

NIR – blízke infračervené žiarenie (near-infrared spectroscopy)

NNRTI - nenukleozidové inhibítory reverznej transkriptázy (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor)

NSAID – nesteroidná protizápalová látka (nonsteroidal anti-inflammatory drug)

PABA - kyselina para-aminobenzoová (para-aminobenzoic acid)

PDT – fotodynamická terapia (photodynamic therapy)

PFP-sulfonát - pentafluórfenolový sulfonát (pentafluorophenyl sulfonate)

pH – záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových iónov v roztoku

POCl<sub>3</sub> – trichlorid-oxid fosforečný

R – označenie pre substituent (atóm, funkčná skupina) na základnej štruktúre

R-MgBr - bromid horečnatý s naviazaným substituentom

R-MgCl – chlorid horečnatý s naviazaným substituentom

RNA - kyselina ribonukleová (ribonucleic acid)

SMT – sulfametazín

SPD – sulfapyridín

STZ – sulfathiazol

sul1 – gén pre sulfónamid rezistentnú dihydropteorát syntázu 1 (sulfonamide resistant dihydropteroate synthase)

sul2 – gén pre sulfónamid rezistentnú dihydropteorát syntázu 2 (sulfonamide resistant dihydropteroate synthase)

SUR1 – receptor pre sulfonylmočovinu (sulfonyleurea receptor 1)

$T_{1/2}$  – biologický polčas

Tf<sub>2</sub>O – anhydrid kyseliny trifluormethansulfónovej

THF – kyselina tetrahydrofolová (tetrahydrofolát)

TS - thymidylát syntáza (thymidylate synthase)

TSA agar – tryptónový sójový agar (tryptone soya agar)



# 1. ÚVOD

Antibiotiká patria v súčasnosti medzi bežný a účinný spôsob liečby mikrobiálnych ochorení. Už v prvej polovici dvadsiateho storočia boli objavené, a vo veľkom využívané, základné typy antibiotík, medzi ktoré patria aj sulfónamidy. Svojou popularitou sa priblížili najznámejšiemu antibiotiku, penicilínu, ktorý postupom času začali sprevádzať podobné problémy ako aj u sulfónamidov – nadmerné a častokrát neopodstatnené užívanie, ktoré viedlo k vytvoreniu rezistencie na mnohé zlúčeniny a deriváty. Hľadanie látok odvodených od dávno známych liečiv je v súčasnosti veľkou výzvou a zároveň jednou z mála možností, ako sa brániť pred rezistentnými kmeňmi.

Súčasťou práce je teoretická časť popisujúca chemické zloženie a vlastnosti sulfónamidov, ich históriu a metódy syntézy. Taktiež sú spomenutí známi zástupcovia sulfónamidových liečiv. V závere sú ako premostenie k praktickej časti práce uvedené metódy testovania účinnosti antibiotík, metodika práce a príklady štúdií zaoberajúcich sa testovaním sulfónamidov na niektorých kmeňoch baktérii, využívaných aj v praktickej časti práce.

Experimentálna zložka práce spočívala v testovaní účinnosti morpholinomethylfenylových derivátov benzénsulfónamidov na kmene gram pozitívnych a gram negatívnych baktérii, a taktiež kvasinkách rodu *Candida*. Cieľom bolo testovanie citlivosti daných derivátov, vyhodnotenie ich účinnosti, overenie bakteriostatického, resp. baktericídneho pôsobenia a porovnanie účinnosti voči overeným typom antibiotík.

## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 História

Jedným z najväčších vynálezov dvadsiateho storočia sú bezpochyby antibiotiká. Rozsiahla skupina liečiv, vďaka ktorej sme viac-menej chránení pred dôsledkami baktérii a infekcii, spôsobila medicínsku revolúciu. V minulom storočí došlo k razantnému zvýšeniu priemernej dĺžky života (v USA o vyše 50 percent) a v najväčšej miere sa o to zapríčinili antibiotiká.

Práve sulfónamidy boli prvé klinicky používané antibiotiká, ktoré sa začali využívať v tridsiatych rokoch 20. storočia (penicilín o necelých desať rokov neskôr) a hneď po nástupe zaznamenali značný úspech a dosiahli pokles úmrtnosti. Výrazný prelom nastal pri chorobách ako tuberkulóza, meningitída alebo puerperálna horúčka, spôsobujúca úmrtia žien pri pôrode, a najmä šarlach, kde došlo v prvých rokoch po nasadení liečiva k polovičnému poklesu úmrtnosti. I keď by sme zohľadnili nie úplne presné štatistiky zaznamenávajúce úmrtia, stále sa jedná o jednoznačnú výhru nového spôsobu liečby infekcii.

Otcom sulfónamidov je Gerhard Domagk, vedecký pracovník známeho nemeckého chemického závodu I.G. Farben. Povolaním bol patológ a bakteriológ, ktorý bol za objav ocenení Nobelovou cenou (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

Domagkov výskum sa zamerával na testovanie textílnych farbív, konkrétne látky Prontosil Rubrum, pričom pôvodným úmyslom bolo vyvinúť azofarbivá vhodné pre textilný priemysel, ktoré pre obsah sulfónamidov dosahovali vyššiu stabilitu. No v roku 1932 sa podarilo zaznamenať Domagkovi antibakteriálny vplyv tohto červeného farbiva, o tri roky sa informácie dostali na verejnosť a prvé klinické pokusy na ľuďoch prebehli roku 1936. Trvalo tak skoro tridsať rokov, než látka, ktorej štruktúra bola známa už na začiatku dvadsiateho storočia, započala výrazný posun v medicíne a infektológii. Taktiež už v roku 1919 bola Heidelbergerom a Jacobsom zistená antibakteriálna aktivita týchto azofarbív, no neprikladala sa im väčšia pozornosť. Prelomový terapeutický objav ich tak len tesne obišiel a na prvé antibakteriálne lieky sa muselo čakať až na Gerharda Domagka a tridsiate roky dvadsiateho storočia (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

Domagk testoval farbivá na potkanoch, kde sa pozitívne prejavil antibakteriálny účinok voči baktériám streptokoka. Sulfónamidy, penicilíny a neskôr ďalšie typy antibiotík tak nahradili

dovtedy využívané, pomerne primitívne a potencionálne nebezpečné, metódy liečby pomocou imunizácie zvieracími sérami. Prvými pacientami liečenými Prontosilom boli tehotné ženy, u ktorých sa vďaka sulfónamidom zaznamenal pokles úmrtnosti o vyše štvrtinu. Aj vďaka dobrému účinku na mnohé ďalšie, v tej dobe nebezpečné infekcie, sa liečivá začali rýchlo šíriť a za prvé roky ich bolo vyrobených cez šesťtisíc ton. Lekári ich bežne predpisovali bez receptu a výskum prišiel s viac než päťtisíc sulfo zlúčeninami a odvodenými látkami ako sulfatiazol, sulfadiazín či sulfametazín. Mnohé z týchto látok však neskôr vykazovali toxicitu alebo rýchly vznik rezistencie (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

Gerhard Domagk a nemecký chemický tím nebol jedinými, ktorí sa zaujímali o výskum nových liečiv. V danom čase a po prvých úspechoch s Prontosilom sa vo Francúzsku na Pasteurovom inštitúte zaoberali testovaním antibakteriálnej aktivity Ernest Fourneau a Daniel Bovet. Zamerali sa konkrétne na aktívnu zložku Prontosilu, sulfanilamid, a pomohli objasniť štruktúru a najmä mechanizmus účinku. Odpovedali na otázku, prečo je látka aktívna in vivo, no nie vo vonkajších podmienkach a prečo dokáže hubiť baktérie len pri podaní testovanému subjektu. Výsledkom bolo zistenie vzťahu medzi proformou Prontosilom a aktívnym produktom sulfanilamidom, čo poukázalo na žalúdočne enzýmy ako pôvodcu metabolizácie. Sulfanilamid, medziprodukt pri výrobe azofarbív, sa javil ako vhodnejšia voľba na terapeutické použitie vďaka nižšej cene a menším vedľajším účinkom (napríklad začervenanie kože) (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

Sulfónamidy sa zároveň podpísali pod rozvoj vedeckých postupov, kde sa v štyridsiatych rokoch začal uplatňovať tzv. skrining, teda spojenie biochemických a mikrobiologických metód pre výber tej najvhodnejšej zlúčeniny s najvyšším účinkom spomedzi stoviek a tisícok možností a derivátov. Rovnako tak bolo zaujímavé postupné chápanie mechanizmu účinku sulfónamidov, kde niektoré vtedajšie testy vykazovali protibakteriálny účinok in vivo, no už nie v skúmvavke. To viedlo k myšlienke, že liečivo funguje v rámci podpory imunitného systému. Až neskôr sa prišlo na vzťah k inhibícii kyseliny para-aminobenzoovej (PABA), zhodou okolností práve tej, ktorá je nutná pre výrobu kyseliny listovej baktériami (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

Slávu Prontosilu a podobných liečiv zatienil až príchod penicilínu a neskôr ďalších antibiotík, preukazujúcich lepší účinok, nižšiu toxicitu a väčšiu odolnosť voči vzniku rezistencie. Sulfónamidy majú i tak veľkú zásluhu za boj proti infekciám reumatickej horúčky, meningitídy, baktérii *Shigella* a najmä beta-hemolytických streptokokových infekcií, kde sa prvýkrát (vo väčšom množstve) využil na fronte medzi vojakmi. Sulfónamidové lieky si našli uplatnenie aj pri „dezinfekcii“ tráviaceho traktu pred operáciami a výhodou bola taktiež nízka cena a jednoduché podanie. V súčasnosti sa sulfónamidy využívajú najmä pri liečbe infekcií močového traktu alebo ako náhrada pre pacientov alergických na penicilín, a stále zaznamenávajú aj mnoho minoritných použití (Cohen a Cluff, 1961; Gaudillière, 2009; Jayachandran et al., 2010; Rubin, 2018; Sermo, 2017; Britannica, 1998).

## 2.2 Štruktúra a vplyv na účinok

Medzi prvé chemické látky využívané v boji proti infekciám patria sulfónamidy. I keď sa za najznámejšie antibiotiká zvyčajne považujú penicilíny, látky na báze sulfanilamidu boli prvé, ktoré tento boj započali. Sulfónamidy sú syntetické liečivá a zo štruktúrneho hľadiska sa jedná o látky obsahujúce sulfanilovú a amidovú skupinu, ktorých štruktúra má cyklický charakter.

Na začiatku vychádzame zo štruktúry amidu, čo je látka obsahujúca karbonylovú skupinu  $C=O$ , na ktorú sa viaže zložka s dusíkom. Ak hovoríme o sulfónamidoch, karbonylový úsek bol nahradený sírou viažucou dva atómy kyslíku. Z chemického pohľadu sa sulfónamidy môžu ďalej rozdeľovať na primárne, sekundárne a terciárne, v závislosti od počtu atómov vodíku viazaných na dusíku, resp. ich nahradenie reťazcami uhlíka (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

Sulfónamidové antibiotiká vychádzajú konkrétne z látky sulfanilamid, ktorého štruktúra pozostáva z aromatického kruhu, dvoch  $NH_2$  skupín a sírnej skupiny. Pre aktivitu je podstatná práve voľná aminoskupina nachádzajúca sa na štvrtom uhlíku. Dôležitou súčasťou je sulfonylová skupina, ktorej substitúcie zabezpečujú diverzitu odvodených typov liečiv (ako napr. sulfadiazín alebo sulfamethoxazol) schopnými inhibovať kyselinu para-aminobenzoovú (PABA).

Z pohľadu štruktúry delíme sulfónamidy na antibakteriálne látky a liečivá bez antimikrobiálneho účinku. Prvá menovaná skupina obsahuje aromatický amín, teda voľnú

amínovú skupinu viazanú na aromatický cyklus a NH<sub>2</sub> skupinu viazanú s R reťazcom (atóm vodíku alebo heterocyklus). Liečivá, ktoré nevykazujú antibakteriálnu aktivitu majú nearomatický amín a ich odlišná štruktúra má úspech v liečbe iných patologických stavov, ktoré budú konkrétnejšie rozpísané v príslušnej kapitole. V rámci aktivity a pôsobenia liečiva je dôležitý vzťah medzi štruktúrou a jej pôsobením na mechanizmus účinku (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

Kategória antibakteriálnych sulfónamidov zahŕňa liečivá líšiacie sa napríklad molekulovou hmotnosťou alebo biologickým polčasom T<sub>1/2</sub> (dobou potrebnou pre pokles koncentrácie látky z maximálnej hodnoty na polovičnú). Ako príklad sa dá uviesť sulfisoxazol obsahujúci dva cyklické kruhy (pentacyklus ako substituent druhého amínu) s Mw 267,3 a T<sub>1/2</sub> šesť hodín (DrugBank, 2021). Naproti tomu sulfasalazín má zložitejšiu štruktúru – tvorený je tromi konjugovanými cyklami, z ktorých dva sú prepojené dvojitou dusíkovou väzbou, a v molekule sa nachádza aj karboxylová skupina. Tým je daná väčšia molekulová hmotnosť látky (Mw 398,3) a pozorujeme variabilnejší eliminačný polčas (päť až desať hodín) (DrugBank, 2021) oproti sulfisoxazolu (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

V kategórii sulfónamidov bez antibakteriálneho účinku sa nachádzajú látky vhodné ako liečivá pre diabetes (anti-hyperglykemické konštrukty), diuretiká, serotoninové antagonisy, protizápalové a protikŕčové konštrukty alebo lieky vykazujúce aktivitu proti vírusu HIV.

Anti-hyperglykemické konštrukty obsahujú v štruktúre amínovú skupinu NH-R, kde voľný reťazec R bol nahradený skupinou -CO-NH-R, ktorá zodpovedá za účinok znižujúci glykemický stav. V porovnaní s antibakteriálnymi zástupcami sa jedná o väčšie látky, kde v prípade glyburidínu dosahuje molekulová hmotnosť Mw 494, no biologický polčas je len dve až štyri hodiny (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

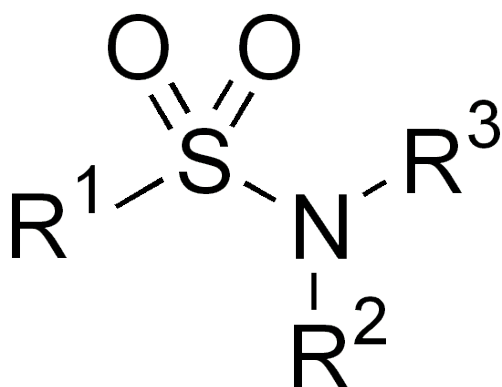
Diuretiká sú látky podporujúce vylučovanie vody a využívané pri liečbe hypertenzie. NH-R skupina je nahradená aromatickým cyklom obsahujúcim špecificky viazaný atóm dusíku alebo uhlíku a štyri bočné reťazce R – hovoríme o slučkovej štruktúre (loop) – alebo dvomi cyklami s viacerými špecificky viazanými atómami (dusík, uhlík sírna skupina SO<sub>2</sub>) tvoriace thiazidové diuretiká. Látky ako dorzolamid alebo bumetanid sú dobrými príkladmi zobrazujúcimi široké spektrum vlastností sulfónamidových látok. Kdežto ich Mw je relatívne podobná (324,4 a 364,4), tak sa s polčasom eliminácie sa výrazne odlišujú – pre prvú menovanú látku sú to až štyri mesiace, pre bumetanid len 60 až 90 minút (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

Antagonisti sérotonínu sa používajú pri liečbe depresie a ich molekulová kostra pozostáva okrem iného z dvoch alebo viacerých cyklov (šesť a päťčlenný kruh), kde R skupina je tvorená alkylom. Sú to menšie látky s krátkym polčasom (naratriptan – Mw 295,4; T<sub>1/2</sub>: 2,5 hodiny) (PubChem, 2021).

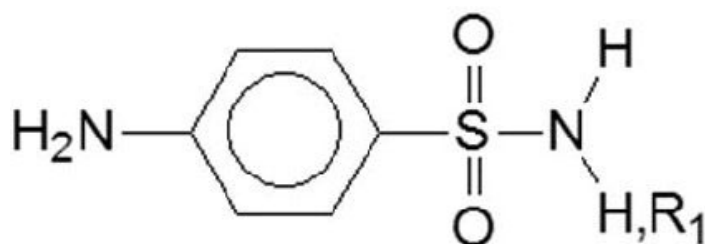
Používané sú taktiež protizápalové sulfónamidy, kde je R skupinou aryl viazaný na heterocyklus, alebo inhibítory karboanhydrázy, kde je reťazcom R aromatická skupina (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

Sulfónamidy zahŕňajú širokú škálu látok a môžeme ich považovať za pomerne jednoducho modifikovateľné zlúčeniny, umožňujúce prídanie, odoberanie alebo náhradu atómov a reťazcov. Tým je možné do značnej miery ovplyvňovať ich vlastnosti, či už chemické alebo kinetické (ako napríklad Mw alebo biologický polčas), a taktiež dobre cieľiť účinok aj mimo antibakteriálny svet (využitie dokonca ako herbicídy) (Yousef et al., 2018; Zinner a Mayer, 2015).

Obr. 1: Sulfónamidová skupina (dostupné z: [https://www.wikiwand.com/en/Sulfonamide\\_\(medicine\)](https://www.wikiwand.com/en/Sulfonamide_(medicine)))



Obr. 2: Vzorec sulfanilamidu (upravené, dostupné z: [shorturl.at/dqvGI](http://shorturl.at/dqvGI))



## 2.3 Mechanizmus účinku

### 2.3.1 Štruktúra a vplyv na funkčnosť

Sulfónamidy fungujú voči mikroorganizmom bakteriostaticky, nie sú primárne toxickými látkami a sú prostriedkom k spomaleniu alebo zastaveniu rastu a množenia baktérii. Vďaka syntéze veľkého množstva rôznych derivátov sulfo liečiv boli objavené konkrétne štruktúrne rysy, ktoré vykazujú zväčšenie alebo zníženie aktivity liečiva. Nevyhnutná je prítomnosť aromatickej NH<sub>2</sub> skupiny viazanej na benzénový kruh, ktorá je základom funkčnosti liečiva. Dôležitá je taktiež jej orientácia – ide o para viazanú skupinu vzhľadom k sulfónamidovej skupine (Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

Zmena orientácie by znamenala zmenu aktivity a pri substituentoch viazaných orto alebo meta by došlo k zníženiu účinnosti, a taktiež nie je možné nahradiť benzén iným cyklickým systémom. Naopak, pri substitúcii v rámci NH<sub>2</sub> zložky sulfónamidovej skupiny (elektrónodonorným systémom – napríklad heteroaromatickým substituentom) by došlo k zlepšeniu aktivity, no dvojité substituencie oboch vodíkov v NH<sub>2</sub> skupine by aktivitu opäť znížila. K tomu by došlo aj po nahradení SO<sub>2</sub> časti CO skupinou (Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

Pre zachovanie aktivity je tiež nutné, aby bola sulfónamidová skupina viazaná na aromatický benzén priamo cez atóm síry. Ak sa nahradí -SO<sub>2</sub> za -SO<sub>3</sub>H skupinu, dochádza k deaktivácii, no substituencie -SO<sub>2</sub>H účinnosť nenaruša (Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

### 2.3.2 Bakteriálny metabolizmus a PABA

Bakteriostatický účinok sulfónamidov spočíva v reakcii s kyselinou p-aminobenzoovou, skrátene PABA. PABA je kľúčovým prvkom v syntéze kyseliny listovej, ktorá je ďalej nutná pre tvorbu purínových a pyrimidinových báz, teda prostriedkov k syntéze DNA. Ak dôjde k narušeniu série reakcií a syntéz, nie je možné tvoriť genetický materiál, rast a rozmnožovanie baktérii je zastavené. K smrti bunky to však nevedie (Coppoc, 1996; Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

Kyselina p-aminobenzoová je živinou a esenciálnou súčasťou mikroorganizmov, keďže je nutná pre tvorbu folátov. Pre činnosť ľudských buniek nie je zásadná, no radíme ju do skupiny vitamínov (vitamín B<sub>x</sub>). V ľudskom tráviacom trakte je tvorená baktériami *E. coli* (Coppoc, 1996; Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

Kyselina tetrahydrofolová, resp. tetrahydrofolát (THF), je derivát kyseliny listovej, ktorý poskytuje metylovú skupinu pri syntéze tymidínu a podieľa sa na tvorbe purinového cyklu. Je tak prostriedkom k syntéze nukleových kyselín, DNA a RNA, a taktiež proteínov (bunkovej steny). K daným procesom poskytuje jeden uhlík, preto sa nazýva aj monokarbónový derivát. K tvorbe folátu je okrem PABA potrebný aj 2-amino-4-oxo-6-metylpteridíndifosfát a kyselina L-glutámová (Coppoc, 1996; Mondal, 2017; Tačić et al., 2017).

Za proces tvorby folátu zodpovedajú viaceré enzymatické kroky, ktoré sú zároveň cieľom inhibície liečiva. Prvým kľúčovým enzýmom je dihydropteroátsyntáza (DHPS). Jeho úlohou je katalyzovať reakciu PABA s pteridínom (konkrétne je vo forme dihydropteroát pyrofosfátu) za vzniku dihydropteroátu (kyseliny dihydropteroovej), ktorý je medziproduktom na ceste k syntéze folátu. Ide o prvý zásadný regulačný bod a cieľ liečiv vedúcich k inhibícii folátu. Nasleduje tvorba dihydrofolátu z dihydropteroátu s prídavkom kyseliny glutámovej v procese, za ktorý zodpovedá enzým dihydrofolátsyntáza (Fernández-Villa et al., 2019; Tačić et al., 2017).

Poslednou časťou procesu je katalýza dihydrofolátreduktázou (DHFR), ktorá umožňuje vzniknúť výslednému produktu, kyseline listovej. Proces tvorby folátu zahŕňa aj iné cesty, napríklad príjem kyseliny listovej zo stravy miesto de novo syntézy. V danom procese sa taktiež využíva dihydrofolátreduktáza, no k tvorbe dihydrofolátu. Tento proces neprebíha v bakteriálnych bunkách a je prítomný skôr v ľudskom organizme, ktorý je odkázaný na príjem folátu z vonkajších zdrojov (Fernández-Villa et al., 2019; Tačić et al., 2017).

### **2.3.3 Inhibícia dihydropteroátsyntázy**

Poznáme mnoho typov sulfónamidových liečiv, tzv. antifolátov, ktoré sa dajú rozdeliť na základe mechanizmu fungovania do dvoch základných skupín: klasické antifoláty, látky s podobnou štruktúrou ako kyselina listová, a naopak, štruktúry nepodobajúce sa na folát – neklasické antifoláty. Výsledkom je v prvom prípade spomalenie alebo zastavenie metabolizmu kyseliny listovej a v druhom rade, pri neklasických sulfónamidoch, zabránenie samotnej syntézy folátu. Sulfónamidy patria do druhej skupiny a ich účinok sa zameriava najmä na dva zmienené enzýmy - dihydropteroátsyntázu a dihydrofolátreduktázu (Fernández-Villa et al., 2019; Tačić et al., 2017).



Inhibícia enzýmu dihydropteroátsyntáza prebieha kompetitívnou a reverzibilnou inhibíciou a výhodou tohto spôsobu je špecifickosť a selektivita. Inhibítory DHPS sú štruktúrne podobné PABA – majú podobnú dĺžku (6,7 Å PABA, 6,9 Å sulfanilid), podobne (ploché) priestorové usporiadanie a taktiež rovnaké rozloženie náboja. To umožňuje sa inhibítorom viazať na enzým a zároveň bráni interakcii PABA s aktívnym miestom enzýmu. Výsledkom je narušenie reakcie dihydropteroátu s PABA, čím nakoniec nedôjde k syntéze kyseliny tetrahydrofolovej (Coppoc, 1996; Fernández-Villa et al., 2019; Mondal, 2017; Sköld, 2010; Tačić et al., 2017).

Keďže sa jedná o kompetitívny spôsob bránenia katalýzy, pri zvýšenom množstve PABA by sa účinok liečiva znížil a boj o katalytické miesto by vyhrala kyselina aminobenzoová. Sulfónamidy preto pôsobia bakteriostaticky a nevedú k priamej smrti mikroorganizmu. Selektivita sa uplatňuje v cielenom pôsobení na bakteriálny metabolizmus, keďže produkujú folát de novo a sú odkázané na prítomnosť enzýmu, zatiaľ čo u ľudských buniek enzymatický mechanizmus chýba a folát získavajú príjmom z potravy (Coppoc, 1996; Fernández-Villa et al., 2019; Mondal, 2017; Sköld, 2010; Tačić et al., 2017).

#### **2.3.4 Inhibícia dihydrofolátreduktázy a ďalšie spôsoby inhibície**

Inhibícia enzýmu dihydrofolátreduktáza je minoritnejší spôsob liečby a jednou z mála využívaných látok je trimetoprim, klasický typ antifolátu, ktorý pôsobí prostredníctvom inhibície premeny dihydrofolátu (DHF) na tetrahydrofolát (THF). Ide o analóg kyseliny listovej a je tvorený diaminopyrimidínovou štruktúrou. Štruktúra síce obsahuje NH<sub>2</sub> skupinu, no bez prítomnosti síry. Tieto liečivá sa využívajú skôr doplnkovo k sulfónamidom pre zlepšenie účinku, no vykazujú aj cytostatické a imunosupresívne vlastnosti a využitie našli skôr pri liečbe rakoviny, malárie alebo autoimunitných chorôb, než v boji proti baktériám. Podobne ako u antagonizmu k PABA, aj inhibícia dihydrofolátreduktázy je kompetitívna, no vedie k vyčerpaniu folátu a má tak baktericídny prejav (Fernández-Villa et al., 2019; Sköld a Swedberg, 2017).

Tretí enzým, o ktorý sa opiera liečba sulfónamidmi, je thymidylát syntáza (TS). Enzým zabezpečuje inú dráhu tvorby DHF, ktorá prebieha spätne z THF a je napojená na tvorbu pyrimidínu. Prvotnou reakciou je premena deoxyuridínmonofosfátu (dUMP) na deoxytymidínmonofosfát (dTMP), ktorú katalyzuje TS v prostredí s N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metylén THF ako metylačným činidlom. Druhotným produktom reakcie sa stáva DHF. Inhibícia TS

prebieha ireverzibilne a kvôli štruktúrnej podobnosti enzýmov v baktériách a ľudských bunkách je nežiadúcim účinkom zvýšená toxicita. Aj napriek tomu si liečivá našli uplatnenie v klinickej praxi a sú súčasťou liečby rakoviny, keďže urýchľujú odbúravanie uracilu (Fernández-Villa et al., 2019; Sköld a Swedberg, 2017).

Zaujímavým cieľom súčasného výskumu je thymidylát syntáza závislá na flavíne (FDTS), kde nie je prítomná táto štruktúrna podobnosť a liečba sa nespája s toxicitou. Problémom je rezistencia mnohých mikroorganizmov voči klasickým antifolátom, preto sa vyvíjajú nové typy liečiv využívajúce iné mechanizmy väzby substrátov. Typickým príkladom rezistencie je *Mycobacterium tuberculosis*, ktorá odoláva aj mnohým iným typom liečiv, preto je vývoj nových druhov antibiotík v dnešnej dobe o to viac podstatný (Fernández-Villa et al., 2019; Sköld a Swedberg, 2017).

## 2.4 Základné vlastnosti sulfónamidov

### 2.4.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti

Sulfónamidy sa chemickým prejavom radia k slabým kyselinám a kyslý charakter vyplýva zo skupiny  $\text{SO}_2$ , ktorá umožňuje stabilizovať rezonanciou anión dusíku.

Látky zo skupiny sulfónamidov sa prejavujú rôznou bakteriostatickou aktivitou, súvisiacou s ich fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. Jeden zo základných sulfónamidov, benzénsulfónamid, vykazuje oproti ďalším derivátom nižšiu účinnosť a vzhľadom k týmto zlúčeninám sa nachádza na opačnom konci spektra aktivity (Nikoofard et al., 2017; Soriano-Correa et al., 2003).

Pozorovaný bol súvis medzi kyslosťou derivátov (hodnota kyslej disociačnej konštanty  $\text{pK}_a$  pre amidovú skupinu) a záporný náboj sulfo skupiny. Vlastnosti vychádzajú konkrétne z rôznych substitúcií N1 amidovej skupiny, kde výsledné zmeny aktivity sú výsledkom elektronegativity substituovaného R reťazca. Zavedenie substituentu na základnú molekulu viedlo k tvorbe záporného náboja na N1 atóme u derivátov (u sulfathiazolu (STZ) bol zaznamenaný kladný náboj). Atóm N4 a  $\text{NH}_2$  skupina nie je ovplyvnená, keďže sú dostatočne vzdialené od R substituentu (Nikoofard et al., 2017; Soriano-Correa et al., 2003).

Hodnota kyslosti  $\text{pK}_a$  vychádza z veľkosti náboja na skupine (pre aktivitu sulfónamidov je podstatný náboj na amidovej skupine). So zvýšením náboja sa zvyšuje konštanta  $\text{pK}_a$ , no znižuje aktivita, preto zásaditejšie látky sú menej bakteriostatické. Miera kyslosti sa určovala

na základe protonačnej energie, teda rozdielu energie medzi neutrálnou a protonovanou molekulou. Čím je energia väčšia, tým je látka zásaditejšia (Nikoofard et al., 2017; Soriano-Correa et al., 2003).

Faktorom ovplyvňujúcim aktivitu je aj R substituent na atóme N1. Čím má skupina R väčšiu schopnosť priťahovať elektróny a tvoriť silnejšiu väzbu, tým dochádza k znižovaniu pKa a vyššej aktivite látky (opäť najmenšia pre základný sulfónamid). Pre vlastnosti sulfónamidov je dôležitá aj SO<sub>2</sub> skupina a príslušný R elektrónakceptorný substituent. Silnejší substituent znamená pozitívnejší náboj v sulfónovej oblasti a vyššiu aktivitu látky (Nikoofard et al., 2017; Soriano-Correa et al., 2003).

V prípade disociácie a kationovej formy zlúčenín prevláda viac kladný náboj na atóme N4 vzhľadom k N1 a pri zápornej aniónovej forme sa nachádza väčší záporný náboj na N1, než N4. Tieto lokácie so zvýšeným nábojom sú reaktívnejšie a vhodnejšie k protonizácii, resp. deprotonizácii. Prítomnosť R substituenta podporuje delokalizáciu elektrónov popri hlavnom reťazci a tým stabilitu štruktúry. Kationové a aniónové deriváty sú tak reaktívnejšie než v neutrálnej podobe (Nikoofard et al., 2017).

Taktiež vlastnosti ako elektro-chemický potenciál  $\mu$ , molekulárna tvrdosť  $\eta$  a index elektrofility  $\omega$  sú ovplyvnené R skupinou. Prítomnosť substituentu zvyšuje hodnoty týchto charakteristík a stabilizuje systém (viazaním elektrónov) (Nikoofard et al., 2017).

Fyzikálno-chemické vlastnosti sulfónamidov sú v neposlednom rade ovplyvnené aj rovinnosťou štruktúry a polohou medzi aminoskupinou a benzénovým cyklom, ktoré by mali zvierat' uhol približne 180 stupňov (pre aktívne látky SPD, SMT a ďalšie deriváty), no v prípade základného sulfónamidu je uhol 345 stupňov. Rovinnosť je nevyhnutná pre účinnosť látok, no substitúcia R skupinou ju neovplyvňovala (Nikoofard et al., 2017).

Dĺžka väzby medzi atómom N4 a aromatickým kruhom je 1,38 Å, čo je hodnota podobná veľkosti väzieb v aromatickom kruhu (1,39 Å). To značí, že aminoskupina je dobre spriahnutá s benzénovým kruhom a neovplyvňuje ju prítomnosť substituentu. K zmenám dĺžky väzieb dochádza pri tvorbe kationovej alebo aniónovej formy. Dĺžka väzieb je zároveň podstatná pre samotnú účinnosť liečiva, keďže aktívnejšie deriváty s väčším bakteriostatickým pôsobením mali kratšiu väzbu medzi atómom N1 a R substituentom (Nikoofard et al., 2017).

Pri návrhu a syntéze farmaceutických liečiv je dôležitá ich tepelná stabilita, čo zohľadňujú termodynamické vlastnosti. Termodynamika látok sa určila prostredníctvom atomizačnej

energie a deriváty, najmä substituované, prejavujú nižšiu molárnu entalpiu a vyššiu termodynamickú stabilitu (Nikoofard et al., 2017).

#### **2.4.2 Farmakokinetické vlastnosti a metabolizácia niektorých typov liečiv**

Farmakokinetika sa zaoberá pohybom, spracovaním a metabolizáciou liečiv na základe ich fyzikálno-chemických vlastností. Zohľadňuje účinok liečiv a väzbu na ich cieľové štruktúry a taktiež je prostriedkom k správne dávkovaniu liekov a sledovaniu priebehu medikácie. Tieto faktory sú podstatné najmä pri dlhotrvajúcej liečbe a užívaní antibiotík s bakteriostatickým účinkom, akými sú aj sulfónamidy. Proces liečby si vyžaduje výpočet správneho množstva a konštantnej koncentrácie liečiva, ktorá sa musí udržať v krvnom obehú po dlhšiu dobu (Saghir a Ansari, 2018).

Obzvlášť náročné je udržať tieto požiadavky u detských pacientov, ktorí podliehajú rýchlemu vývoju. Sledovanými farmakokinetickými faktormi bývajú predovšetkým minimálna inhibičná koncentrácia (MIC), teda minimálne množstvo liečiva nutné k účinku, koncentrácia potrebná pre udržanie vplyvu liečiva, maximálna koncentrácia v plazme alebo doba potrebná k zníženiu koncentrácie na polovicu, teda biologický polčas (Saghir a Ansari, 2018; Velký Lékařský Slovník, 2020).

Ako príklad pre popis farmakokinetických vlastností môže byť použitý sulfónamid metoxyprazín. Liečivo má dlhý polčas rozpadu daný aj slabou väzbou na plazmatické proteíny a prejavuje sa stabilnou plazmatickou koncentráciou aj v dlhšom časovom horizonte. Metoxyprazín sa prejavuje vyššou plazmatickou koncentráciou u starších ľudí a novorodencov než u dospelých jedincov, zatiaľ čo u detí je nižšia. Pokles koncentrácie v čase je pomalší práve u novorodencov a seniorov. U maximálnej väzobnej kapacity pre plazmu sa podobné rozdiely (s ohľadom na vekovú kategóriu) neprejavujú a vyššie hodnoty sú prítomné len u starších ľudí. Minimálna koncentrácia liečiva je u novorodencov nižšia než u iných vekových kategórii, čo je zapríčinené menším množstvom väzobných proteínov v sére a vyššou hladinou bilirubínu. Biologický polčas sulfónamidu je najdlhší taktiež u novorodencov a  $t_{50\%}$  dosahuje vyše 100 hodín, pričom u dospelých len cez päťdesiat hodín. Významným faktorom pre farmakokinetiku a správne nastavenie liečby je aj pomer medzi prvotnou koncentráciou lieku a následne udržiavacou dávkou. U novorodencov a dospelých stačila pomerne nízka udržiavacia dávka, u detí bol nižší pomer počiatočnej a udržiavacej koncentrácie (Sereni et al., 1968).

Výsledkom sa dá povedať, že metoxyprazín ponúkajú vysokú plazmatickú koncentráciu z počiatočnej dávky liečiva, ktorá musí byť v nadbytku, aby bola zachovaná dostatočná hodnota  $R^*$ . Odbúravanie liečiva prebieha v pomerne dlhom časovom úseku a prejavujú sa značné farmakokinetické rozdiely pre rôzne vekové skupiny pacientov (Sereni et al., 1968).

Do skupiny sulfónamidov s dlhým pôsobením patrí aj sulfalén (sulfametopyrazín). Antibiotikum patrí medzi staré typy liečiv a dnes je používané len sporadicky (predáva sa iba v dvoch krajinách), no slúži ako dobrý príklad pre vykreslenie farmakokinetiky. Liečivo sa podáva vo forme tabliet alebo intramuskulárnou injekciou (Geitman et al., 1979).

Množstvo sulfametopyrazínu v krvi bolo po pätnástich minútach po podaní na úrovni koncentrácie 18  $\mu\text{g/ml}$  pri užití tabliet a 20  $\mu\text{g/ml}$  po injekčnom podaní. Priemerná koncentrácia sulfalénu v krvi počas doby účinku činila 35  $\mu\text{g/ml}$  (tabletová forma) resp. 31  $\mu\text{g/ml}$  (injekčná forma) a maximálna koncentrácia dosiahla 54,4  $\mu\text{g/ml}$  (solubilne) a 50,2  $\mu\text{g/ml}$  (injekčne) v čase 1,5 až 6 hodín, s tým, že väčšie časové výkyvy sa vyskytovali pri intramuskulárnom podaní. Antibiotikum zotráva v obehu 120 hodín s biologickým polčasom 53,6, resp. 49,8 hodín. Hodnoty zodpovedajú celkovému sulfametopyrazínu v krvi, no liečivo sa distribuuje buď vo forme voľnej alebo proteínovo viazanej. Koncentrácia voľnej frakcie je skoro 4,5  $\mu\text{g/ml}$ . Sulfalén sa vylučuje močom a vylúčenie vyše sedemdesiatich percent liečiva trvá približne tri dni (Geitman et al., 1979).

Farmakokinetické vlastnosti sulfalénu tak vo väčšine parametrov nie sú závislé na spôsobe podania, čo vyplýva z podobných hodnôt koncentrácií pre užitie solubilnej tablety aj intramuskulárnej injekcie. Dôležitým faktorom sa stáva absorpcia liečiva, ktorá je pri injekcii 1,3x väčšia. To zodpovedá kratšiemu času nutnému k dosiahnutiu maximálnej koncentrácie (Geitman et al., 1979).

Ďalším príkladom liečby sulfónamidmi je bakteriochlorín, nové liečivo na báze sulfónamidov, ktoré má potenciál pre využitie v liečbe rakoviny, a vykazuje odlišné farmakokinetické hodnoty, než antibakteriálne liečivá. Účinok bakteriochlorínu využíva fotodynamickú terapiu (PDT). Princíp PDT spočíva v ožarovaní fotosenzitívneho substrátu (v tomto prípade bakteriochlorínu), čo vedie k tvorbe kyslíkových radikálov (ROS). K excitácii sa využíva viditeľné alebo infračervené žiarenie (NIR), čo vedie následne k deexcitácii prostredníctvom fluorescencie (Dąbrowski et al., 2012).

Pri fluorescencii elektróny poskytujú energiu pre tvorbu radikálov, ktoré majú schopnosť oxidovať a narúšať dôležité bunkové súčasti. Poznanie farmakokinetiky je pri tomto type

liečiva o to podstatnejšie a dôležitejšie pre správne nastavenie liečby, ktorá by mala zahŕňať čo najnižšiu toxicitu a vedľajšie účinky, no zároveň poskytovať dostatočnú účinnosť, akumuláciu v cieľových bunkách a fotostabilitu (Dąbrowski et al., 2012).

Z testovania na myších subjektoch vyplýva, že bakteriochlorín sa prejavoval rýchlym nástupom, kde už po dvoch hodinách bolo možné zaznamenať minimálnu inhibičnú koncentráciu a po ďalších štyroch preukazoval maximálne hodnoty koncentrácie v orgánoch. Najvyššia koncentrácia bola prítomná v slezine a po ďalších šiestich hodinách sa bakteriochlorín dal zaznamenať v črevnom systéme, čo poukazuje na jeho rýchle odbúravanie. Bakteriochlorín sa nachádzal v nádorových bunkách vo väčšej miere než v krvi, svaloch alebo koži, čo značí určitú selektivitu liečiva. Oproti podobnému typu liečiva, sulfonovanému bakteriochlóru, sa dokáže hromadiť v cieľových bunkách vo väčšom množstve, a taktiež je stabilnejší a zotrváva v organizme po dlhšiu dobu. Problémom tohto typu liečby môže byť práve nedostatočná stabilita a neschopnosť liečiva udržať sa v nádoroch. Konjugáty boli prítomné v obličkách, čo naznačuje glomerulárnu filtráciu (Dąbrowski et al., 2012).

Medzi sulfónamidy, ktoré nevykazujú antibakteriálne účinky a neobsahujú aromatického amín patrí aj celecoxib. Celecoxib je liečivo skupiny NSAID a funguje ako inhibítor cyklooxygenázy (izoforma COX-2). Liečivo má protizápalový účinok a využíva sa k liečbe artritídy alebo spondylitídy (potenciál aj pre liečbu rakoviny). Farmakokinetika celecoxibinu je ovplyvňovaná genetickými aj vonkajšími vplyvmi a je tak vhodným príkladom na vykreslenie rozdielov (Gong et al., 2012; Stempak et al., 2005; Tang et al., 2001).

Celecoxib sa užíva perorálne a vyznačuje sa rýchlym vstrebávaním, už za tri hodiny je dosiahnutá maximálna koncentrácia. Metabolizácia prebieha v pečeni prostredníctvom metylhydroxilácie a len malé množstvo zostáva v nezmenenej podobe. Výsledkom metabolizačných procesov je karboxycelecoxib, ktorý sa viaže s kyselinou glukurónovou a vzniká glukuronid. Metabolity sa neprejavujú farmakologickou aktivitou. Niektoré z metabolických reakcií sú sprostredkované enzýmom cytochróm p450. Jeho aktivita je geneticky podmienená a u rôznych jedincov sa môže mierne líšiť, čo vedie k výchyľkám v expozícii niektorých pacientov celecoxibinom (Gong et al., 2012; Stempak et al., 2005; Tang et al., 2001).

Enzým cytochróm p450 zabezpečuje metabolizáciu mnohých farmak v ľudskom organizme a jedným z katalyzovaných procesov je aj metylhydroxylácia celecoxibinu. Enzým sa

vyznačuje genetickým polymorfizmom a je kódovaný viacerými alelami. Vplyv genetického základu a jednotlivých alel ovplyvňuje účinnosť enzýmu a tým aj farmakokinetiku celecoxibinu. Tá vyplýva z výslednej substitúcie niektorých aminokyselín. Typické alely pre belochov sú CYP2C9 \* 2 a CYP2C9 \* 3, zatiaľ čo alely CYP2C9 \* 2 a CYP2C9 \* 13 sa špecificky vyskytujú v ázijskej populácii. Alela CYP2C9 \* 3 ovplyvňovala zvýšenú koncentráciu celecoxibinu v krvi a zároveň znížené množstvo metabolitov. Alela CYP2C9 \* 13 sa vyskytuje len s veľmi nízkou frekvenciou, no i tak je jedinečná pre ázijskú populáciu. Jej vplyv na farmakokinetické vlastnosti avšak nebol preukázaný. Najvýraznejšie sa prejavuje alela CYP2C9 \* 3, pri ktorej má celecoxibin najdlhší biologický polčas (približne 22 hodín, čo je skoro trojnásobný nárast oproti CYP2C9 \* 1), taktiež čas pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie je dvojnásobný a maximálna koncentrácia približne 825 ng/mL je tiež najvyššia (Gong et al., 2012; Stempak et al., 2005; Tang et al., 2001).

Vplyv na metabolizáciu celecoxibinu majú aj externé podmienky, ako prítomnosť potravy. Jedlo s vysokým obsahom tukov napomáha absorpcii liečiva a umožňuje dosahovať jeho vyššiu koncentráciu, resp. podávať väčšie dávky. Maximálna koncentrácia v prítomnosti stravy bola skoro dvojnásobná (2284 µg/L). Biologický polčas sa výrazne neodlišoval (Gong et al., 2012; Stempak et al., 2005; Tang et al., 2001).

## 2.5 Rezistencia

Sulfónamidy sa v súčasnej medicíne používajú ako antibiotiká už len v menšej miere a v niektorých krajinách je ich použitie obmedzené na participáciu s iným liečivom (najčastejšie trimethoprim). Dôvodov k opatrnosti pri predpisovaní sulfónamidov je viacero, keďže antibiotiká v určitom počte prípadov vyvolávajú nepriaznivé účinky ako kožné problémy alebo komplikácie krvného systému (krvné dyskrázie alebo aplastická anémia). Taktiež nie je farmaceutický priemysel odkázaný na ich používanie vďaka existencii mnohých účinnejších a menej závadných antibiotík. V neposlednom rade je ich užívanie obmedzené aj kvôli rozšírenej rezistencii baktérii voči týmto látkam a ani pri dlhodobom znížení užívania, a odstránení selekčného tlaku, nedošlo k zlepšeniu situácie. Niektoré baktérie si tak vytvárajú mutantné verzie enzýmov, ktoré sú cieľom pre sulfónamidové antibiotiká, ktoré sa stávajú odolnými a nepodliehajú inhibícii. Tým následne nie je ovplyvnená tvorba folátu a mikroorganizmus je schopný naďalej prežívať a reprodukovať sa.

### 2.5.1 Chromozomálna rezistencia

Rezistencia baktérii k sulfónamidom vyplýva z mutácii a zmien genetického materiálu a svoj pôvod má taktiež v plazmidoch. Na genetickej úrovni, pri chromozomálnej rezistencii, dochádza k náhodným spontánnym mutáciám určitých génov, čo vedie k odolnosti mikroorganizmu. Pri týchto bodových mutáciách sú pozorované zmeny génu pre dihydropteroát syntázu (gén folP), následkom čoho dochádza k posunu báz. Gén je vysoko konzervovaný a mutácia viedla k odlišnej syntéze aminokyselín, resp. ich zámene. Výsledkom bol enzým DHPS, ktorý mal väčšiu hodnotu inhibičnej konštanty ( $K_i$ ) pre sulfónamidy a zároveň zvýšenú Michaelisovej konštantu ( $K_m$ ) pre PABA. Enzým tak bol menej účinný a zvýšila sa schopnosť tvorby rezistencie (Sköld a Swedberg, 2017).

Výsledky rezistencie boli preukázané na viacerých radoch baktérii. U *Escherichia coli* bodové mutácie zapríčinili zámenu fenylalanínu za leucín a  $K_i$  bola zvýšená 150násobne. Bežný výskyt rezistencie je prítomný aj u *Campylobacter jejuni*. Práve u tohto radu je veľkosť génu folP najväčšia v bakteriálnej ríši (390 aminokyselín), no za rezistenciu môžu len štyri mutácie. Tie spôsobujú, že inhibičná konštantka vzrástla z  $0,5 \mu\text{M}$  na  $500 \mu\text{M}$ . U streptokokov je rezistencia daná iným typom mutácie, a to duplikáciou. Dochádza k vzniku šesť-nukleotidových repetícií, opäť v oblasti pre gén folP, a k opakovaniu aminokyselín izoleucín a kyseliny glutámovej. Duplikácie sa objavujú na viacerých miestach proteínu, čo značí, že zmeny pre rezistenciu sa vyvíjali nezávisle a ich vplyvom došlo k odlišnostiam v terciárnej štruktúre proteínu (Sköld a Swedberg, 2017).

Zaujímavým príkladom je konkrétne kmeň *Streptococcus pyogenes*, pri ktorom sa prejavuje dlhotrvajúca odolnosť voči sulfónamidom vďaka ireverzibilnosti rezistencie, a to aj napriek tomu, že sa pri týchto infekciách sulfónamidové liečivá už mnoho desaťročí nepoužívajú. Zaujímavým je aj rozsah odolnosti, ktorý je značne široký a minimálna koncentrácia inhibície (MIC) sa pohybuje v rozmedzí približne 500 až  $1000 \mu\text{g/ml}$ . Rozdielny je aj mechanizmus vzniku odolnosti, kde dochádza k mutácii horizontálnou výmenou génov - transdukciou alebo transformáciou. Zmeny v sekvencii nukleotidov sú oproti kmeňom citlivým k sulfónamidom výraznejšie, až na úrovni skoro 14 percent. Flexibilitnosť streptokokov budovať si rezistenciu pre sulfónamidy ovplyvňuje práve horizontálny prenos, a to aj medzi rôznymi kmeňmi (sledované boli prieniky medzi *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus dysgalactiae*) (Sköld a Swedberg, 2017).



Keďže jedným z prvých cieľov liečby sulfónamidmi bola meningitída a lieky boli využívané vo veľkej miere, vznik rezistencie nastal aj u *Neisseria meningitidis*. Proces je opäť založený na horizontálnej výmene a následnej rekombinácii génov a mutácia je typu inzercie nukleotidov (pre serín a glycín) (Sköld a Swedberg, 2017).

Naopak, baktérie *Mycobacterium tuberculosis* sú citlivé na niektoré sulfónamidové antibiotiká. Mnoho desaťročí boli sulfónamidy pri jej medikácii v úzadí, keďže existovali účinnejšie antibiotiká, no v súčasnom období, keď sa zvyšuje rezistencia tuberkulózy voči širokému spektru liekov, sa paradoxne neprejavila dlhotrvajúca odolnosť práve u niektorých sulfónamidov (Sköld a Swedberg, 2017).

### 2.5.2 Plazmidovo viazaná rezistencia

Baktérie si vyvinuli rezistenciu pomocou zmeny enzýmu dihydrofolát syntáza, teda odlišnosťami pre cieľovú štruktúru sulfónamidov. Vznik rezistencie založenej na prirodzených spontánných mutáciách enzýmov nie je úplne očakávaný voči syntetickým liečivám, ako sú aj sulfónamidy. Plazmidová rezistencia je umožnená génmi pre enzýmy dihydropteroát syntáza a dihydrofolát reductáza. Podieľajú sa na nej najmä dva konkrétne gény – *sul1* a *sul2* – oba pre enzým DHPS. *Sul1* je spriahnutý s inými génmi rezistencie, zatiaľ čo *sul2* sa nachádza na odlišnom type malých plazmidov. Oba sa vyskytujú najmä u gramnegatívnych mikroorganizmov v podobných frekvenciách a v oblasti efektívnej pre šírenie pôvodcov rezistencie (v danej oblasti je prítomný už známy a častý typ rezistencie) (Sköld, 2001).

Výhoda a úspešnosť rezistencie je podmienená štruktúrou zodpovedajúceho enzýmu, ktorý sa vie viazať s vysokou špecificitou na fyziologický substrát potrebný pre ďalší priebeh reakcie, no súčasne sa vyhnúť väzbe na inhibítor (sulfónamid), ktorý má podobnú štruktúru. Enzým DHPS podmienený rezistentnými génmi je charakteristický nízkou hodnotou  $K_m$  a zároveň je odolný voči vysokým koncentráciám sulfónamidov (Sköld, 2001).

V odlišnej situácii sa nachádza rezistencia enzýmov pre DHFR, ktorú si mikroorganizmy vybudovali pre liečivo trimetoprim. Kódovaná je geneticky rozsiahlejším systémom a na exprimácii odolných enzýmov sa podieľa takmer dvadsať génov, napríklad zo skupiny *dfr* génov (najtypickejším pre gram-negatívnu skupinu baktérií je *dfr1*). Gény boli medzi rôznymi kmeňmi rozšírené horizontálnym prenosom. Mnohé z *dfr* génov boli objavené v baktériách prítomných v chovných zvieratách, ako sú ošípané. Nadmerné užívanie antibakteriálnych

liečiv v hospodárstve je jedným z dôvodov súčasných problémov straty ich účinnosti pri ľudskej medicíni, čoho príkladom sú aj dfr gény v ošipáných a rezistencia na trimetoprim (Sköld, 2001).

## 2.6 Syntéza sulfónamidov

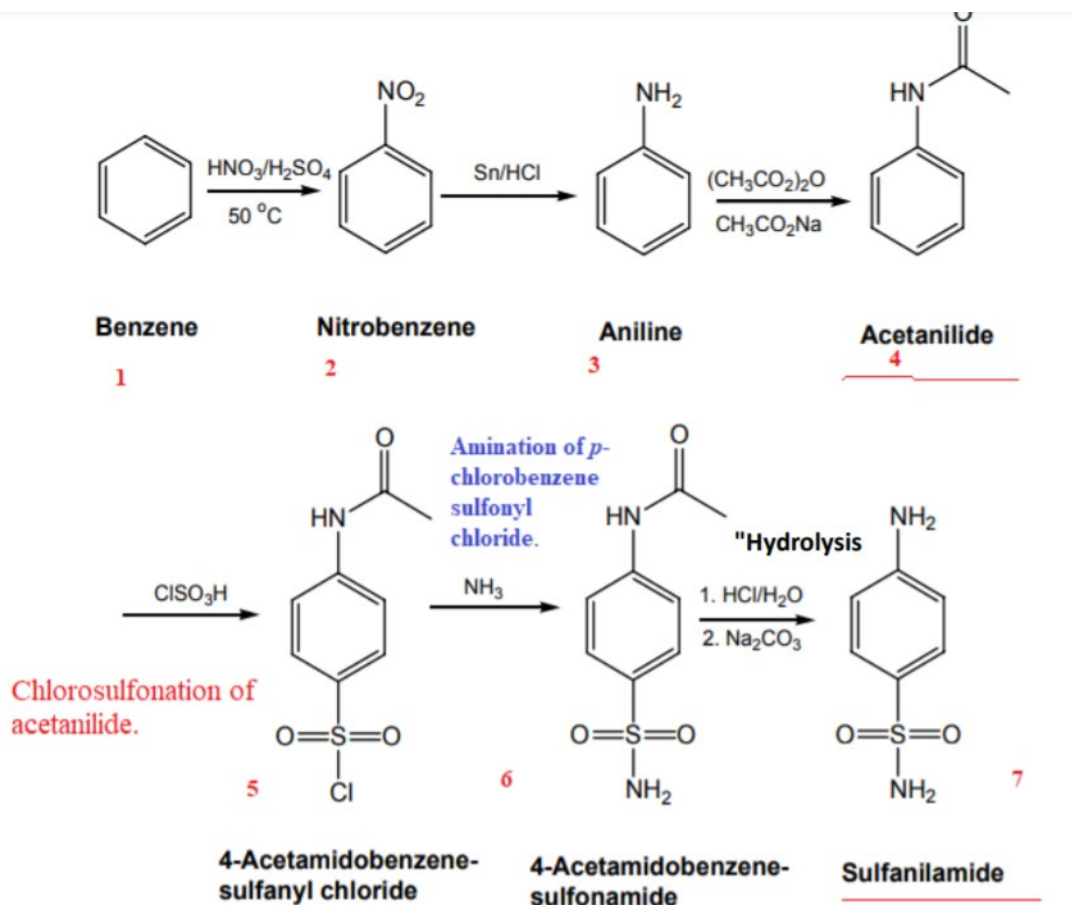
### 2.6.1 Klasická syntéza

Sulfónamidy sú dôležitou súčasťou medicíny už skoro celé storočie. Za ten čas sa stihli zdokonaľiť výrobné postupy a metódy syntéz, no v rámci komplexného pohľadu na sulfónamidové liečivá je vhodné si ukázať základné prvky syntézy, využívané v počiatočnej antibiotickej éry.

Základom jednoduchej syntézy sulfónamidov je reakcia aminokyselín so sulfonylchloridom. K rozpusteniu žiadanej aminokyseliny dôjde v destilovanej vode, kde sa udržiava mierne alkalické pH prostredia medzi hodnotami 8-10. K regulácii zásaditosti je vhodný uhličitan sodný. Do roztoku sa následne pridá sulfonylchlorid, konkrétne p-toluénsulfonylchlorid. Dochádza k vylúčeniu vodíka a tvorbe HCl (z p-toluénsulfonylchloridu), čo vedie k okyseleniu prostredia. Výsledkom je zrazenina, ktorá sa rekryštalizuje metanolom a vysuší siričitanom horečnatým (Quadir et al., 2016).

Dobrym príkladom syntézy je sulfanilamid, ktorý je základnou sulfónamidovou zlúčeninou. Východiskovou látkou je acetanilid, ktorý sa pripravuje z benzénu reakciou cez anilín. Anilín je acetylovaný anhydridom kyseliny octovej, ktorý chráni aminoskupinu pred reakciami s kyselinami a zabezpečuje stabilitu. Následne môže dôjsť k inkorporácii chlórulfonylovej skupiny za vzniku 4-acetamidobenzénsulfonyl chloridu. Proces sa nazýva chlórulfonylácia a funkčnú skupinu poskytuje kyselina sulfónová a chlórulfonylová. Bezprostredne po vzniku 4-acetamidobenzénsulfonyl chloridu sa pridáva do reakčnej zmesi amoniak a dochádza k tvorbe 4-acetamidobenzénsulfónamidu. V poslednej časti syntézy podlieha acetamidová skupina hydrolyze a hydrolyzovaný produkt sa neutralizuje pomocou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Výsledkom je sulfanilamid (ALLANI, Baraa G., 2021).

Obr. 3: Schéma syntézy sulfanilamidu (dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/349805992\\_synthesis\\_of\\_sulfanilamide](https://www.researchgate.net/publication/349805992_synthesis_of_sulfanilamide))



### 2.6.2 Osvedčené spôsoby syntézy

Existuje viac než 20000 derivátov sulfónamidov, za čím je podpísané poznanie mnohých syntetických ciest. Základom klasických metód syntézy sulfónamidov je premena thiolov. Niektoré novšie metódy pracujú s primárnymi alebo sekundárnymi amínmi miesto amoniaku, no stále je nutná prítomnosť sulfonylchloridu. Sulfonylchloridy sú látky málo stabilné a ťažko skladovateľné, s ktorými sa obtiažne manipuluje a poskytujúce nie vždy dostatočný výťažok. Preto sa hľadajú postupy, ktoré by zmiernili dané nedostatky. Jednou z možností je použitie N-chlórsukcínimidu (NCS) a systému tetrabutylamóniumchlorid - voda v acetonitrile a sulfonylchloride. Výhodami sú rýchlosť a selektivita reakcie (Kołaczek et al., 2014).

Osvedčenou metódou je tvorba sulfónamidov z kyseliny sulfónovej, kde sa sulfonylchlorid vyskytuje ako medziprodukt. Ten vzniká po reakcii kyseliny s komplexom trichloroacetonitriltrifenyľfosfínu ( $\text{Cl}_3\text{CCN}/\text{PPh}_3$ ) pri mikrovlnnom ohreve. Postup má vysoký

výtťažok, dobrú toleranciu k funkčným skupinám a okrem aromatických sulfonylchloridov je možné použiť aj heterocyklické a alifatické štruktúry (Kołaczek et al., 2014).

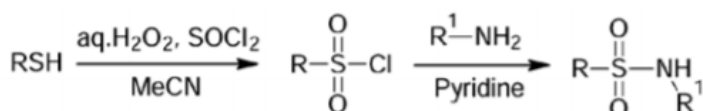
Inou cestou je syntéza cez reakciu sulfonylchloridu s kyselinou sulfinovou, čoho výsledkom je sulfónamid. Potrebná je prítomnosť aminov. Kyselina sulfinová vznikla z organokovových činidiel (napr. R-MgCl alebo R-MgBr) a oxidu siričitého.

Sulfónamidy sa dajú získať aj zo sulfénamidov premenou aminopurínsulfénamidu na aminopurínsulfónamid oxidáciou chloroperoxybenzoovou kyselinou (m-CPBA) (Kołaczek et al., 2014).

Prechodné kovy sú tiež platným spôsobom syntézy sulfónamidov. Katalyzujú reakcie C-N väzieb a sú súčasťou napríklad Buchwald-Hartwigovej reakcie. Vhodným kovom je paládium, ktoré sa zúčastňuje sulfónamidácie aryl-sulfanátov. V ešte väčšej miere sa využíva meď, a to pri N-arylácii a vzniku arylsulfónamidu za prítomnosti octanu meďnatého a kyseliny arylboritej. Meď je aj katalyzátorom kopulácie aryljodidu alebo arylbromidu s aminokyselinami. Výťažok závisí aj od typu AMK a za najvhodnejší reaktant sa javí glycín (Kołaczek et al., 2014).

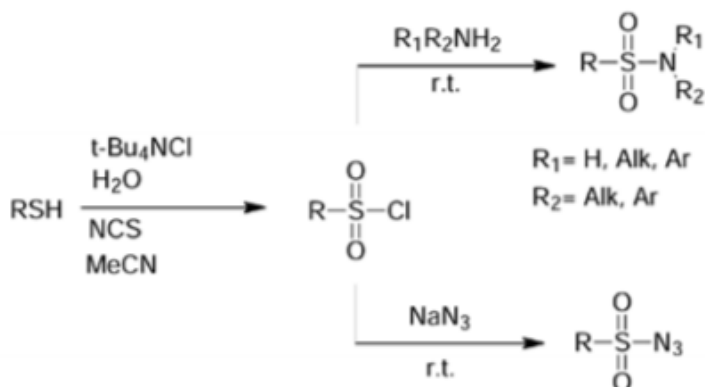
Obr. 4: Syntéza sulfónamidov z thiolov (dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/286361669\\_Biological\\_activity\\_and\\_synthesis\\_of\\_sulfonamide\\_derivatives\\_A\\_brief\\_review](https://www.researchgate.net/publication/286361669_Biological_activity_and_synthesis_of_sulfonamide_derivatives_A_brief_review))

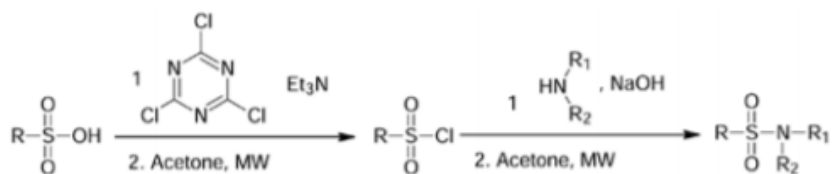


Obr. 5: Syntéza využívajúca N-chlórsukcínimid (dostupné z:

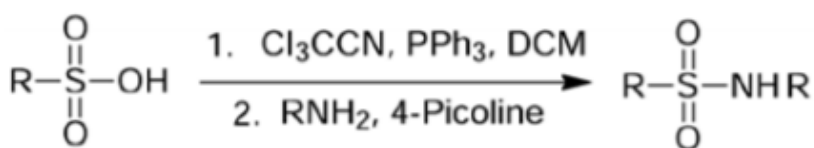
[https://www.researchgate.net/publication/286361669\\_Biological\\_activity\\_and\\_synthesis\\_of\\_sulfonamide\\_derivatives\\_A\\_brief\\_review](https://www.researchgate.net/publication/286361669_Biological_activity_and_synthesis_of_sulfonamide_derivatives_A_brief_review))



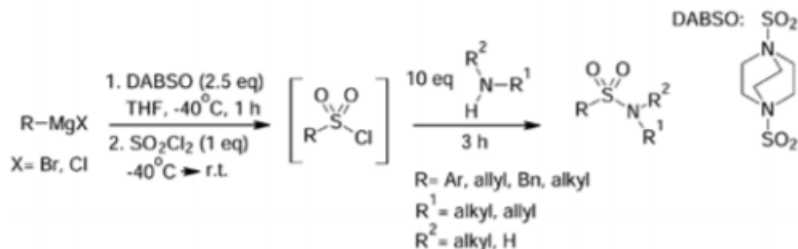
Obr. 6: Syntéza sprostředkovaná kyselinou sulfónovou (dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/286361669> Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives A brief review)



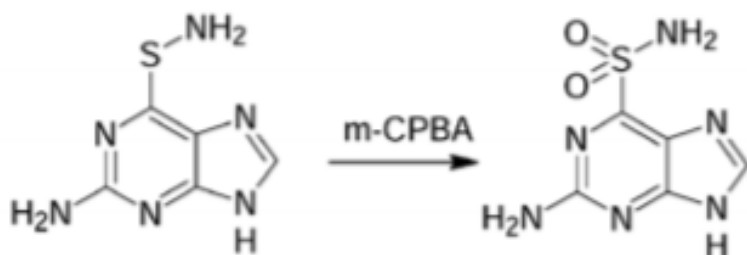
Obr. 7: Syntéza sprostředkovaná kyselinou sulfónovou (dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/286361669> Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives A brief review)



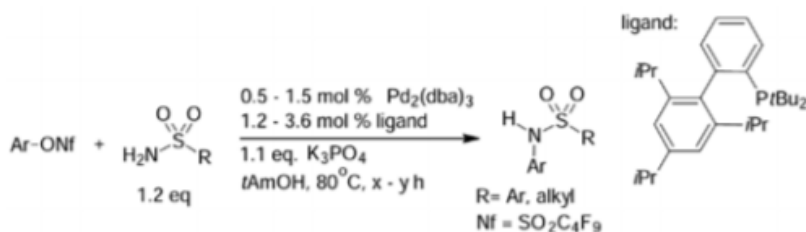
Obr. 8: Syntéza pomocí kyseliny sulfinovej (dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/286361669> Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives A brief review)



Obr. 9: Syntéza zo sulfénamidov (dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/286361669> Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives A brief review)



Obr. 10: Syntéza využívajúca prechodné kovy (dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/286361669 Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives A brief review](https://www.researchgate.net/publication/286361669_Biological_activity_and_synthesis_of_sulfonamide_derivatives_A_brief_review))



## 2.6.3 Novšie spôsoby syntézy

### 2.6.3.1 Syntéza bez využitia sulfonylchloridov

Jednou z nutných zložiek pre syntézu sulfónamidov je kyselina sulfónová. Aj napriek dlhému času od prvej syntézy a využívania sulfónamidových antibiotík nie je známy postup, ktorý by umožňoval priamu premenu kyseliny sulfónovej na sulfónamid v rámci jednej reakcie. Staršie postupy využívali sulfonylchloridy, ktoré reagovali s nukleofilnými činidlami (amínmi). Daný postup nie je veľmi praktický kvôli náročnej manipulácii a obtiažnému skladovaniu sulfonylchloridov (Caddick et al., 2004).

Alternatívou sa javia byť pentafluórphenolové sulfonáty (PFP-sulfonát), ktoré sú stabilnejšie a ako náhrada za sulfonylchloridy prinášajú výhodu vyšších výťažkov. Syntéza spočíva v reakcii štruktúry tvorenej aromatickým cyklom, sulfo skupinou a PFP-sulfonátom s amínmi vo vodnom prostredí (metanol a voda v rovnakom pomere). Uvoľňuje sa štruktúra pentafluórphenolu (Ph<sub>3</sub>P=O) (Caddick et al., 2004).

Druhou časťou syntézy je aktivácia sulfónovej kyseliny trifenylofosfín ditriflátom (Ph<sub>3</sub>P-O-Ph<sub>3</sub>P), ktorý vznikol za prítomnosti činidla Tf<sub>2</sub>O. Kladne nabitá a aktivovaná štruktúra kyseliny s Ph<sub>3</sub>P-O-Ph<sub>3</sub>P tvorí medziprodukt, ktorý obdobne ako štruktúry so sulfonylamidom reagujú s nukleofilnými činidlami. Následne sa tak za prítomnosti amínových esterov vznikajú výsledné sulfónamidy alebo ich estery. K syntéze je možné použiť okrem amínov aj primárne, sekundárne a aminokyselinové deriváty alebo anilíny. Nevýhodou je, že aktivačné činidlo kyseliny trifenylofosfín ditriflát je síce pomerne vhodné pre danú syntézu, no je ťažšie ho odstrániť po skončení reakcie (Caddick et al., 2004).

Typ soli sulfónovej kyseliny, resp. jej protiiónu, je podstatný pre konečný produkt. Pyridinové alebo trietylamínové soli sú vhodnými substrátmi syntézy, keďže sa ľahko pripravujú

a poskytujú dobrú rozpustnosť. Naopak, kovové soli tieto vlastnosti neposkytujú a nie sú dobrými reaktantmi (Caddick et al., 2004).

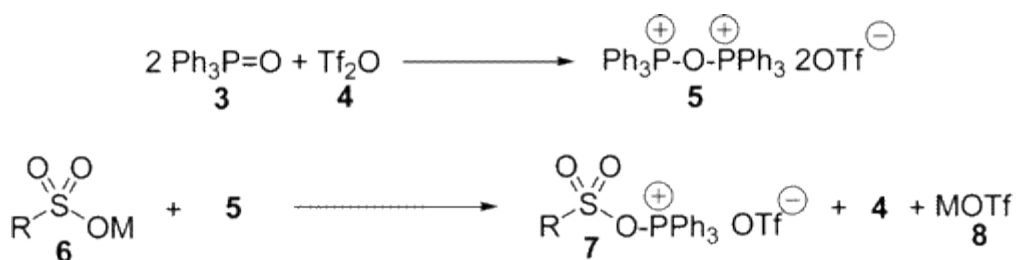
### 2.6.3.2 Syntéza za miernych reakčných podmienok

Jedným z novších a jednoduchších spôsobov tvorby sulfónamidov je syntéza prostredníctvom systému  $\text{H}_2\text{O}_2\text{--POCl}_3$ . Metóda nie je závislá na náročných reakčných podmienkach, ako starý spôsob syntézy so sulfonylchloridom, a umožňuje syntézu s väčšou efektivitou a pri laboratórnej teplote.  $\text{POCl}_3$  funguje ako ión-výmenná živica a nahrádza klasický typ katalyzátoru. Výhodou je nerozpustnosť, regenerácia a možnosť opakovaného použitia recykláciou po každej reakcii (Bahrami et al., 2012).

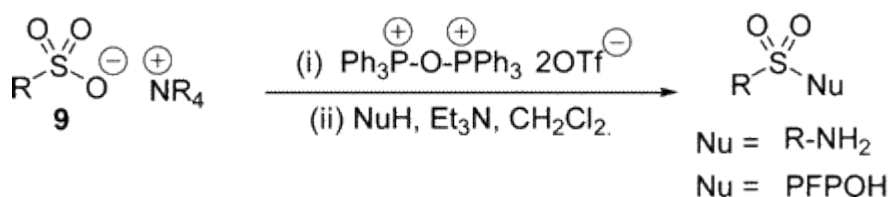
Syntéza pozostáva z reakcie amínu, thiolu s reakčným činidlom  $\text{H}_2\text{O}_2\text{--POCl}_3$  v prostredí acetonitrilu. Pre čo najvyšší výťažok je podstatný správny pomer látok, ktorý je 3:1:1:1 pre  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{POCl}_3$ , 4-methylthiofenol a 4-methylanilín. Pri použití nižších množstiev  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{POCl}_3$  alebo reakcie v prostredí s iným rozpúšťadlom než acetonitrilom (chloroform alebo toluén) bolo množstvo výsledného produktu menšie (Bahrami et al., 2012).

Syntéza sulfónamidov s reakčným systémom  $\text{H}_2\text{O}_2\text{--POCl}_3$  je výhodná okrem miernych reakčných podmienok aj vďaka vysokým výťažkom, krátkemu reakčnému času, nízkym nákladom a selektivite metódy vhodnej pre široké spektrum substrátov (aj pre slabo nukleofilné anilíny) (Bahrami et al., 2012).

Obr. 11: Aktivácia kys. sulfónovej pomocou  $\text{PPh}_3$  (dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja0397658>)



Obr. 12: Sulfonátové estery a sulfónamidy z kys. sulfónovej (dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja0397658>)



### 2.6.3.3 Syntéza na základe p-toluénsulfonylchloridu

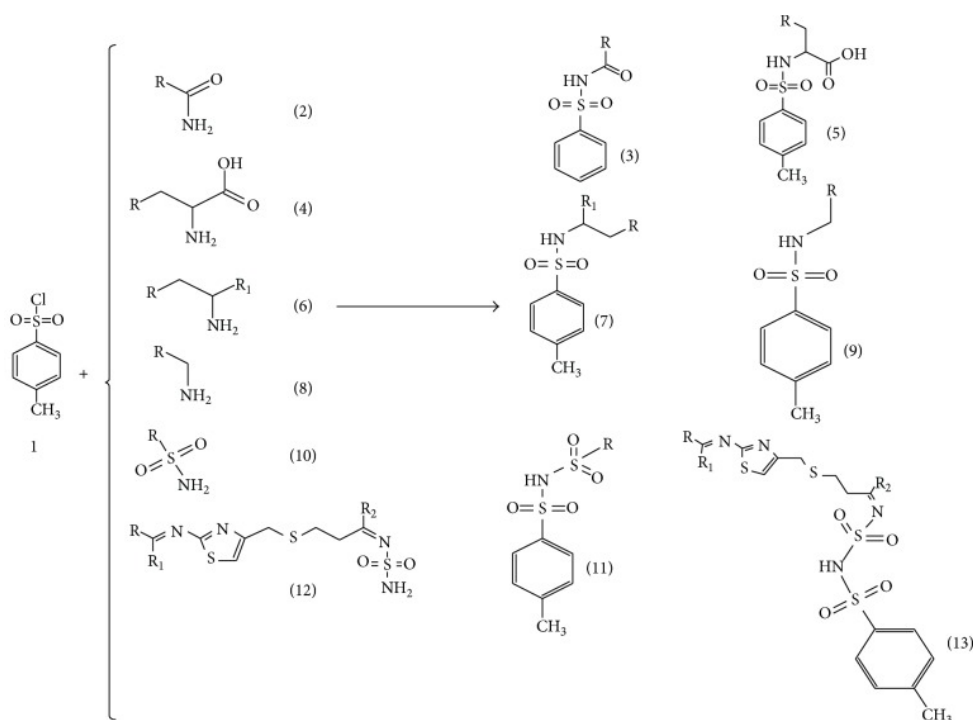
K syntéze nových sulfónamidových štruktúr je možné využiť aj derivát od klasického sulfonylchloridu, aromatický p-toluénsulfonylchlorid. Reakčné prostredie je podstatným prvkom ovplyvňujúcim priebeh syntézy a je nutné udržať zásadité vodné prostredie (pH 8-10, prítomnosti Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Samotný priebeh syntézy je pomerne jednoduchý, do banky s guľatým dnom a magnetickým miešadlom sa pridáva reaktant a p-toluénsulfonylchlorid, jeho spotrebou vzniká zrazenina a HCl, ktorá mení pH na 2-3, čo je signifikantné pre ukončenie reakcie. Zrazený produkt sa prefiltruje, rekryštalizuje (s pomocou metanolu) a vysuší prostredníctvom MgSO<sub>4</sub> (Quadir et al., 2015).

Viacero typov reaktantov vie kondenzovať s p-toluénsulfonylchloridom a tým aj výsledné spektrum produktov je pomerne široké. Reakcia môže prebiehať napríklad s karbamoylovou skupinou, karboxylovou kyselinou alebo primárnym amínom. Produkt závisí aj od typu R substituentu, ktorý je zvyčajne aromatický s atómom dusíku alebo obsahujúci aminoskupinu. Produkty sa líšia výt'azkom aj antibakteriálnou aktivitou (Quadir et al., 2015).

Najvyšší výt'azok (84,1%) dosiahol N-[(4-methylphenyl)sulfonyl]nikotínamid, ktorý vznikol reakciou s karbamoylom. Z pohľadu účinku voči baktériám sa deriváty odlišujú vo väčšej miere, keďže vykazovali rôznu aktivitu pre rôzne typy mikroorganizmov. Spomínaný sulfonylnikotínamid bol najúčinnjší u *K. pneumoniae* s MIC 62,5 µg/ml, zatiaľ čo u *E. coli* vykázal najmenšiu aktivitu (MIC >500 µg/ml). U gram pozitívnych baktérii preukázal dobré výsledky zložitý derivát sulfonylaminobenzoovej kyseliny s MIC 12 µg/ml u *S. aureus*. Žiaden z derivátov neprejavil inhibičnú aktivitu proti *B. subtilis* (Quadir et al., 2015).



Obr. 13: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom p-toluénsulfonylchloridu (dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354722/>)

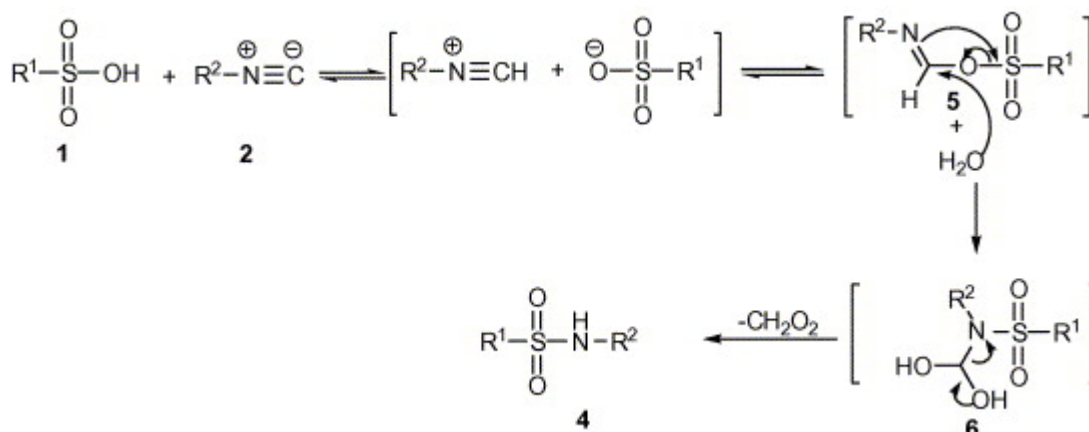


#### 2.6.3.4 Syntéza alkylových a arylových derivátov

Syntéza prebieha pomerne jednoduchou reakciou kyseliny sulfónovej (alkyl alebo arylsulfónová) s izokyanidom v prostredí dichlórmetánu a za prítomnosti vody. Zložky kyseliny, kyanidu a vody sú v rovnakom pomere a práve prítomnosť vodného prostredia je nevyhnutná pre tvorbu produktu, keďže reakcia v suchom dichlórmetáne neposkytuje výťažok.

Mechanizmus reakcie spočíva v protonizácii izokyanidu kyselinou za vzniku medziproduktu, ktorý je ochladený vodou, a po odstránení kyseliny mravčej zo štruktúry dochádza k tvorbe produktu. Reakcia nie je zatiaľ dostatočne popísaná, no ponúka výhody ako vysoký výťažok, toleranciu k funkčným skupinám a ľahkú izoláciu produktu (Shaabani et al., 2007).

Obr. 14: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom kys. sulfónovej a izokyanidu (dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403907001487>)



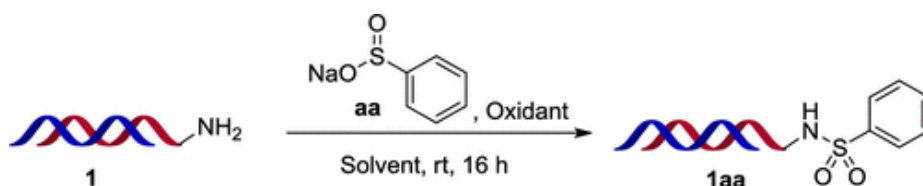
### 2.6.3.5 Syntéza väzbou na DNA

Počas deväťdesiatych rokov minulého storočia došlo k rozvoju takzvaných DEL, DNA-kódovaných chemických knižníc. Tie zahŕňajú širokú škálu látok slúžiacich pre skrining a následnú syntézu liečiv alebo látok potrebných v iných odvetviach. Základom je syntéza sprostredkovaná naviazaním východiskovej štruktúry na molekulu DNA, čo vytvára spojenie biochémie a klasických chemických metód so značným potenciálom (Liu et al., 2019).

Jedným z možných využití je práve syntéza sulfónamidov. Síce sú syntetické metódy využívajúce molekulu DNA pomerne nové, v prvých fázach sa opierali o tradičný spôsob tvorby produktu pomocou sulfonylchloridu. Sulfonylchlorid reagoval s  $NH_2$  skupinou bázy DNA za vzniku konjugátu, no postup je náročný kvôli nestabilite sulfonylchloridu vo vodnom prostredí. Taktiež nie je možná reverzná reakcia a reakcia s ďalšími amínmi (Liu et al., 2019).

Výhodnejším postupom je reakcia DNA s kyselinou sulfinovou alebo sulfinátom sodným za prítomnosti jódu, čo vedie k vzniku vo vode stabilných medziproduktov. Ako príklad môže poslúžiť reakcia dvojvláknovej DNA (dsDNA) s benzénsulfinátom sodným, ktorej produktom bol benzénsulfónamid konjugovaný s DNA. Pre čo najvyšší výtťažok je nutná modulácia pH, kde najvýhodnejšie optimum činí  $pH=9,5$  (s výtťažkom 89%). Podstatným faktorom je tiež prítomnosť jódu ako oxidantu, pričom dochádza k znižovaniu množstva produktu pri jeho menšom množstve (Liu et al., 2019).

Obr. 15: Syntéza sulfónamidov prostredníctvom DNA a sulfinátu (dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.orglett.9b03843>)



## 2.7 Príklady jednotlivých sulfónamidov

### 2.7.1 Sulfanilamid

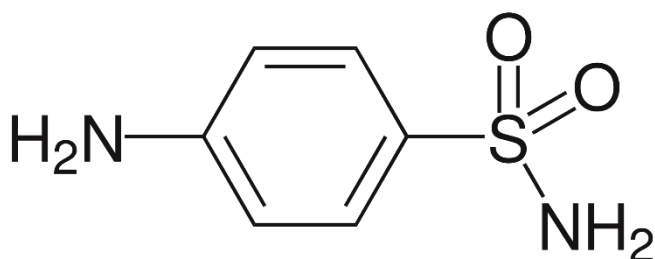
Medzi základné sulfónamidy patrí predovšetkým sulfanilamid, nazývaný taktiež sulfamín alebo Prontosil Album. Látka má organický sírny charakter a obsahuje benzénsulfónamidový zvyšok a amínovú zložku napojenú na aromatický kruh. Vďaka tomu patrí do skupiny aminobenzénsulfónamidov a štruktúrne je podobný kyseline p-aminobenzoovej, s ktorou majú rovnaký väzobný cieľ – enzým dihydropteroát syntáza. Sulfanilamid slúži ako východisková štruktúra pre ďalšie sulfónamidové produkty, ako sulfasalazín alebo sulfametoxazol (PubChem, 2020).

Liečivo je podávané zvyčajne orálne (v rozpustnej forme by vznikali alkalické soli s dráždivým účinkom pre tkanivá). Sulfanilamid je distribuovaný do väčšiny tkanív a vysokú koncentráciu dosahuje v pleurálnych alebo peritoneálnych kvapalinách, a taktiež mozgovomiechovom moku, čo bola kedysi podstatná vlastnosť v rámci liečby meningitídy. Antibiotikum má bakteriostatický účinok voči mnohým gram pozitívnym aj negatívnym baktériám, no v súčasnosti je naň tvorená rezistencia a v antibakteriálnej liečbe sa využíva minoritne. Používa sa miesto rôznych močových antiseptík, no kvôli nedostatočnému účinku na *Enterococcus faecalis* ich nemôže úplne nahradiť.

Z vedľajších účinkov liečiva sa prejavujú napr. zápal kože alebo sliznice, nevoľnosť až hnačka a podieľať sa môže na vzniku aplastickej anémie (Cunha, 2020; Helmholtz, 1937).

Sulfanilamid je pevnou práškovou látkou bielej farby, rozpustnou vo vode a hodnotami pH v mierne kyslej škále (pH 5,8 – 6,1 pre vodný roztok). Látka má molekulovú hmotnosť 172,21 a nulový formálny náboj (PubChem, 2020). Liečivo sa vstrebáva primárne v črevnej sliznici, no k absorpcii dochádza aj v pošve. Vylučovanie prebieha najmä močom, prípadne stolicou alebo žlčom, a je závislé od funkčnosti obličiek.

Obr. 16: Sulfanilamid (dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfanilamide>)



### 2.7.2 Sulfametoxazol

Sulfametoxazol patrí taktiež do skupiny aminobenzénsulfónamidov a je možné ho syntetizovať zo sulfanilamidu. Ide o zlúčeninu izoxazolu obsahujúcu aminobenzénsulfónamidovú zložku a metylový substituent. Látka je známa aj pod názvom gantanol.

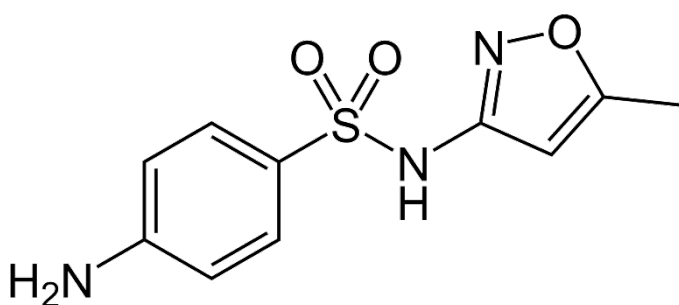
Liečivo sa často kombinuje s trimethoprimom, čo zvyšuje účinok. Spolu tvoria antibiotikum Bactrim. Využitie spočíva, podobne ako u sulfanilamidu, v liečbe zápalov močového traktu spôsobeného baktériami *E. coli*, *Proteus mirabilis* alebo *Klebsiella sp.* a *Enterobacter sp.* K účinku stačí použitie len jednej účinnej látky a nie je nutné aplikovať zmienený Bactrim. Spojenie sulfametoxazolu a trimethoprimu je oproti iným antibiotikám výhodnejšie aj v prípade liečby infekcie stredného ucha (u detských pacientov). Účinok sa prejavuje proti baktériám *Streptococcus pneumoniae*, no dlhodobá a opakovaná liečba nie je odporúčaná. *Streptococcus pneumoniae* spôsobuje aj zápal dýchacích ciest a sulfametoxazol je tak vhodný pri liečbe bronchitídy. V rámci infekcii dýchacích ciest sa uplatňuje aj pri pneumónii, najmä u pacientov s oslabenou imunitou. Využitie opäť zahŕňa uretrálne ťažkosti vyvolané *Chlamydia trachomatis* (PubChem, 2020).

Väčšina nežiadúcich účinkov sulfametoxazolu sa prejavuje kožnými ťažkosťami, ako vyrážka alebo Stevens-Johnsonov syndróm, prípadne epidermálna nekrolýza. Závažnejšími problémami sú trombocytopenia a leukocytárna nedostatočnosť, čo môže viesť k zvýšeným krvávacým stavom a zhoršeniu hojenia poranení. Počas medikácie sulfametoxazolom tak nie sú vhodné dentálne zákroky. Ako vedľajší účinok sa môže prejavovať aj hemolýza u pacientov s nedostatkom enzýmu glukóza-6-fosfodehydrogenáza. Antibiotikum je schopné vyvolávať aj nepriaznivé imunitné reakcie doprevádzané zvýšenou hladinou IgG protilátok. Imunogenicitu sa spája najmä s niektorými metabolitmi, ako nitrózo-sulfametoxazol. Počas metabolizácie

zároveň dochádza k ich rýchlej redukcii, čo tento nežiadúci vplyv kompenzuje (PubChem, 2020).

Sulfametoxazol má molekulovú hmotnosť 253,28 a vzorec  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ . Látka je tvorená vo forme prášku bielo-žltej farby rozpustného vo vode. Liečivo sa rýchlo vstrebáva a maximálna koncentrácia (57,4 – 68,0  $\mu\text{g/ml}$ ) je dosiahnutá už po 1 – 4 hodinách. Vylučovanie prebieha obličkami a 20% sulfametoxazolu je v moči v nezmenenej podobe, 50-70% ako acetylovaná forma a zvyšok zodpovedá glukuronidovému konjugátu (PubChem, 2020).

Obr. 17: Sulfametoxazol (dostupné z: <https://sk.wikipedia.org/wiki/Sulfametoxazol>)



### 2.7.3 Sulfadoxín

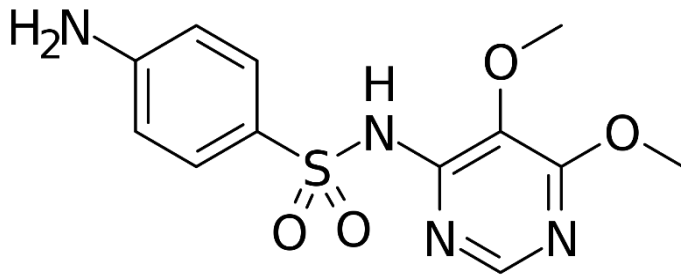
Sulfadoxín je širokospektrálne antibiotikum s dlhotrvajúcim účinkom. Známy je tiež pod názvom sulformetoxín a patrí do skupiny aminobenzénsulfónamidov. Typickou súčasťou štruktúry je prítomnosť pyrimidínu a dvoch metoxy substituentov.

Využitie spočíva v liečbe infekcii močového traktu a taktiež malárie, v ktorej prípade sa kombinuje s pyrimetamínom. Kombinácia liečiv je vhodná aj ako prevencia pred cestou do rizikových krajín a pre pacientov alergických na chlorochín (PubChem, 2020).

Z pohľadu malárie sú jednou z najrizikovejších skupín tehotné ženy, keďže u nich dochádza k modulácii imunitnej odpovede a možnému hromadeniu parazitických plazmódii v placentе. Taktiež je riziku vystavený aj plod. Tehotenstvo zároveň ovplyvňuje vstrebávanie a metabolizáciu liečiv, preto je pri sulfadoxíne dôležité poznať farmakokinetické správanie. Medzi ovplyvňujúce faktory patrí napríklad vyššia funkčnosť obličiek (urýchlené odbúravanie lieku), zvýšená alebo znížená činnosť metabolizujúcich enzýmov alebo menšia prítomnosť plazmatického albumínu (väzba liečiva) (Kock et al., 2017).

Látka s molekulovou hmotnosťou 310.33 je neutrálna a vo vode prakticky nerozpustná. Vylučovanie sulfadoxínu prebieha prevažne obličkami (70%) a hodnoty clearance sú počas tehotenstva vyššie než u pyrimetamínu, no po ukončení gravidity je stav opačný a u sulfadoxínu dochádza k trojštvrťinovému zníženiu clearancu (Kock et al., 2017).

Obr. 18: Sulfadoxín (dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfadoxine>)



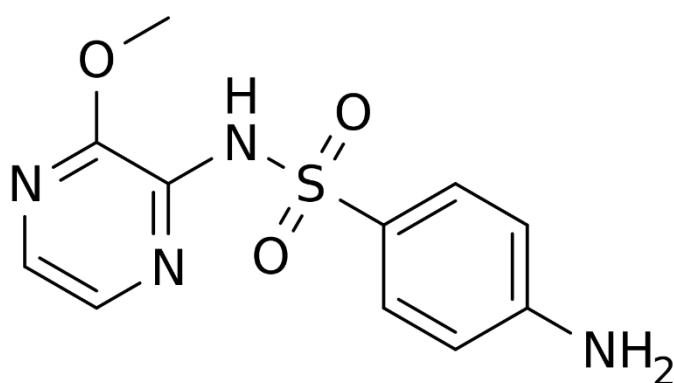
#### 2.7.4 Sulfalén

Sulfalén, alebo taktiež sulfametopyrazín, je antibiotikum s dlhotrvajúcim účinkom zo skupiny benzénsulfónamidov. Vhodný je k medikácii niektorých infekcií, ako sú bronchitída a zápaly močovej sústavy, a taktiež ako v prípade sulfadoxínu, aj k liečbe malárie. Sulfalén patrí do skupiny sulfónamidov s ultra dlhodobým účinkom a poznanie farmakokinetiky je podstatné pre správne nastavenie liečby. Antibiotikum sa odbúrava pomaly a po dlhú dobu vykazuje v organizme účinok, čo by mohlo pri nesprávnom dávkovaní viesť k jeho akumulácii a prípadným toxickým účinkom (Kholodov et al., 1978).

Vplyv na farmakokinetické vlastnosti majú vonkajšie faktory, ako napríklad príjem potravy, tak aj genetické predispozície pacienta. Rozdiely boli viditeľné v hodnotách maximálnej koncentrácie a času potrebného pre jej dosiahnutie. Zaznamenaný bol rozptyl hodnôt, kde sa maximálna koncentrácia pohybovala v rozmedzí 39,6 - 79,8 µg/ml a čas po dosiahnutí činil 3,5 - 6,8 hodín. Výrazný rozdiel nastal pri podaní lieku po jedle, kde sa maximálna koncentrácia znížila na 25,0 až 59,7 µg/ml a čas nutný k jej dosiahnutiu vzrástol na 5,2-17,8 hodín. Spomalenie procesu absorpcie potravou je daný väzbou sulfalénu na proteíny, ktoré sú v nej prítomné, a tým dochádza k zníženiu voľnej (aktívnej) zložky liečiva schopnej vstrebávania. Potrava tiež spomaľuje rozpúšťanie liečiva.

Sulfalén má molekulovú hmotnosť 280.31 (PubChem, 2020) a disponuje značne dynamickou farmakokinetikou ovplyvnenou vonkajšími faktormi, no naproti tomu sa genetické vplyvy s ohľadom na absorpciu liečiva prejavujú minimálne. Uplatňujú sa až v prípade jeho eliminácie a vylučovania, ktoré prebieha obličkami a v prevažne acetylovej forme. Práve proces acetylácie je podstatný, keďže funkčnosť N-acetyltransferázy, enzýmu podmieňujúcej tento proces, je geneticky daná (Kholodov et al., 1978).

Obr. 19: Sulfalén (dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfalene>)



### 2.7.5 Kotrimoxazol

Kotrimoxazol patrí do skupiny potencovaných sulfónamidov, kombinácie klasického sulfónamidu s ďalšou účinnou látkou. V tomto prípade vzniká liečivo spojením sulfamethoxazolu a trimethoprimu. Látka má pomerne široké uplatnenie, keďže je typom širokospektrálneho antibiotika. Primárnym cieľom účinku liečiva je inhibícia tvorby tymidínu, ktorá vplyva proti gram pozitívnym aj negatívnym mikroorganizmom, anaeróbnym baktériám, chlamýdiám alebo mykobaktériám či prvokom (Guerra et al., 1983; Wormser et al., 1982).

Jedným z klasických uplatnení sú infekcie močových ciest, keďže antibiotikum účinkuje proti baktériám typu *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.* a *Escherichia coli*. Práve *E. coli* je najčastejším pôvodcom infekcie močovej sústavy u žien (Peschers et al., 2001; Mermin et al., 2005).

Antibiotikum sa taktiež podáva predoperačne ako protiinfekčné opatrenie, napríklad v rámci náročných zákrokov kolorektálnej chirurgie. Prínosné je aj pri liečbe zápalov kostí a kĺbov

(napr. chronická osteomyelitída) spôsobených gram pozitívnymi kokmi, kde kvôli rezistencii zlyhávajú iné typy antibiotík. Ďalej sa indikuje pri enterickej horúčke, kvapavke alebo zápaloch v oblasti nosa a uší, spôsobených *Haemophilus influenzae*,

Aj napriek širokej škále pôsobnosti sa kotrimoxazol podáva ako antibiotikum prvej voľby iba pri infekcii baktériami *Pneumocystis carinii* (Higgins et al., 1980; Nguyen et al., 2009; Wormser et al., 1982).

Kotrimoxazol má potenciál pomôcť s epidemiologickou situáciou v rozvojových krajinách Afriky, kde mnoho ľudí zomiera v dôsledku vírusu HIV. Antibiotikum je prostriedkom v liečbe pridružených infekcií spôsobených *Mycobacterium tuberculosis* alebo hnačkovými patogénmi. Aspoň čiastočné zníženie počtu infekcií u HIV pozitívnych osôb vie zároveň dopomôcť k obmedzeniu šírenia chorôb v rámci rodiny a komunity. Taktiež sa zaznamenal menší prenos malárie, ktorou sú HIV infikovaní viac ohrození. Nevýhodou sa javí zvýšené riziko vzniku rezistencie baktérii ku kotrimoxazolu vzniknutej nadmerným používaním antibiotickej medicíny (Mermin et al., 2005; Mwaungulu et al., 2003).

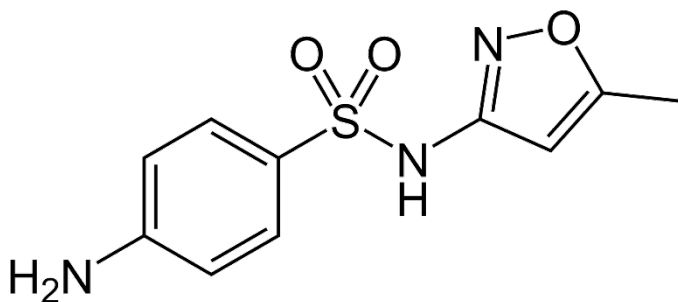
V štúdií z Tanzánie sa preukázala rezistencia baktérii u 75% izolátov od pacientov s HIV a až 81,3% izolátov u profylakticky liečených pacientov s HIV. Pozorované rezistentné baktérie boli najmä *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* (Marwa et al., 2015).

Antibiotikum sa podáva perorálne s prevahou sulfametoxazolu (800mg, trimethoprim 160mg) a maximálna koncentrácia v krvi dosahuje 1-2 mg/ml trimethoprimu a 30 až 50 µg/ml sulfametoxazolu (voľnej zložky). Trimethoprim je zároveň viac distribuovaný telesnými tkanivami než sulfametoxazol, čím vzniká široký rozsah pomerov koncentrácií trimethoprim:sulfametoxazol. Koncentrácia trimethoprimu v tkanivách a tekutinách ako sliny, intracelulárna tekutina alebo pľúcne tkanivo je vyššia než plazmatická, zatiaľ čo u sulfametoxazolu sú hodnoty nižšie než v krvi. Polčas rozpadu je u oboch zložiek podobný (9 hodín pre sulfametoxazol a 11 hodín u trimethoprimu), no prvý menovaný sa vylučuje obličkami metabolizovaný, zatiaľ čo trimethoprim v nezmenenej forme (Wormser et al., 1982).

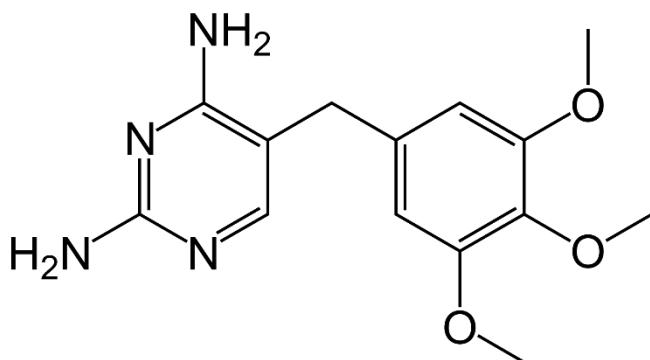
Vedľajšími účinkami kotrimoxazolu bývajú vyrážky a tráviace ťažkosti, no vyskytnúť sa môžu aj hematologické komplikácie typu trombocytopenia, anémia alebo eozinofília. Prejavujú sa len v malom množstve prípadov a u pacientov s pridruženými ťažkosťami (nedostatok vitamínu B12, porucha obličiek) (Wormser et al., 1982).



Obr. 20: Sulfamethoxazol (dostupné z: <https://sk.wikipedia.org/wiki/Sulfametoxazol>)



Obr. 21: Trimethoprim (dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Trimethoprim>)



## 2.8 Liečba nebakteriálnych patológií

Sulfónamidové antibiotiká patria medzi prvé liečivá, ktoré započali boj proti mikroorganizmom, a patrili medzi základnú súčasť novej antibakteriálnej éry ľudstva, kde aj menšie infekcie už nemuseli znamenať lotériu so smrťou. Avšak počas ďalších rokov a desaťročí vývoja a skúmania sa podarilo využiť široké možnosti flexibilnej chemickej štruktúry týchto látok, čo znamenalo úspešné využitie aj v iných medicínskych disciplínach, než bolo ich prvotným účelom. A i keď je medicína a terapeutické využitie základom úspechu sulfónamidov, ich prítomnosť siaha aj do iných vedných disciplín a hospodárskych odvetví (Yousef et al., 2018).

Z hľadiska nebakteriálneho použitia, zostávajúce stále v oblasti medicíny, sú látky so sulfónamidovým základom využívané pri liečbe diabetu, vysokého krvného tlaku, ako

imunosupresíva alebo antiarytmický konštrukt, a taktiež majú potenciál potláčať aktivitu HIV vírusu.

Druhou kategóriou je využitie mimo sféru ľudskej medicíny, kde sa dajú sulfónamidové látky nájsť ako pesticídy alebo veterinárne prípravky (Yousef et al., 2018).

### **2.8.1 Liečba diabetu**

Diabetes melitus je široko rozšírené generačné ochorenie postihujúce milióny ľudí v rôznych vekových kategóriách, čo je dobrý dôvod snažiť sa nájsť čo najviac prostriedkov vhodných k liečbe metabolického ochorenia. Prvotné pokusy so sulfonylmočovínami siahajú do tridsiatych rokov minulého storočia, no až v päťdesiatych rokoch sa preukázal priaznivý vplyv sulfónamidov proti diabetu. Prvým liečivom bola 1-butyl-3-sulfonylmočovina, no prejavovala sa taktiež aj negatívnym účinkom na kostnú dreň, preto vývoj ďalej pokračoval v snahe o syntézu liečiv s menšími nežiadúcimi účinkami (liečivá typu glyburid a glipizid).

Základom bolo, aby zlúčeniny stimulovali tvorbu inzulínu pankreasom, konkrétne beta bunkami a výskum sa tak zameriaval na diabetes druhého typu. Mechanizmus sa viaže k aktívnemu miestu, ktoré je v draslíkových iónových kanáloch, a funkčnosť je daná štruktúrou vychádzajúcou zo základnej molekuly sulfónamidu, kde bola nahradená R skupina -CO-NH-R zložkou (Gao et al., 2016; Berredjem et al., 2015; Wexler, 2020; Yousef et al., 2018).

Pre pochopenie mechanizmu účinku liečiv je dôležité porozumieť fungovaniu pankreasu a prítomných beta buniek zodpovedných za tvorbu inzulínu. Práve beta bunky obsahujú draslíkový kanál citlivý pre väzbu ATP, a to vedie k regulácii uvoľňovania inzulínu. Podstatnou súčasťou K-ATP kanálu je sulfonylmočovínový receptor SUR1, citlivý práve na sulfonylmočovinu. Pri väzbe sulfonylovej látky dochádza k prítoku iónov vápnika a sekrécii inzulínu (na základe zmeny pokojového potenciálu). Výsledkom je zvýšená citlivosť beta buniek na podnety glukózového aj neglukózového typu a zvýšená tvorba inzulínu (Gao et al., 2016; Berredjem et al., 2015; Wexler, 2020; Yousef et al., 2018).

V súčasnosti sa stále k liečbe používajú liečivá na báze sulfanylmočoviny, inhibítory glykozidázy alebo thiazolidíndióny, no taktiež sú prítomné vedľajšie účinky (ako napríklad hyperglykémia, hepatotoxicita alebo bolesti brucha) a zníženie účinnosti pri dlhodobom užívaní. Preto sa štúdie zameriavajú na nové deriváty sulfónamidov, ktoré vykazujú menšie negatívne vplyvy a pôsobia iným mechanizmom.

Známe sú nové liečivá ako sitagliptín alebo vildagliptín, ktoré inhibujú DPP-4 (dipeptidylpeptidáza 4). Dipeptidylpeptidáza 4 je zodpovedná za štiepenie glukagónu podobného peptidu 1 (GLP-1) na neaktívnu formu, ktorá nemá vplyv na hodnotu inzulínu. Ak však dôjde k potlačeniu účinku dipeptidylpeptidázy, hormón GLP-1 zostáva účinný a stimuluje tvorbu inzulínu. Účinok liečiva je tak selektívny (Gao et al., 2016; Berredjem et al., 2015; Wexler, 2020; Yousef et al., 2018).

### **2.8.2 Sulfónamidy ako antidepresívum**

Do skupiny ťažko liečiteľných chorôb, pri ktorých len postupne odhaľujeme príčiny a mechanizmy stojacimi za patológiou, patria psychické poruchy. Základom býva chemická nerovnováha v mozgovom tkanive a poruchy na úrovni neurotransmitérov. Aj v tejto oblasti by mohli mať úspešné uplatnenie liečivá vychádzajúce zo sulfónamidov, resp. ich deriváty. Niektoré z novších štúdií sa zamerali na liečbu porúch ako sú depresívna porucha (MDD – major depressive disorder), bipolárna porucha alebo schizofrénia. Podkladom výskumu bola multitargetová stratégia, ktorá sa zamerala na viacero typov nervových receptorov. Konkrétne cieľila na receptory sérotonínu a dopamínu ako sú 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, D<sub>2</sub> alebo D<sub>3</sub>.

Samotné receptory sú dôležitým regulačným mechanizmom nie len pre aktivitu mozgu, ale podieľajú sa aj na ovplyvňovaní cirkadiálnych rytmov, telesnej teploty, relaxácie hladkého svalstva mozgových tepien a taktiež na zápalových procesoch v mozgu (Benhamú et al., 2014; Kołaczkowski et al., 2006; Zajdel et al., 2013).

Účinok na receptory bol zmiešaný a dala sa pozorovať vysoká afinita k 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>2A</sub> a zároveň nízka ku D<sub>2</sub> časti. Liečivá sa správali ako antagonisti k daným receptorom (najmä 5-HT<sub>7</sub>), čo viedlo k ich antidepresívnym a anxiolytickým účinkom. Antagonisti vychádzajú zo štruktúr ako sú chinolínové a izochinolín-sulfónamidové deriváty arylpiperazínov s chlórphenylpiperazínovými zvyškami. Z chemického hľadiska je dôležitá prítomnosť sulfónamidovej väzby, ktorá sa nachádza v pyridínovom kruhu chinolínu, a z terapeutického 7-chinolínový fragment, keďže je najpriaznivejší pre interakciu so sérotoninovým receptorom (dané usporiadanie vykazuje najvyšší antidepresívny účinok) (Benhamú et al., 2014; Kołaczkowski et al., 2006; Zajdel et al., 2013).

Štruktúra týchto receptorov, konkrétne terciárna, nie je doteraz úplne objasnená, čo znemožňovalo efektívny vývoj ligandov. Až po začiatku nového tisícročia došlo vďaka molekulárnemu modelovaniu k vytvoreniu vhodných štruktúr, čo napomáha vývoju

antidepresív na báze sulfónamidov. Pre porovnanie, výskum liečiv pre diabetes a hypertenziu započal už v polke minulého storočia (Benhamú et al., 2014; Kołaczkowski et al., 2006; Zajdel et al., 2013).

### 2.8.3 Liečba rakoviny

Síce sú diabetes alebo hypertenzia pomerne nebezpečnými a v populácii dosť rozšírenými patológiami, jednou z najväčších obáv súčasnosti je rakovina a jej liečba. Ochorenie postihuje rôzne tkanivá a týka sa všetkých krvných buniek, preto neexistuje univerzálny spôsob, ako ju poraziť. Poznáme len špecifické metódy pre konkrétne typy rakoviny alebo všeobecné metódy, typu chemoterapia, ktoré ale postihujú aj zdravé bunky. Sulfónamidy majú potenciál terapeuticky pôsobiť na enzýmy vyskytujúce sa v malígnom procese, ako sú proteázy a-chymotrypsín alebo ľudská leukocytárna elastáza (HLE, human leukocyte elastase) (Reddy et al., 2004).

K inhibícii týchto enzýmov sa v štúdiách uplatnili kumarínové preparáty, konkrétne kumarín-3-karboxamidy, a taktiež arylsulfónanilidy. Z nich boli syntetizované nové zlúčeniny obsahujúce sulfónamidovú zložku - kumarín-3-sulfónamid. Proces syntézy spočíval v zlúčení metyl-2-chlórsulfonyl-acetátu s aromatickým amínom, čo viedlo k vzniku metyl-anilinosulfonylacetátu, ktorý následne hydrolýzou poskytol kyselinu anilinosulfonyloctovú. Jej spojením so substituovanými salicylaldehydmi v prostredí kyseliny octovej a prítomnosti benzylamínu ako katalyzátoru sa získali kumarín-3-sulfónamidy.

Mechanizmus účinku spočíval v aktivovaní signálnej dráhy kinázy Jun - JNK 1 (c-Jun terminálna kináza) - čo viedlo k hyperfosforylácii niektorých aminokyselín a následnej inhibícii rastu problémových buniek (Reddy et al., 2004).

Katepsíny sú vo veľkej miere zastúpené proteolytické enzýmy, ktoré sa podieľajú na odbúravaní proteínov alebo aj predkladaní antigénov. Vplyv uplatňujú v rámci patológie, kde sú jednou z príčin svalovej dystrofie, Alzheimerovej choroby alebo roztrúsenej sklerózy, no taktiež aj rakoviny (široko distribuovaný katepsín L). Práve pri rakovinovom bujení dochádza k poruche ich regulácie a stávajú sa mitogénnymi. Preto sa výskum zameriava aj na inhibíciu katepsínu L, kde sa pozitívne uplatnili sulfónamido-1 -kyanopyrolidinylové deriváty (Horn a kol., 2014; Supuran et al., 2003).

Komplexný pohľad na systém inhibície rakovinovej proliferácie nám poskytujú liečiva, ktoré ovplyvňujú samotný bunkový cyklus poškodených buniek. Bránia prechodu z G1 fázy do

syntetickej, alebo z G2 do mitotickej fázy. Pôsobia vplyvom zastavenia polymerizácie tubulínu, čo je nutný proces k deleniu bunky, alebo inhibíciou nukleárneho transkripčného aktivátora NF-Y či enzýmu karboanhydrázy (Abbate et al., 2004).

Momentálne úspešne testovanou látkou v klinickom výskume je 3-chloro-7-indolyl-1,4-benzéndisulfónamid, známy pod skratkou E7070. Podľa doterajších výskumov sa E7070 radí k najsilnejším sulfónamidom, ak ide o antitumorový vplyv, a významná regresia sa prejavila u nádorov hrubého čreva (veľmi častý kolorektálny karcinóm) alebo pľúc. Účinok liečiva je daný blokáciou cyklínu E a CDK2 (cyklín dependentná kináza), čím bráni prechodu z G1 do S fázy. Taktiež sa preukázala schopnosť blokovat' cyklín A, B1 a činnosť CDK2 tým, že indukoval regulačné proteíny p53 a p21. Z toho vyplýva, že má potenciál ovplyvňovať bunkový cyklus na vyššej úrovni a vo viacerých kontrolných oblastiach (Abbate et al., 2004).

Cestou ako brániť nádorovému bujneniu môže byť taktiež ovplyvňovanie mikroprostredia nádoru. To je vplyvom CA enzýmov okysľované, čomu sa dá zabrániť ich inhibíciou, a tým modulovať pH mikroprostredia. Ako prostriedok k modulácii je možné použiť E7070 v spojení s klasickými sulfónamidovými liečivami ako acetazolamid a metazolamid (Abbate et al., 2004).

#### **2.8.4 Antiretrovirotický účinok**

Keď sa spomína boj proti rakovine ako jeden z najväčších strašiakov a výziev súčasnej medicíny, podobné tvrdenie platí aj o víruse HIV a snahe nájsť účinný spôsob liečby. Keďže samotná eradikácia by znamenala náročný, ak nie nemožný proces, a prevencia je na každého osobnej zodpovednosti, je jedinou možnosťou, ako byť v tomto boji úspešný, nájsť účinný prostriedok liečby. I keď prítomnosť neponúka možnosť úplného vyliečenia (ak nerátame transplantáciu kostnej drene od darcu s rezistenciou voči HIV), je jedinou možnosťou tlmiť následky ochorenia a dostať vírus pod kontrolu (Loh et al., 2010).

Momentálne existujú prístupy v zabránení infekcii buď potlačením samotného vírového pôvodcu, alebo liečba na úrovni hostiteľa – bunky. Prvý prístup, ktorý využíva napr. inhibíciu vírových enzýmov, je viac preskúmaný a využíva sa vo väčšej miere, no v úspechu mu bráni rýchla mutácia HIV, ktorý sa tak stáva rezistentným pre dané liečivo. Problémom sú aj nežiadúce účinky týchto terapeutík. Druhý typ liečby, ktorý je založený na ochrane bunky (napr. chemokinových receptorov), býva zatiaľ skôr doplnkový. Stretávame sa pri ňom či už s bránením vstupu infekčného agens do bunky alebo inhibíciou replikácie (Loh et al., 2010).

V rámci štúdií sa testovali izoxazolidíny obsahujúce sulfónamid (alebo sulfonát), heterocyklickú kostru a dva reťazce R1 a R2 s rozmanitým spektrom substituentov (celkovo sa tak testovalo devätnásť podobných zlúčenín). Účinok látok bol zameraný na zabránenie replikácie vírusu. Najväčšiu antiretrovírusovú aktivitu vykazali 3-(4-bromophenyl)-2-methyl-N-(4-methylbenzyl)-1,2-oxazolidín-4-sulfónamid, 3-(2-bromophenyl)-2-methyl-N-(4-methylbenzyl)-1,2-oxazolidín-4-sulfónamid a 3-(2-chlorophenyl)-2-methyl-N-(4-methylbenzyl)-1,2-oxazolidín-4-sulfónamid, kde sa s priaznivým inhibičným účinkom prejavila aromatická zložka. Naopak, izoxazolidín s prítomným alylsulfónamidom nevykazoval žiadnu aktivitu (následne sa používal ako negatívna kontrola). Významným prvkom v úspechu je aj prítomnosť halogénu, najvyššiu aktivitu zaznamenali látky obsahujúce jód. Priaznivým náznakom je schopnosť týchto látok inhibovať replikáciu okrem modelového HIV vektoru aj priamo na „divokom“ type HIV (wild-type), a taktiež, že neboli toxické pre hostiteľskú bunku (minimálne po dobu 24 hodín) (Loh et al., 2010).

Naopak, nevýhodou je, že liečivá len bránia množeniu a expresii vírusu, no nedokázali zabrániť prvotnému vstupu a reverznej transkripcii v jadre bunky. Čo sa štruktúry týka, bolo preukázané, že najvyššiu aktivitu mali liečivá s prítomným aromatickým kruhom substituovaným halogénovým prvkom, kde bola podstatná aj poloha substitúcie (Loh et al., 2010).

Tam, kde zlyhali izoxazolidínové liečivá v inhibícii reverznej transkripcie HIV, by mohli uspieť látky so štruktúrou indolu. Preukázalo sa, že 5-chlór-3-(fenylsulfonyl)-indol-2-karboxamid má schopnosť plniť funkciu NNRTI (nenukleozidové inhibítory reverznej transkriptázy). Dominantným prvkom účinku sú atómy kyslíku prítomné v sulfónovej časti (udržiavajú enzymatickú aktivitu) (Siberry, 2018; Zhao et al., 2008).

Proces reverznej transkripcie, teda časť cyklu života HIV, voči ktorej izoxazolidínové liečivá cieľia účinok, je založená na premene a začlenení (prenose informácie) z vírovej RNA do bunkovej DNA (vzniká komplementárna cDNA).

NNRTI sú liečivá zabezpečujúce zastavenie elongácie DNA pri jej syntéze, a to prostredníctvom väzby na enzymatický systém reverznej transkriptázy (konkrétne na katalytické miesto). Nevýhodou je možná toxicita a pomerne rýchla tvorba rezistencie.

Liečivá boli pripravené z indolu prevedením na sulfonylchlorid a následne na sulfónamid (za väčšieho množstva prítomnosti amínov). Ďalšími reakciami a substitúciami bol syntetizovaný

indol-3-pyrolidínsulfónamid. Podobne ako v prípade izoxazolidínov, aj v prípade indolov zvyšuje aktivitu prítomnosť halogénu (najmä chlór) alebo CN skupiny (Siberry, 2018; Zhao et al., 2008).

### **2.8.5 Herbicídy**

Využitie sulfónamidov siaha aj do hospodárskeho odvetvia. Prítomnosť parazitických tráv a burín môže byť problémom pri efektívnom hospodárskom pestovaní s dostatočným výťažkom. Každá metóda, ktorá vie tieto faktory podporiť a zároveň nie je škodlivá pre životné prostredie, je vítaná.

Látky zo skupiny triazolopyrimidínsulfónamidov sa preukázali ako vhodný prostriedok pre ochranu hospodárskych rastlín. Ide o herbicídy a inhibítory acetolaktát syntázy (ALS herbicídy), ktoré vedia potlačiť rast tráv a burín, ale aj húb a baktérii. Účinok je daný inhibíciou enzýmu ALS – enzým podporujúci proteosyntézu (syntézu rozvetvených aminokyselín). Enzým podporuje delenie rastlinných buniek, no zároveň nemá vplyv na fotosyntézu alebo syntézu nukleových kyselín bunkou. Dochádza ku akumulácii sulfónamidových derivátov v alkalických častiach bunky, teda mieste, kde sa enzým nachádza. V konečnom dôsledku sú ovplyvnené inhibíciou buniek rastové body prítomné v koreňoch, čím je inhibícia efektívna a rast burín spomalený alebo potlačený (Jabusch a Tjeerdema, 2005; Russell et al., 2002).

Výhodou je, že sa nepreukázal nepriaznivý vplyv na cicavce a ľudí, no na druhú stranu, pri nekontrolovanom používaní by mohlo dôjsť k ohrozeniu iných (chránených) typov rastlín (Jabusch a Tjeerdema, 2005; Russell et al., 2002).

## **2.9 Testovanie mikrobiálnej citlivosti**

### **2.9.1 Všeobecná charakteristika**

Vplyv antibiotík a ich účinnosť voči rôznym druhom mikroorganizmov sa testuje uceleným postupom známym ako AST – testovanie mikrobiálnej citlivosti. AST je ucelenou a normovanou metodikou zahŕňajúcou viacero postupov a médií pre testovanie inhibície antibiotikami. Testovanie mikrobiálnej citlivosti je využívané vo výskumnej sfére pri vývoji a testovaní samotných antibiotík a sledovaní citlivosti, prípadne rezistencie baktérii, kde sa odhaduje pravdepodobnosť jej vzniku (Bayot a Bragg, 2020; Mercer et al., 2020).

V predklinickom výskume zároveň slúži ku skríningu vhodných kandidátov pre ďalšie testovanie a následne k simulovaniu telesného prostredia prostredníctvom vhodného kultivačného média. Taktiež sa využíva v klinickej oblasti, kde slúži ako prostriedok k určeniu správnej liečby pacientov na základe voľby najvhodnejšieho typu antimikrobiálnej medicíny, keďže dôležité je nie len poznanie patogénu, ale aj prostriedku, ktorý voči nemu účinkuje (Bayot a Bragg, 2020; Mercer et al., 2020).

Princípom AST je sledovanie MIC, teda minimálnej inhibičnej koncentrácie. Hodnota MIC vyjadruje minimálnu koncentráciu zlúčeniny, ktorá inhibuje rast mikroorganizmov, prípadne vedie k ich úhynu. Pre stanovenie MIC sa využíva užšie spektrum metód, konkrétne sú to metódy riediace. Slúžia ako confirmácia pri nejasných výsledkoch iných postupov, napr. diskovej difúzie. Primárne sa využívajú pri testovaní a porovnávaní nových látok a sú referenčnými metódami (Plumb, 2015; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

Hodnota MIC zároveň nemusí definovať celkovú inhibičnú schopnosť. Môže sa uvádzať ako napr. MIC<sub>90</sub>, čo je koncentrácia látky inhibujúca 90% daných mikroorganizmov. Organizmy sú delené na klinicky citlivé a rezistentné. Pri rezistentných kmeňoch sa neuvádza hodnota MIC (Plumb, 2015; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

Metódy testovania mikrobiálnej citlivosti sú normalizované viacerými organizáciami, ako sú ISO, EUCAST alebo FDA. Normy organizácii zjednocujú metodiku a postupy, ktoré tak umožňujú používať zaužívaný systém postupov. Dokumenty popisujú faktory ako postupy, média, ich riedenie alebo hraničné hodnoty citlivosti pre baktérie či kvasinky. Normy AST boli zaužívané už v šesťdesiatych rokoch minulého storočia Svetovou zdravotníckou organizáciou (Karatuna, 2012; Mercer et al., 2020).

Štandardizácia postupov vedie k najrelevantnejším výsledkom a eliminuje vplyvy prostredia alebo nedostatku živín na inhibíciu mikroorganizmov. Jediným zdrojom rastu mikroorganizmu je iba jeho vlastná rezistencia. Medzi normované postupy patrí veľkosť a príprava bakteriálneho inokula, ktoré by malo pochádzať z piatich kolónii a dosiahnutie štandardu 0,5 McFarlandovho zákalu, čo odpovedá  $1,5 \times 10^8$  CFU (Karatuna, 2012; Mercer et al., 2020).



Počet kolónii je dôležitý, keďže pri malom množstve by nemuseli byť obsiahnutý rezistentný zástupcovia, zatiaľ čo pri nadmernom množstve by bola dosiahnutá zvýšená rezistencia.

Štandardizuje sa aj použité médium, zvyčajne Mueller-Hintonov bujón alebo agar, a jeho zloženie, pH, prítomnosť iónov a prídavné látky ako krv alebo tymidín. Podstatná je aj úprava podmienok a doby inkubácie (Karatuna, 2012; Mercer et al., 2020).

História AST však siaha až ku Alexandrovi Flemingovi, ktorý už v dvadsiatych rokoch 20. storočia sledoval inhibičné zóny stafylokokov na agare. Významne prispel k testovaniu mikrobiálnej citlivosti aj použitím metódy riedenia bujónu a sledovania zákalu, čo je v súčasnosti elementárnym postupom AST. Následne Bauer a Kirby prispeli vývojom diskovej difúznej metódy, dnes najčastejšie využívanéj a známej ako Kirby-Bauerova disková difúzna metóda. Značné uplatnenie metód testovania citlivosti viedlo k získavaniu informácií o vplyve chemických látok na rôznych bakteriálnych zástupcov, čo prinieslo potrebu určitej unifikácie a vymedzenia kritických hodnôt citlivosti, keďže špecifický typ antibiotika vykazoval voči rôznym kmeňom odlišnú účinnosť (Karatuna, 2012).

Medzi najčastejšie používané metódy patria tzv. metódy zlatého štandardu. V princípe ide o manuálne metódy s jednoduchým prevedením a nenáročnou inštrumentizáciou. Výsledkom je tvorba viditeľného zákalu, kde postačuje okometrické odčítanie alebo spektrofotometrické merania. Prvé médium, v ktorom je viditeľný zákal, značí prítomnosť rastu baktérii. Médium, ktoré má o stupeň vyššiu koncentráciu antibiotika vyjadruje hodnotu MIC. Metódy poskytujú informácie o prítomnosti mikroorganizmov a ich citlivosti, no už nezahŕňajú mechanizmus účinku alebo iné podrobnejšie charakteristiky. Nevýhodou je taktiež časová náročnosť (Schumacher et al., 2017; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

Základ tvoria dilučné metódy, ktoré sú referenčné a od nich podliehajú kalibrácii ďalšie spôsoby testovania citlivosti, ako napr. diskové metódy. Tie preukazujú menej presné výsledky, ktoré v rámci klinickej praxe a stanovovania liečby nie sú úplne spoľahlivé (Schumacher et al., 2017; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

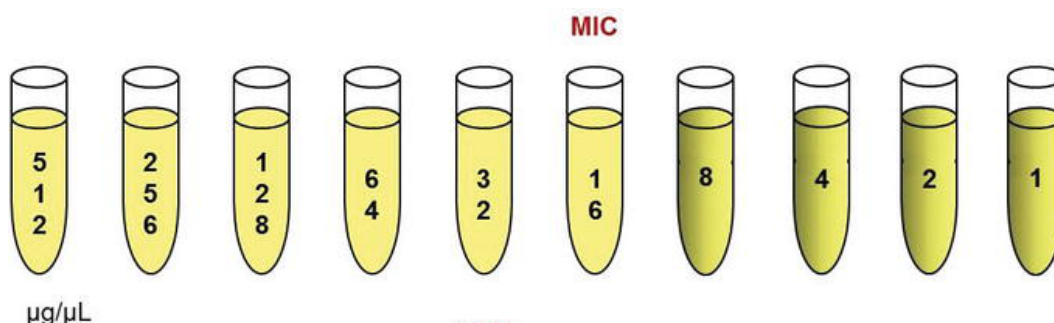
## 2.9.2 Typy metód

### 2.9.2.1 Makrodilučná bujónová metóda

Jednou z najstarších metód je skúmavková metóda riedenia, ktorá využíva tekuté médium s prítomným antibiotikom, ktoré podlieha dvojnásobnému riedeniu. Do skúmaviek je pridané známe množstvo baktérii, ktorých prítomnosť vytvára po 24 hodinovej inkubácii zákal. Ten je odčítaný a udáva hodnotu MIC. Okrem MIC je možné stanovovať aj MBC, čo je minimálna baktericídna koncentrácia, teda množstvo látky, pri ktorom nedochádza len k inhibícii rastu a množenia, ale priamo k usmrteniu mikroorganizmov. K sledovaniu usmrcovania baktérii slúži aj odvodená time-kill metóda, v rámci ktorej sa sleduje priebežný úbytok kolónii počas doby 24 hodín. Výsledkom je vzťah logaritmu poklesu koncentrácie v čase (Schumacher et al., 2017).

Výhodami makrodilučných metód je ich univerzálnosť, ktorá umožňuje rovnaký postup pre testovanie rôznych antibakteriálnych látok. Na druhú stranu sú metódy obmedzené manuálnou prípravou roztokov, čo vedie k časovej náročnosti. V súčasnosti sa pre skrining využívajú rýchlejšie metódy (Schumacher et al., 2017).

Obr. 22: Makrodilučná metóda (číslami vyjadrená koncentrácia riedenia) (dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/antibacterial-agents/current-approaches-for-exploration-of-nanoparticles-as-antibacterial-agents>)



### 2.9.2.2 Mikrodilučná metóda

Mikrodilučia je obdobou klasickej bujónovej metódy, no vykonáva sa v zmenšenom merítku na mikrotitračnej doštičke. Doštička má usporiadanie 12x8 jamiek a umožňuje tak testovanie dvanástich látok v ôsmich rôznych koncentráciách. Oproti makroverzii bola metóda vyvinutá až v sedemdesiatych rokoch (oproti druhému desaťročiu 20. storočia). Podobne tu dochádza k dvojnásobnému riedeniu antibiotika a 24 hodinovej inkubácii. Sleduje sa zákal, no hodnota

MIC môže byť stanovená taktiež fluorometricky. Výhodou je automatizovateľnosť pipetovania a možnosť testovania viacerých antibiotík v rámci jednej doštičky. Taktiež sa využívajú kity s alikvótno predpripravenými koncentráciami, čo urýchľuje postup. Do popredia metódu dáva aj priestorová nenáročnosť a menšie množstvo potrebných roztokov (Schumacher et al., 2017).

### 2.9.2.3 Disková difúzna metóda

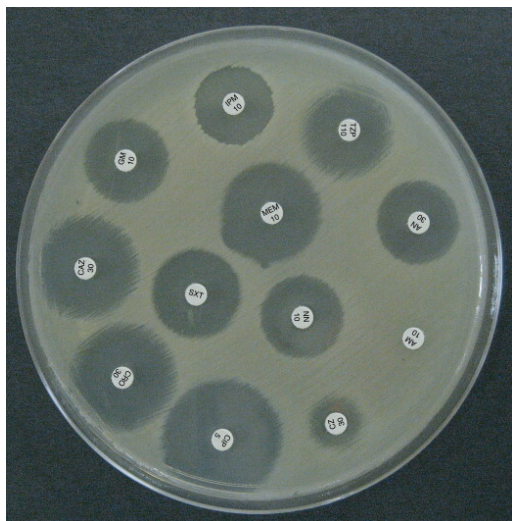
Popri riedení antibiotík v tekutých médiách je obľúbená aj disková metóda využívajúca tuhé agarové platne. Klasickým difúznym postupom je Kirby-Bauerova metóda, vyvinutá v polovici minulého storočia, no schválená až v roku 1975. Princípom je sledovanie rastu, resp. inhibície kolónii na tuhom médiu v oblasti drobných papierových kotúčov, ktoré obsahujú požadované antibiotikum. V rámci jedného média je umiestnených viacero kotúčov impregnovaných rôznymi koncentráciami. Výsledkom je sledovanie a meranie inhibičných zón, kde nedochádza k rastu kolónii a ich šírka zodpovedá koncentrácii a účinnosti inhibujúcej látky (Schumacher et al., 2017).

Štandardizácia metódy delí mikroorganizmy na citlivé, stredné a rezistentné kmene a vzťahuje k nim konkrétne veľkosti inhibičných zón. Taktiež je normatívne umožnené testovať na jednej platni viacero liečiv a metóda je vhodná pre široké spektrum baktérii, od aeróbných cez náročne kultivovateľné ako je *Haemophilus* alebo hemolytické streptokoky (Schumacher et al., 2017).

Inhibícii a odčítaniu zón predchádza resuspendácia kolónii v bujóne alebo slanom roztoku na štandardizovanú koncentráciu, ktoré sú nanášané na platňu. Nasleduje umiestnenie impregnovaných diskov a inkubácia.

Výhodou difúznej inhibície je jednoduchosť a flexibilita, kde k zmene antibiotika stačí výmena disku. Vzhľadom k tomu sú aj finančné náklady nízke. Problémom môže byť presnosť, keďže nerovnosti agaru niekedy vedú k chybnému odčítaniu inhibičnej zóny. Taktiež je Kirbyho postup nevhodný pre anaeróbne baktérie (Schumacher et al., 2017).

Obr. 23: Disková difúzna metóda (dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/disk-diffusion>)



#### 2.9.2.4 Technika riedenia agaru

Na tuhom médiu prebieha aj metóda riedenia agaru, počas ktorej sa médium doplní rôznymi koncentraciami inhibičnej látky a po 48 hodinách inkubácie sa zráta celkový počet kolónii. Aj napriek svojmu veku metóda poskytuje presné výsledky a je vhodná pre aeróbne aj anaeróbne baktérie, no vyžaduje si dlhší čas pre kultiváciu. Obdobou je moderná chromogénna metóda, ktorá využíva agar s obsahom chromogénov. Tie farebne značia kolónie po kratšom časovom úseku a rátanie je možné už po osemnástich hodinách. Taktiež je možné selektívne farbiť buď citlivé alebo rezistentné kolónie (Schumacher et al., 2017).

#### 2.9.2.5 Mikrokalorimetria

Princípom kalorimetrického stanovenia je sledovanie tepelného prejavu kultivácie, ktorý sa prejavuje najmä počas fázy exponenciálneho rastu mikroorganizmov. Kalorimetrom sa sleduje tepelná závislosť na raste kolónii, ktorej výsledkom je bakteriálna rastová krivka. Metóda spĺňa základne požiadavky, no nie je normalizovaná a patrí medzi minoritné postupy (Schumacher et al., 2017).

### 2.9.2.6 Etest

Etest je podobným spôsobom testovania citlivosti ako disková difúzia. Na spodnú časť platne sa umiestni prúžok s vopred definovaným gradientom koncentrácií antibiotika. Po dňovej inkubácii sa vytvorí difúzna zóna pri zodpovedajúcej inhibičnej koncentrácii. Výhodou je stabilný gradient, možnosť testovania širokého spektra patogénov alebo sledovanie heterogénnej rezistencie. Metóda je síce finančne náročnejšia, no poskytuje presné výsledky a je vhodná pre doladenie liečby (Schumacher et al., 2017).

Obr. 24: Etest (dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780537/>)



### 2.9.3 Postup metódy a média

Médium používané k testovaniu citlivosti by malo verne simulovať prirodzené prostredie baktérii (napr. pre vznik infekcie). Túto podmienku spĺňa viacero médií, no rutinne zaužívaným je Mueller-Hintonov agar, ktorý je normatizovaný a spĺňa podmienky Národného výboru pre klinické laboratórne normy (NCCLS). Ten popisuje postupy vyhodnocovania MH agaru a považuje ho za referenčný. Podmienkou pre médium je absencia pridaných doplnkových látok, no výnimkou sú prídavky nevyhnutné pre rast. Doplnkom býva napríklad krv používaná pre streptokoky alebo moraxely (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

Dôležitým krokom je aj skladovanie a príprava antibiotík a zásobných roztokov. Tie by sa mali uchovávať v chlade, prípadne zmrazené. Rozmedzie skúšaných koncentrácií závisí od typu testovaného mikroorganizmu.

Inokulum by malo byť pripravené zo štyroch alebo piatich kolónii, aby sa zabránilo rastu atypických kolónii, a dosiahnuť McFarlandov štandard. Príprava môže prebiehať aj emulgáciou z agarového média (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000).

## **2.10 Testovanie účinnosti sulfónamidov voči mikroorganizmom**

### **2.10.1 *Escherichia coli***

#### **2.10.1.1 Novosyntetizované sulfónamidy**

Baktérie *Escherichia coli* boli v štúdií z roku 2014 testované sulfónamidmi tvorenými syntézou p-toluénsulfonylchloridu spolu s aminokyselinami typu histidín a tryptofán, a taktiež liečivami ako celekoxib alebo ribavirín, ktoré majú v štruktúre taktiež prítomné aminokyseliny. Aminokyseliny boli poskytnuté aj nikotínamidom a sladidlom aspartátom. Ako referenčné antibiotikum bol použitý ciprofloxacín (Quadir et al., 2015).

Bakteriálne suspenzie boli udržiavané v chlade (pri 5 °C) na TSA agare. K inhibícii boli použité antibiotiká rozpustené v dimethylsulfoxide s koncentráciou 10 až 30 mg/ml (v 1 ml DMSO). Média sa inkubovali 72 hodín (Quadir et al., 2015).

Hodnoty inhibičnej koncentrácie MIC pre baktérie *E. coli* sa pohybovali u viacerých testovaných derivátoch v rozmedzí 7,81 až po viac než 500 µg/ml. MIC referenčného ciprofloxacínu bola 0,625 µg/ml (Quadir et al., 2015).

#### **2.10.1.2 Tiazolylové a benzotiazolylové sulfónamidy**

V štúdií z roku 2009 boli ako inhibičné látky použité deriváty sulfónamidov obsahujúce tiazolylové a benzotiazolylové skupiny. Testované boli látky na báze nitrobenzénsulfónamidu, acetaminobenzénsulfónamidu alebo chlórbenzénsulfónamidu. Štúdiá preukázala, že heterocyklická štruktúra látok nemá výrazný vplyv na ich účinnosť. Naproti tomu zavedenie metylového substituentu aktivitu zvyšuje, no s prítomnosťou halogénu

naopak klesá. Ako referenčné látky boli použité ampicilín a sulfamethoxazol (Argyropoulou et al., 2009).

Látky boli účinné najmä u gram pozitívnych baktérii. U *E. coli* sa účinnosť pohybovala v hodnotách nad 100 µg/ml. Taktiež boli sledované hodnoty MBC, ktoré vykazovali približne dvojnásobnú úroveň koncentrácie než hodnoty MIC, čo značí, že sa jedná o bakteriostatické látky. Sulfónamidy sa zároveň testovali aj v kombinácii s trimetoprimom, ktorý preukázateľne znížil hodnoty MIC pri všetkých testovaných látkach (Argyropoulou et al., 2009).

### **2.10.1.3 Vplyv nových alifatických sulfónamidov**

Alifatické sulfónamidy so symetrickou štruktúrou boli syntetizované nukleofilnou reakciou diamínov s alkylsulfonylchloridmi rôzneho typu, a to za mínusovej teploty. Taktiež boli použité odlišné rozpúšťadla pre zlepšenie konečného výťažku (napríklad acetonitril alebo dichlórmetán), ktoré sa po reakcii odparili (Özbek et al., 2007).

Liečivá boli pri testovaní inhibície použité v koncentrácii 0,1 – 1 g/ml. Antibiotiká sa ukázali účinné voči viacerým druhom gram negatívnych mikroorganizmov a najvplyvnejšou látkou bola zlúčenina 1-butánsulfónamid-N,N'-1,3-propándiylbis (Özbek et al., 2007).

U *E. coli* boli zaznamenané hodnoty MIC v rozsahu od 150 do 555 µg/ml a účinnosť sa pripisuje prítomnosti lipofilného alkylového reťazca, ktorý má schopnosť narušiť lipidovú membránu u gram negatívnych baktérii. Naproti tomu účinnosť negatívne ovplyvňuje dĺžka uhlíkovej štruktúry, ktorá má s rastúcim objemom väčší problém s prienikom do bunky, čo znižuje účinnosť liečiva (Özbek et al., 2007).

### **2.10.1.4 Účinok kurkumínových sulfónamidov**

Kurkumínové deriváty sulfónamidov obsahujú kurkumín, čo je polyfenolová štruktúra prítomná v niektorých rastlinách. Zavedenie nového prvku, kurkumínu, pri syntéze sulfónamidových antibiotík má byť spôsobom ako obísť vznik čoraz väčšej rezistencie voči antibiotickým liečivám (Lal et al., 2013).

Syntéza prebiehala reakciou rôznych typov sulfónamidov (základný sulfanilamid, sulfadimidín alebo sulfametoxazol), na ktoré sa viazal kurkumín. Menilo sa taktiež miesto väzby na molekule kurkumínu – ketónová, dikarbonylová prípadne metylénová skupina.

U výsledných kombinácií sa sledovala aktivita a inhibičná účinnosť. Najúčinnšie látky mali sulfónamid naviazaný na karbonylovú skupinu kurkumínu (Lal et al., 2013).

Z výsledkov vyplýva, že použitie kombinácie antibiotika s kurkumínom je účinnejšie najmä u inak málo aktívnych sulfónamidov, a taktiež je inhibícia väčšia než u samotného kurkumínu. Hodnoty MIC avšak nedosahujú úroveň referenčného ciprofloxacínu (1,25  $\mu\text{M}$ ). Hodnoty inhibície derivátov pri testovaní na baktériách *E. coli* sa pohybovali v rozmedzí 20 až viac než 160  $\mu\text{M}$  (Lal et al., 2013).

## **2.10.2 *Staphylococcus aureus***

### **2.10.2.1 Sulfónamidy odvodené od furanylu s viazaným kovovým prvkom**

Príprava spočívala v zmiešaní roztoku sulfónamidu s furfuraldehydom za prítomnosti metanolu. Roztok sa zmiešal s roztokom soli požadovaného kovu. Z roztoku vznikla látka pevného skupenstva. Ako kovová zložka bol použitý kobalt, meď, nikel alebo zinok (Chohan et al., 2008).

Výsledky preukázali aktivitu všetkých ligandov voči *Staphylococcus aureus*. Významnú úlohu zaujal aj naviazaný uhlíkový reťazec, ktorý zvyšoval inhibičný účinok s ohľadom na jeho dĺžku – zlúčeniny s naviazaným etylom mali vyššiu účinnosť než s prítomným metylovým reťazcom. Hodnoty MIC sa pohybovali v rozmedzí od 0,0139 po 0,144  $\mu\text{g/ml}$  (Chohan et al., 2008).

### **2.10.2.2 Vplyv sulfónamidov na báze benzotiazolov**

Kľúčovou reakciou k tvorbe derivátov bola syntéza N-kyanoacetoarylsulfonylhydrazidu s akrylonitrilom v alkalickom prostredí KOH. Vznikajú adukty v štyroch izomerných podobách (Azzam et al., 2020).

Proti gram pozitívnym baktériám, medzi ktoré patrí aj *Staphylococcus aureus*, vykazovali najlepšiu účinnosť tiometylpyridónové deriváty. V niektorých prípadoch bola MIC porovnateľná s referenčným gentamicínom. Konkrétne voči stafylokokom sa ukázali byť H-pyrazolopyridóny ako najúčinnšie. Aktivita sa dokonca vyrovnala overeným liečivám ako sulfadiazín. Hodnoty MIC boli na úrovni 125  $\mu\text{g/ml}$  pre nové deriváty (pre porovnanie: sulfadiazín 500  $\mu\text{g/ml}$  a ampicilín 62,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Azzam et al., 2020).



### 2.10.2.3 Alifatické sulfónamidy

Podobne ako pri testovaní alifatických sulfónamidov u baktérii *E. coli*, aj v tomto prípade syntéza inhibičnej látky vyplývala z exotermného nukleofilného procesu reakcie diamínov s alkylsulfonylchloridmi. Rozpúšťadla ako tetrahydrofolát zlepšujú nukleofilnú substitúciu (Özbek et al., 2007).

Zlúčeniny preukázali účinnosť voči gram negatívnym aj gram pozitívnym baktériám, teda aj stafylokokom. Minimálna koncentrácia nutná k inhibícii *Staphylococcus aureus* bola v rozmedzí 216 – 648 µg/ml a najúčinnnejším derivátom bol 1-butanesulfonamid-N,N'-1,2-ethanediylbis (Özbek et al., 2007).

### 2.10.3 *Bacillus subtilis*

#### 2.10.3.1 Vplyv indolenyl sulfónamidov

Indolenylové sulfónamidy sú deriváty s prítomným indolovým kruhom a považujú sa za potencionálne vhodné liečivá, odolné voči inak ľahko vznikajúcej rezistencii baktérii ku klasickým sulfónamidovým antibiotikám. Taktiež sú vhodným terapeutickým prostriedkom aj vďaka protiplesňovej aktivite.

Syntéza spočívala v reakcii nemennej zložky, indolkarbaldehydu, so sulfónamidom. Použili sa klasické liečivá ako sulfanilamid, sulfatiazol alebo sulfametoxazol (Chohan et al., 2010).

Zlúčeniny preukázali rôznu mieru aktivity voči gram pozitívnym aj negatívnym mikroorganizmom. MIC pre baktérie *Bacillus subtilis* sa pohybovala v hodnotách medzi 65,37 a 262,9 µg/ml (Chohan et al., 2010).

#### 2.10.3.2 Účinok sulfónamidových chromónov

Sulfónamidové chromóny sú látky aromatického (eventuálne heterocyklického) charakteru, ktoré boli využívané zvyčajne mimo antibakteriálnu oblasť medicíny (liečba zhubných ochorení). Tvorba derivátov je daná pomerne jednoduchou reakciou roztoku 3-formyl-6-metylchromónu s alkoholom a príslušným sulfónamidom za vyššej teploty a v kyslom prostredí.

Hodnoty MIC pre baktérie *Bacillus subtilis* sa pohybovala v rozmedzí  $2.043 \times 10^{-8}$  po viac než  $2.2908 \times 10^{-7}$  M. Preukazuje to značný účinok zlúčenín aj v rámci antibakteriálneho pôsobenia (Chohan et al., 2006).

### 2.10.3.3 Amidínové liečivá a benzénsulfónamidy

Syntéza prebieha reakciou rôznych typov amínov (ako kreatín, aminopyridín alebo metylalanín) so sulfonylchloridom (použitý môže byť benzénsulfonylchlorid alebo toluénsulfonylchlorid). Proces prebieha s regulovaním pH a v prítomnosti soli ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Quadir et al., 2015).

Najlepšia inhibičná hodnota dosiahnutá amidínovou radou sulfónamidov voči *Bacillus subtilis* bola 80  $\mu\text{g/ml}$ . Referenčný ciprofloxacín síce dosahuje lepšie výsledky (MIC 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), no liečivo je účinnejšie než sulfamethoxazol (MIC 160  $\mu\text{g/ml}$ ) (Quadir et al., 2015).

### 2.10.4 *Streptococcus pyogenes*

#### 2.10.4.1 Účinok sulfónamidov konjugovaných s makrolidmi

Liečivá boli syntetizované konjugáciou sulfónamidu s azalidovým derivátom, ktorý je základom pre makrolidové liečivá ako erytromycín. Konkrétne boli použité sulfónamidy typu sulfametoxazol, sulfanilamid alebo sulfapyridín. K spojeniu sulfónamidu došlo pomocou karbamoylovej skupiny. Pre makrolidovú zložku bola podstatná úprava laktónového kruhu (Krajačič et al., 2007).

Dané spojenie je podstatné najmä kvôli bráneniu tvorbe rezistencie voči klasickým antibiotikám, a to práve u streptokokových baktérii. Konjugáty preukazujú zvýšenú aktivitu voči ribozómom, čo je ich inhibičný mechanizmus (Krajačič et al., 2007).

Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie pre gram pozitívne baktérie *Streptococcus pyogenes* sa pohybovali v rozmedzí 2 až 64  $\mu\text{g/ml}$ . Pri kmeni *Streptococcus pneumoniae* bola MIC už pri 1  $\mu\text{g/ml}$ . Referenčnými liečivami pre porovnanie boli azitromycín a deoxodihydroazahomoerytromycín, ktorých MIC činila 0,125 a 0,25  $\mu\text{g/ml}$  (Krajačič et al., 2007).

#### 2.10.4.2 Tiazolové a benzotiazolové sulfónamidy

Medzi tiazolové a benzotiazolové sulfónamidy patria zlúčeniny ako alkyl a arylaminoacetylderiváty aminofenyltiazolyly, aminobenzotiazolyly alebo fenylaminofenyltiazolyly. Zlúčeniny boli pripravené reakciou heteroarylamínu a benzénsulfonylchloridu za prítomnosti pyridínu, kde bola kľúčová väzba  $\text{NH}_2$  skupiny na sulfonyl benzénsulfonylchloridu (Argyropoulou et al., 2009).

MIC pre baktérie *Streptococcus pyogenes* sa nachádzala v rozmedzí 0,7 až po vyše 100 µg/ml, čo poukazuje na vyššiu účinnosť aj v porovnaní s referenčným sulfamethoxazolom (MIC 3 µg/ml) (Argyropoulou et al., 2009).

### **2.10.5 *Proteus mirabilis***

#### **2.10.5.1 Účinok fenylových derivátov sulfónamidov**

Karboxyderiváty boli pripravené reakciou terc-butanolu a chlórsulfonylizokyanátu. K roztoku amínu sa následne pridal chlórsulfonylkarbamát a trietylamín. Ako kontrolné látky boli použité sulfametoazol-trimetoprim a sulfaguanidín. Výsledkom boli deriváty ako fenylsulfamid, methoxyfenylsulfamid alebo fluorofenylsulfamid (Bechecker et al., 2016).

MIC pre gram negatívne baktérie *Proteus mirabilis* dosahovala hodnoty 10-30 µg/ml, no niektoré deriváty neboli účinné, ako napríklad methoxyfenylsulfamid, a taktiež kontrolné antibiotika. Neúčinnosť je dôsledkom ľahkej tvorby rezistencie daných mikroorganizmov (Bechecker et al., 2016).

#### **2.10.5.2 Pyridínové deriváty sulfónamidov a benzamidov**

V štúdií z roku 2009 boli syntetizované látky ako brompyridínbenzamid, metylnitropyridínbenzamid alebo trifluormetánsulfónamid, Dôležitým sa ukázalo byť benzamidové jadro, umožňujúce prienik látky a vykonanie jej inhibičnej aktivity. Syntéza prebieha za reakcie benzamidu so sulfónamidom v prostredí pyridínu.

Výrazná aktivita sa preukázala najmä voči multirezistentným gram pozitívnym baktériám, no taktiež proti gram negatívnym, akým je aj *Proteus mirabilis*. Zavedenie hydrofóbnej metylovej skupiny zvýšilo aktivitu až dvojnásobne. Výsledné rozmedzie pre hodnoty MIC činilo 0,15 až 0,7 µM, čo sú hodnoty lepšie než pri referenčnom ampicilíne (0,57 µM).

#### **2.10.5.3 Schiffove bázy sulfónamidov**

Schiffove bázy sú zlúčeniny obsahujúce charakteristickú imínovú skupinu a v prípade antibakteriálneho využitia obsahujúce sulfónamidové fragmenty. Za syntézu báz je zodpovedná reakcia derivátov benzaldehydu a sulfonylhydrazidu (Tahriri et al., 2017).

Konkrétne zlúčeniny Schiffových báz N'- (2-hydroxy-3-metoxybenzylidén) -4-nitrobenzénsulfonohydrazid a N'- (2-hydroxy-3-metoxybenzylidén) -4-

metylbenzénsulfonohydrazid mali inhibičnú aktivitu voči *Proteus mirabilis* na úrovni koncentrácie 5 a 10 mg/ml (Tahriri et al., 2017).

## **2.10.6 *Pseudomonas aeruginosa***

### **2.10.6.1 Sulfónamidy na báze kovu**

Liečivá boli pripravené reakciou aldehydu obsahujúcim kovový prvok so sulfónamidom. . Kovovú zložku poskytli soli medi, niklu, zinku a kobaltu. Výhody inkorporácie kovového prvku sa prejavujú zvýšenou lipofilnosťou zlúčeniny.

Zlúčeniny vykazovali strednú až vysokú aktivitu voči gram pozitívnym aj gram negatívnym baktériám, konkrétne v prípade *Pseudomonas aeruginosa* sa hodnoty MIC pohybovali v rozsahu  $3.204 \times 10^{-8}$  až  $6.562 \times 10^{-8}$  M/ml (Chohan et al., 2010).

### **2.10.6.2 Vplyv sulfónamidov inhibujúcich LpxC**

LpxC je zinok-dependentý enzým LpxC UDP-3-O-acyl-N-acetylglukozamín-deacetyláza, ktorý katalyzuje deacetyláciu N-acetylglukozamínu. Inhibícia vedie k usmrteniu mikroorganizmov a liečivo je účinné konkrétne voči rezistentným gram negatívnym baktériám.

Východiskovými látkami pre syntézu sú bifenylové zlúčeniny (z bifenylnkarboxylových kyselín) (Kawai et al., 2017).

Sulfónamidové enzymatické inhibítory sa ukázali byť značne účinné aj voči *Pseudomonas aeruginosa*, kde minimálna inhibičná koncentrácia pre bifenylové deriváty bola 0,5 – 128 µg/ml a pre benzofuránové dokonca 0,5 – 4 µg/ml (Kawai et al., 2017).

### **2.10.6.3 Sulfónamidy v komplexe so zlatom**

V štúdiu boli využité sulfónamidy typu sulfadiazín a sulfametoxazol, ktoré sa asociovali s atómom zlata pomocou fenylových štruktúr. Jedným z dôvodov odolnosti *Pseudomonas aeruginosa* proti antibakteriálnym látkam je aj tvorba biofilmu. Práve testované komplexy sulfónamidov so zlatom majú schopnosť tento efekt potlačiť. Zlúčeniny okrem inhibície metabolickej aktivity majú schopnosť aj obmedziť pohyb baktérií a znížiť rast biofilmu. Výsledná minimálna inhibičná koncentrácia činila 4 - 256 µg/ml (Mizdal et al., 2018).

### **2.10.7 *Klebsiella pneumoniae***

#### **2.10.7.1 Tetrazolové a oxadiazolové deriváty**

Tetrazolové a oxadiazolové deriváty sú látky heterocyklického charakteru. Vznikajú syntézou benzénsulfónamidu s tetrazolovými a oxadiazolovými derivátmi propánamidu.

V štúdií z roku 2019 bolo testovaných dvanásť derivátov. Každý z nich preukázal značný účinok a hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie činili 8,25 až 132 µg/ml, čo je porovnateľné s referenčným liečivom ciprofloxacín (Özkan a Demirci, 2019).

#### **2.10.7.2 Kovové komplexy sulfónamidu**

Sulfónamid sulfametoxazol sa použil ako ligand pre reakciu s kovovými prvkami niklu, paládia a platiny. Kovová zložka sa získala z chloridovej alebo síričitanovej soli. V prípade niklu dochádza k väzbe na sulfónamidový ligand pomocou dusíka v amínovej a izoxazolovej skupine antibiotika. Komplexy obsahujúce ako kovovú zložku nikel sú najmenej efektívne a ich účinnosť je podobná ako pri pôvodnom sulfónamide bez kovového prvku. Inkorporácia platiny a paládia vedie k zvýšenej účinnosti a ich deriváty sú efektívnejšie než nesubstituované liečivo (Bouchoucha et al., 2018).

Hodnoty MIC pri testoch na baktériách *Klebsiella pneumoniae* boli pre ligand aj niklový komplex 25 µg/ml, no rovnakú hodnotu preukazoval aj komplex platiny. Paládium s MIC 12,5 µg/ml bolo najúčinnnejšie (rovnaká hodnota ako pre referenčný ampicilín) (Bouchoucha et al., 2018).

#### **2.10.7.3 Kumarínové sulfónamidy**

Kumaríny sú prírodné látky patriace medzi laktóny. Východiskovými látkami pri syntéze sú azid sodný, methylkumarín a sulfonylchlorid.

Z antibakteriálneho pohľadu je dôležitá azidová skupina uľahčujúca vstup látky do bunky. Deriváty sú účinné najmä voči gram pozitívnym baktériám, no osvedčili sa aj pri inhibícii gram negatívnej *Klebsiella pneumoniae*. Hodnoty MIC činili 1 – 125 µg/ml, čo sa vyrovná inhibičnej účinnosti referenčného ciprofloxacínu (1 µg/ml). Najvyššiu účinnosť mali zlúčeniny obsahujúce chlór, bróm alebo methoxyderiváty (Basanagouda et al., 2010).

## **2.10.8 *Salmonella sp.***

### **2.10.8.1 Vplyv kovových komplexov sulfónamidov**

Príprava spočíva v rozpustení chloridovej soli obsahujúcej kovový prvok v metanole a acetonitrile, zároveň sa pripraví roztok hydrazónu v alkalickom prostredí. K inkorporácii bol použitý nikel a kobalt.

Výsledná aktivita komplexov bola nižšia než u samostatných ligandov, čo je dané poklesom elektrónovej hustoty zapríčinené začlenením kovovej zložky. Z komplexov boli účinnejšie niklové deriváty s MIC (pre baktérie *Salmonella enteritidis*) 430 a 433 µg/ml. MIC pre zlúčeniny s kobaltom bola 549 a 550 µg/ml (Özdemir et al., 2009).

### **2.10.8.2 Pyrimidínové deriváty sulfónamidov**

Štúdia z roku 2012 sa zaoberala tvorbou pyrimidínových derivátov arylmočoviny, thiomčoviny a sulfónamidov. Kľúčovými látkami pre syntézu sú nitrofenylpyrimidín, ktorý v aminácii reaguje s anilínom, kde vzniká fenylaminonitrofenylpyrimidín. Aminoanalóg sa následne podieľa na nukleofilnej reakcii.

Hodnoty MIC konkrétne pre sulfónamidové pyrimidínové deriváty sa pohybovali v rozmedzí 10 – 90 µg/ml u baktérii *Salmonella typhi*, čo značí dobrú účinnosť aj v porovnaní s referenčným antibiotikom ciprofloxacínom (Keche et al., 2012).

### **3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

Cieľom práce bolo sledovanie citlivosti vybraných baktérii a kvasiniek na chemické látky z triedy benzénsulfónamidov. Látky patria do skupiny morpholinomethylfenyl derivátov a testovaných bolo šesťnásť látok na trinástich kmeňoch mikroorganizmov. Výsledky sa zároveň porovnávali s mierou citlivosti ku klasickým antibiotikám a DMSO. K testovaniu citlivosti slúžila dilučná metóda využívajúca dvojkové riedenie, konkrétne šlo o mikrodilučnú metódu. K overovaniu bakteriostatického, eventuálne baktericídneho účinku látok slúžilo vyočkovanie na pevné média. Látky sa testovali v jednotnom koncentračnom rozsahu a sledovali sa minimálne inhibičné koncentrácie pre jednotlivé kmene. Hodnoty boli porovnávané s overenými antibiotikami s MIC definovanými normou EUCAST (verzia 11, r. 2021). Metodika testovania sa riadila európskou normou EN ISO 20776-1:2006, konkrétne českou verziou ČSN EN ISO 20776-1 (z roku 2007). Chemické látky poskytol doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.

#### **3.1 Materiál, reagensie a vybavenie**

##### **3.1.1 Reagensie, roztoky**

Základnými reagensiami bol fyziologický roztok a destilovaná voda. Fyziologický roztok slúžil k riedeniu bakteriálnych suspenzií a destilovaná voda k príprave vhodnej koncentrácie antibiotík.

K riedeniu testovaných sulfónamidov poslužil DMSO. Taktiež bol využitý spolu so zmienenými antibiotikami ako antibakteriálna látka pre porovnanie účinnosti a komparáciu so sulfónamidmi. Inhibičný účinok DMSO bol stanovený bujónovou mikrodilučnou metódou.

##### **3.1.2 Laboratórne vybavenie**

Laboratórne pomôcky: použité boli Petriho misky pre kultiváciu mikroorganizmov; sklenené skúmavky a gumené zátky pre tekuté suspenzie a roztoky; stojánky pre skúmavky; odmerné valce; banky pre uschovanie používaných roztokov.

Jednorazové pomôcky: využívané boli plastové skúmavky pre tekuté suspenzie, riedenie roztokov a nefelometrické stanovovanie hustoty suspenzií; plastové špičky pre pipety kalibrované na rôzne objemy; očkovacie kľičky pre očkovanie inokula z tekutého na pevné

médium a naopak; mikrotitračné doštičky s 96 jamkami pre sledovanie účinku testovaných látok na vybrané mikroorganizmy.

Prístrojové vybavenie: nevyhnutnou súčasťou bol termostat pre uloženie Petriho misiek a mikrotitračných doštičiek a následnú kultiváciu; chladnička pre uloženie reagensii a roztokov a Petriho misiek so staršími kolóniami; kalibrované pipety určené na pipetovanie objemov do: 10 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l, 5ml a 10ml; viackanálové pipety s možnosťou pipetovania ôsmymi špičkami (o objeme do 10 $\mu$ l a 200 $\mu$ l); vortex pre homogenizáciu suspenzií a roztokov; plynový kahan; laboratórne váhy pre naváženie kultivačných médií a analytické váhy pre naváženie antibiotík a sulfónamidov; tepelné zariadenie ako sterilizátor a autokláva.

### 3.1.3 Kultivačné média

Pre kultiváciu bakteriálnych mikroorganizmov bol použitý Mueller-Hintonov (MH) agar (ako pevné médium) a Mueller-Hintonov bujón (ako tekuté médium). Kvasinky sa kultivovali na MALT agare a MALT bujóne, no v rámci dvojkového riedenia sulfónamidov bol aj pre ne použitý MH bujón. Uplatnenie našiel aj krvný agar.

MH média sú v mikrobiologickej praxi bežne používané a k testovaniu antibiotík vhodné vďaka širokému a neselektívnemu účinku.

Média boli pripravené podľa návodu na obale a uskladnené v chladničke pri teplote 4 °C.

Tab. 1: Zoznam použitých médií

Médium	Výrobca	LOT
<i>MH agar</i>	Himedia Leading BioSciences Company	800362741
<i>MH bujón</i>	Himedia Leading BioSciences Company	0000156558
<i>MALT agar</i>	VWR International	1484
<i>MALT bujón</i>	Himedia Leading BioSciences Company	YL010
<i>Columbia agar</i>	Himedia Leading BioSciences Company	0000365882

### 3.2 Testované antibiotiká

Vybrané mikroorganizmy boli testované antibiotikami ampicilín, erytromycín, ciprofloxacín, levofloxacín a amfotericin B.

Testovanie citlivosti mikroorganizmov voči overeným a používaným typom antibiotík je základnou súčasťou testovania a hodnotenia citlivosti nových látok. Získané hodnoty citlivosti antibiotík slúžia ako referenčné dáta pre porovnávanie miery citlivosti a účinku nových



zlúčenín. Taktiež sú hodnoty klasických antibiotík porovnávané s oficiálnymi hodnotami testovaných pod výborom EUCAST.

Tab. 2: Zoznam použitých antibiotík

Antibiotikum	Výrobca	Číslo šarže
<i>Ampicilín</i>	Biotika a.s.	1103003
<i>Erytromycín</i>	Sigma Aldrich	WXBC7091V
<i>Ciprofloxacín</i>	Fluka Chemika	1204518
<i>Levofloxacin</i>	Sigma Aldrich	BCBK5832V
<i>Amfotericin B</i>	Sigma Aldrich	063M4043V

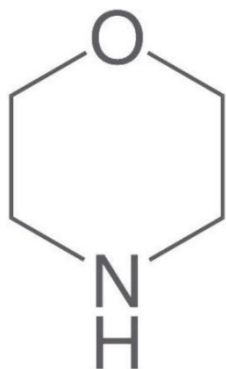
### 3.3 Testované látky

V praktickej časti boli testované látky zo skupiny benzénsulfónamidov, konkrétne morpholinomethylfenylbenzénsulfónamidy. Základnou súčasťou je morfolín, heterocyklická štruktúra s prítomnou amínovou a etherovou funkčnou skupinou. Látky obsahovali taktiež nevyhnutnú amidovú časť spájajúcu benzénovú štruktúru viažucu substituenty. Deriváty sa líšili v morfolínovej časti naviazanej buď na druhom alebo štvrtom uhlíku benzénového cyklu (4-morpholinomethylfenyl alebo 2-morpholinomethylfenyl). Významné zmeny v štruktúre sú podmienené prítomnosťou substituentov na benzénovom cykle, a to v polohe 3C, 4C alebo 5C. K testovaniu citlivosti bolo využitých šesťnásť derivátov líšiacich sa v naviazaných substituentoch, ktorými boli metylová skupina, atóm chlóru, fluóru, ich dvojice alebo kombinácie a pri N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzénsulfónamide a N-(2-(morpholinomethyl)fenyl) benzénsulfónamide substituent nebol prítomný.

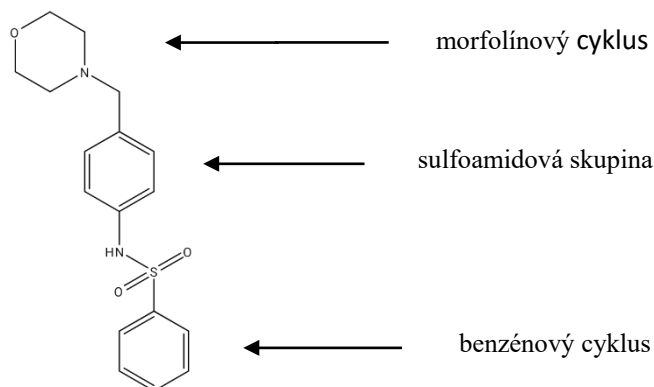
Tab. 3: Zoznam testovaných sulfónamidov

Označenie	Systematický názov	Štruktúrny vzorec	R1	R2	M.H.
MSA I.	N-(2-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{20}N_2O_3S$	-	-	332,42
MSA II.	3-fluor-N-(2-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{19}FN_2O_3S$	3-F	-	350,41
MSA III.	3-chlor-N-(2-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{19}ClN_2O_3S$	3-Cl	-	366,86
MSA IV.	3-fluor-4-methyl-N-(2-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{21}FN_2O_3S$	3-F	4-CH <sub>3</sub>	364,44
MSA V.	3-chlor-4-methyl-N-(2-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$	3-Cl	4-CH <sub>3</sub>	380,89
MSA VI.	3,5-difluor-N-(2-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{18}F_2N_2O_3S$	3-F	5-F	368,4
MSA VII.	3,5-dichlor-N-(2-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{18}Cl_2N_2O_3S$	3-Cl	5-Cl	401,3
MSA VIII.	4-methyl-N-(2-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{22}N_2O_3S$	-	4-CH <sub>3</sub>	346,45
MSA IX.	N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamide	$C_{17}H_{20}N_2O_3S$	-	-	332,42
MSA X.	3-fluor-N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{19}FN_2O_3S$	3-F	-	350,41
MSA XI.	3-chlor-N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{19}ClN_2O_3S$	3-Cl	-	366,86
MSA XII.	3-fluor-4-methyl-N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{21}FN_2O_3S$	3-F	4-CH <sub>3</sub>	364,44
MSA XIII.	3-chlor-4-methyl-N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$	3-Cl	4-CH <sub>3</sub>	380,89
MSA XIV.	3,5-difluor-N-(4-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{18}F_2N_2O_3S$	3-F	5-F	368,4
MSA XV.	3,5-dichlor-N-(4-(morpholinomethyl) fenyl) benzensulfonamid	$C_{17}H_{18}Cl_2N_2O_3S$	3-Cl	5-Cl	401,3
MSA XVI.	4-methyl-N-(4-(morpholinomethyl)fenyl) benzensulfonamid	$C_{18}H_{22}N_2O_3S$	-	4-CH <sub>3</sub>	346,45

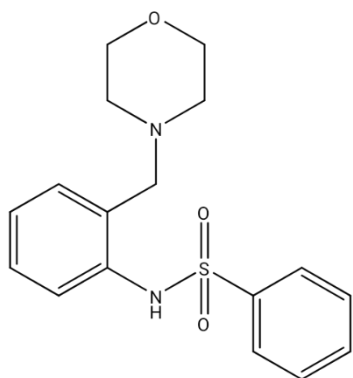
Obr. 26: Morfolínový cyklus (dostupné z: [shorturl.at/elxPR](http://shorturl.at/elxPR))



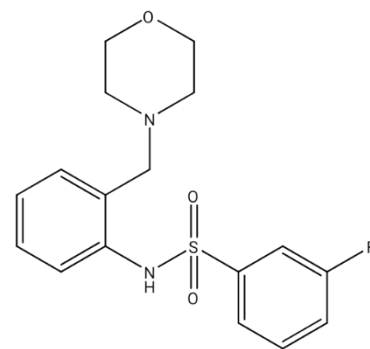
Obr. 25: Príklad morpholinomethylfenylbenzénsulfónamidu (dostupné z: dokument Přehled testovaných sulfonamidů, doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.)



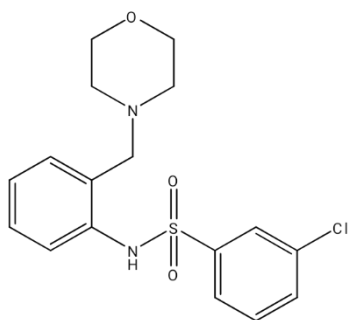
Obr. 28: MSA I.



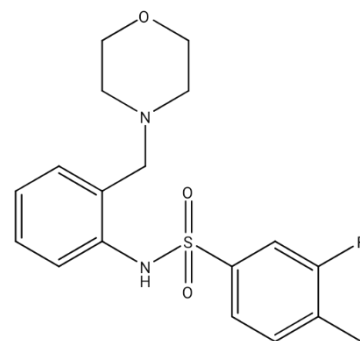
Obr. 27: MSA II.



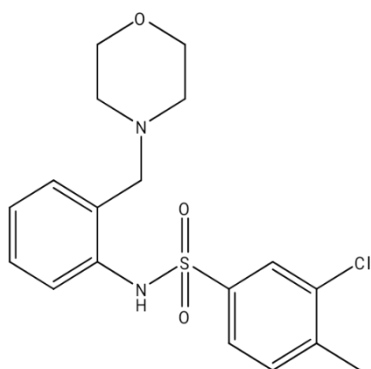
Obr. 30: MSA III.



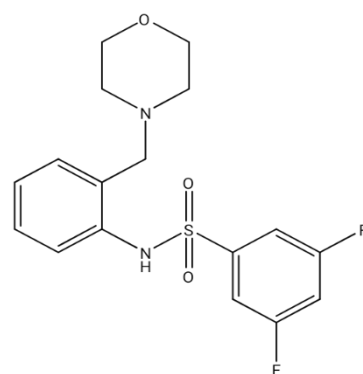
Obr. 29: MSA IV.



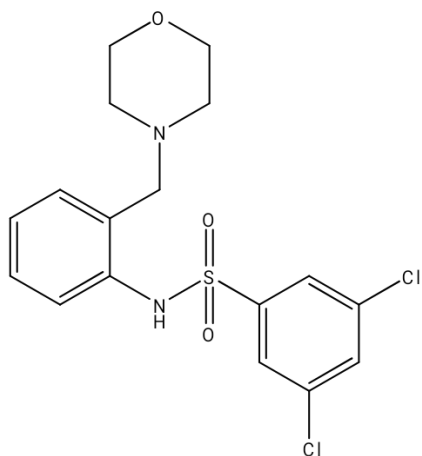
Obr. 32: MSA V.



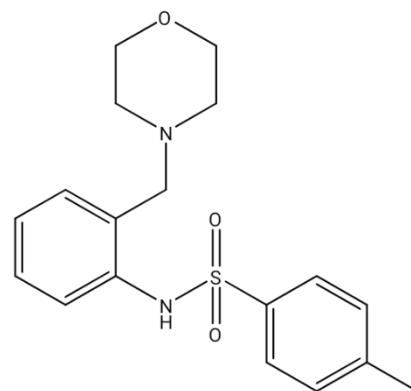
Obr. 31: MSA VI.



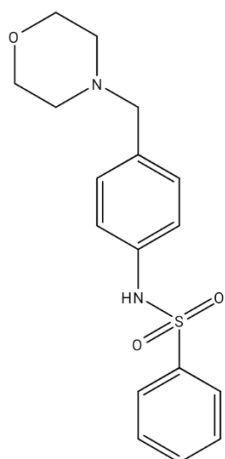
Obr. 34: MSA VII.



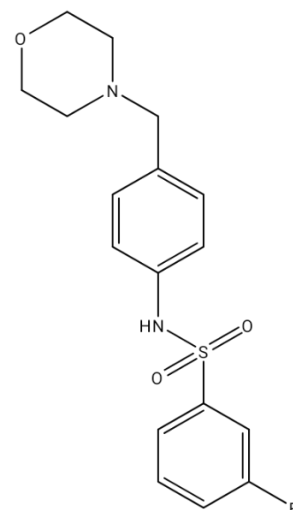
Obr. 33: MSA VIII.



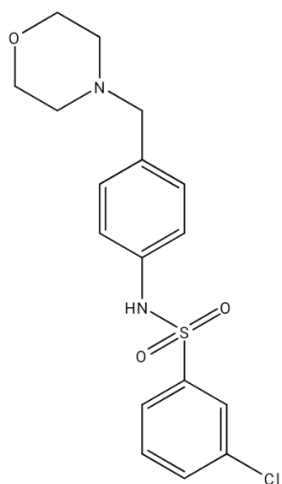
Obr. 36: MSA IX.



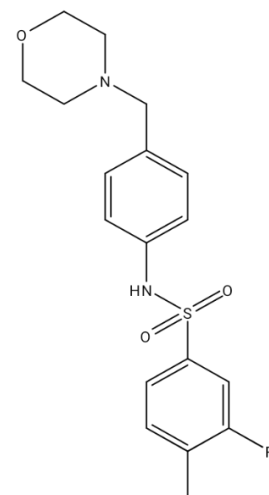
Obr. 35: MSA X.



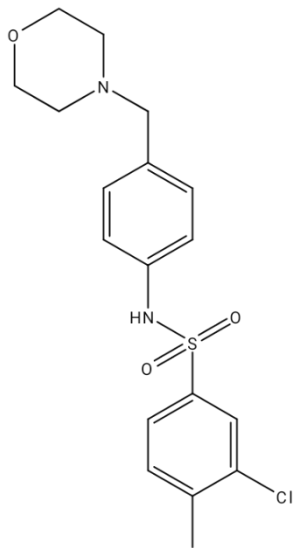
Obr. 38: MSA XI.



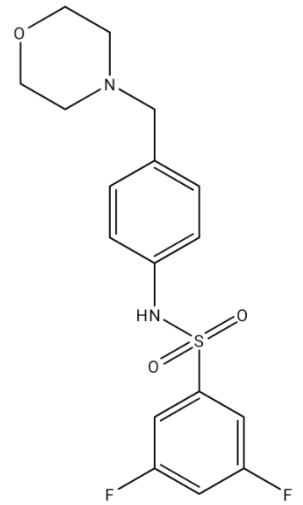
Obr. 37: MSA XII.



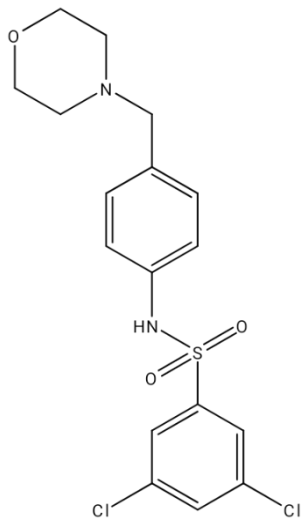
Obr. 40: MSA XIII.



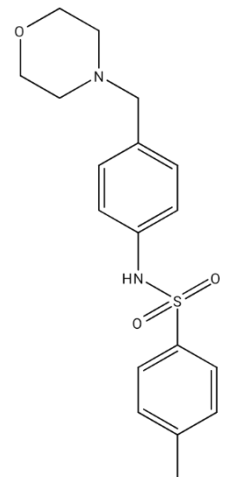
Obr. 39: MSA XIV.



Obr. 42: MSA XV.



Obr. 41: MSA XVI.



### 3.4 Testované kmene

Medzi testované mikroorganizmy boli zaradené tak ako baktérie gram pozitívne, tak aj gram negatívne. Baktérie patrili medzi kmene *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* a *Klebsiella*. Zástupcovia týchto rodov sú pomerne ľahko kultivovateľní a majú schopnosť vyvolávať u ľudí ochorenia, čím sú vhodnými subjektami pre testovanie citlivosti chemických látok. Nevyžadujú náročné kultivačné média ani špeciálne kultivačné podmienky a k rastu postačuje teplota 37 °C a aeróbne prostredie.

Sulfónamidy boli testované aj na eukaryotických organizmoch – kvasinkách kmeňu *Candida*. Testované boli *Candida albicans* a *Candida tropicalis* a pre kultiváciu bol vhodnejší MALT agar (bujón).

Testované kmene:

- *Staphylococcus aureus* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 4223)
- *Enterococcus faecalis* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 4224)
- *Bacillus cereus* (Zbierka univerzity Pardubice)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 3955)
- *Escherichia coli* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 3954)
- *Klebsiella pneumoniae* (Zbierka univerzity Pardubice)
- *Proteus mirabilis* (Zbierka univerzity Pardubice)
- *Candida albicans* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 8186)
- *Candida tropicalis* (Česká zbierka mikroorganizmov v Brne; CCM 8223)

### 3.5 Pracovný postup

#### 3.5.1 Prvotná príprava

Mikrobiologickému testovaniu predchádzala príprava pracovných podmienok. Bolo nutné si pripraviť kultivačné média a následne zaliať Petriho misky agarom. Dôležité bolo nechať misky s pôdou vychladnúť, keďže pri uložení do chladničky a rýchlym vychladnutím by sa vyzrážala veľkosť, ktorá by komplikovala očkovanie. Priebežne sa dopĺňali špičky pre pipety, ktoré bolo nutné kvôli sterilite autoklávovať, rovnako sa postupovalo aj s platovými miskami pre nalievanie roztokov a suspenzií.

### 3.5.2 Príprava mikrobiálnych suspenzií

Prípravované boli suspenzie o hustote 0,5 stupňa McFarlanda. Z pevných médií boli vyočkované kolónie do fyziologického roztoku o objeme 3 ml. Následne sa preverovala hustota denzitometrom. Dôležitým medzikrokom bola homogenizácia suspenzií pomocou vortexu. Suspenzie boli ďalej riedené na výslednú koncentráciu  $1 \times 10^6$  CFU/ml.

### 3.5.3 Príprava testovaných antibiotík

Antibiotiká boli pripravené podľa normy ČSN EN ISO 20776-1.

Koncentrácia zásobných roztokov bola pripravená podľa nasledujúceho vzorca:

$$V = (m \times p) / \rho$$

V – objem riedidla v litroch

m – hmotnosť antimikrobiálneho činidla (v prášku) v gramoch

p – účinnosť antimikrobiálneho činidla v mg/l

$\rho$  – koncentrácia zásobného roztoku v mg/l

Zásobné roztoky antimikrobiálnych činidiel boli riedené nasledujúcimi rozpúšťadlami:

- Ampicilín – fosfátový pufr 0,1 mol/l, pH 6,0
- Erytromycín – etanol (objemový zlomok 95%)
- Ciprofloxacín – voda
- Levofloxacín – polovica objemu vody, min. objem 1 mol/l NaOH pre rozpustenie; potom doplniť do celkového objemu vodou)

Pracovný roztok sa pripravil zo zásobného roztoku o koncentrácii 64 mg/l. K riedeniu je použitý bujón v pomere 1:3 (zásobný roztok : bujón). Výsledná koncentrácia pracovného roztoku podľa daného riedenia je 16 mg/l.

### 3.5.4 Testované sulfónamidy a ich príprava

Testovaných bolo 16 derivátov morpholinomethylfenylbenzénsulfónamidov. Koncentrovaná látka sa riedila DMSO na zásobný roztok o koncentrácii 10240 mg/l, ten sa následne riedil na východiskovú koncentráciu 1024 mg/l. Koncentračný rozsah testovaných látok bol 0,5 – 1024 mg/l.

DMSO bol použitý pre zistenie inhibičných schopností a citlivosti vybraných mikroorganizmov. Koncentrovaný DMSO sa riedil v pomere 1:1 s bujónom na výsledný objem 2 ml o koncentrácii 50%. Koncentračný rozsah pre testovanie činil 1 – 50%.

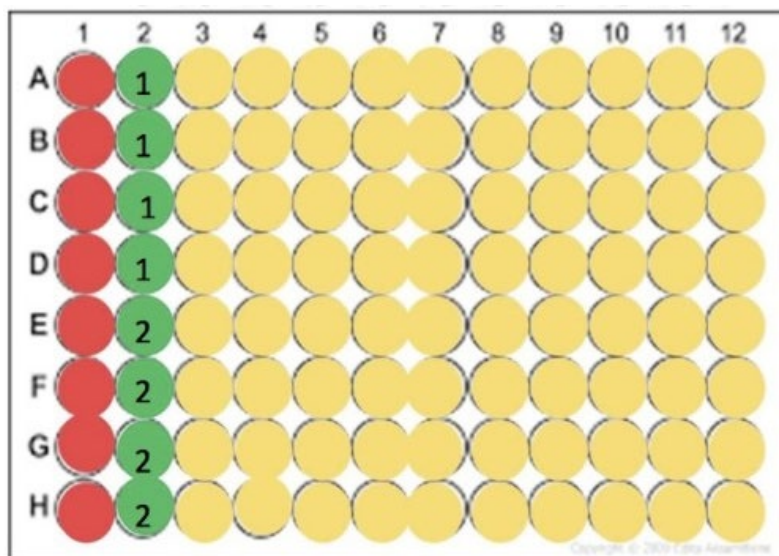
- DMSO: výrobca PENTA INVESTMENTS LIMITED; číslo šarže 2001270115

### **3.5.5 Príprava mikrotitračných doštičiek**

Použité boli 96 jamkové mikrotitračné doštičky. Rozsah koncentracii 0,5 až 1024 mg/l u testovaných sulfónamidov znamenal využitie všetkých dvanástich stĺpcov. Jedna doštička stačila k otestovaniu dvoch mikroorganizmov s tým, že sa jeden kmeň testoval pre kontrolu trikrát (pipetované tri riadky). Výsledkom sa použilo šesť riadkov z ôsmych, v posledných dvoch zostal priestor pre pozitívnu a negatívnu kontrolu. Antibiotiká sa testovali v rozsahu 0,125 – 16 mg/l, čo znamenalo použitie ôsmych stĺpcov doštičky. Do všetkých jamiek doštičky (okrem prvého stĺpca a dvoch nevyužívaných riadkov) bolo napipetovaných 100 µl bujónu. Následne sa napipetovalo 100 µl antibiotika o najväčšej koncentrácii (16 mg/l, resp. 1024 mg/l u sulfónamidov) do prvého stĺpca. Do druhého stĺpca sa napipetovalo taktiež 100 µl antibiotika, resp. sulfónamidu o najväčšej koncentrácii, a ďalej sa postupovalo pipetovaním pre dvojkové riedenie, čím bola dosiahnutá exponenciálne klesajúca koncentrácia roztokov. V poslednom kroku sa do každej používanej jamky napipetovalo 5 µl mikrobiálnej suspenzie o koncentrácii  $1 \times 10^6$  CFU/ml. Pozitívna kontrola bola vytvorená pipetovaním 100 µl bujónu a 5 µl suspenzie. Ak nedošlo ku chybe, v pozitívnej kontrole mal byť vždy viditeľný nárast kolónii. Negatívna kontrola bola tvorená len 100 µl bujónom, slúžila pre overenie neprítomnosti kolónii a ľahšie vizuálne porovnávanie pozitívnych a negatívnych jamiek. Doštičky boli inkubované pri teplote 37 °C po dobu 24, resp. 48 hodín.



Obr. 43: schéma dvojkového riedenia na mikrotitračnej doštičke  
(dostupné z: <https://bitesizebio.com/28817/three-steps-setting-drug-screening-assay/> - upravené)



- červený stĺpec – najvyššia koncentrácia (100  $\mu$ l antibiotika/sulfónamidu)
- zelený stĺpec – druhá najvyššia koncentrácia (100  $\mu$ l antibiotika/sulfónamidu + 100  $\mu$ l bujónu)
- žlté stĺpce – dvojkové riedenie

### 3.6 Výsledky testovania minimálnej inhibičnej koncentrácie

Základným bodom testovania citlivosti chemických látok je stanovenie hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie. Hodnota MIC vyjadruje koncentráciu látky, pri ktorej nebola zaznamenaná prítomnosť bakteriálneho rastu. Podľa hodnoty MIC sa dá usudzovať účinnosť, prípadne neúčinnosť testovaného derivátu. Podľa normovaných hodnôt MIC pre referenčné kmene sa zároveň dá prispôbiť koncentračný rozsah, v ktorom budú látky testovať.

Cieľom testovania bolo zistenie minimálnych inhibičných koncentrácií pre šesťnásť testovaných látok zo skupiny morpholinomethylfenylbenzénsulfónamidov. Kmene boli testované aj klasickými antibiotikami pre porovnanie účinnosti nových derivátov. Výsledkom bolo overenie schopnosti sulfónamidových derivátov bakteriostaticky alebo baktericídne potláčať rast mikroorganizmov a posúdiť možnosť použitia v medicínskej liečbe infekcii.

### 3.6.1 Kontrola kvality mikrodilučnej metódy

Citlivosť bakteriálnych kmeňov sa prvotne testovala na známych antibiotikách. Odčítané hodnoty MIC sa porovnávali s tabuľkovými hodnotami uvedené v norme ČSN EN ISO 20776-1.

Hodnoty zodpovedajú norme u väčšiny výsledkov, odlišné výsledky boli odčítané u ciprofloxacínu – pri kmeňoch *E. coli* a *P. aeruginosa*. Pri levofloxacíne boli odčítané hodnoty mimo normu u všetkých kmeňov. DMSO inhibovali rast pri koncentrácii 50% u *S. aureus* a 12,5% u ostatných kmeňov.

Výsledky testovania sú uvedené v tabuľkách 4, 5 a 6.

Tab. 4: Minimálna inhibičná koncentrácia antibiotík na vybrané druhy baktérii

	Ampicilín	Erytromycín	Ciprofloxacín	Levofloxacín
<i>S. aureus</i>	4 (0,5-2)	0,25 (0,25-1)	0,125 (0,12-0,5)	c.k. (0,06-0,5)
<i>E. faecalis</i>	0,5 (0,5-2)	1 (1-4)	0,5 (0,25-2)	0,125 (0,25-2)
<i>E. coli</i>	2 (2-8)	c.k. (c.k.)	0,25 (0,004-0,015)	c.k. (0,008-0,06)
<i>P. aeruginosa</i>	c.k. (c.k.)	c.k. (c.k.)	c.k. (0,25-1)	c.k. (0,5-4)

- Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie v mg/l
- Hodnoty v zátvorkách vyjadrujú hodnoty MIC dané normou
- c.k.: citlivý kmeň (nepřítomný nárast kolónii)

Tab. 5: Citlivosť na DMSO (hodnoty v percentách roztoku DMSO)

<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>
50	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5

Tab. 6: Testovanie kvasiniek

	<i>C. albicans</i>
Amfotericin B	0,5
DMSO (%)	12,5

- Amfotericin B: mg/l
- DMSO: hodnoty v percentách roztoku DMSO

### 3.6.2 Testovanie gram pozitívnych baktérii

Medzi gram pozitívnymi baktériami boli testované *S. aureus*, *E. faecalis* a *B. cereus*.

MIC pre *S. aureus* bola u väčšiny derivátov väčšia než 1024 mg/l, čo značí odolnosť stafylokoka voči testovaným látkam. Vyššiu účinnosť vykazovali deriváty VII. a VIII., kde bola MIC 1024 mg/l, no po 48 hodinách taktiež zodpovedala hodnotám väčším než testovaný

koncentračný rozsah. MIC pre derivát XV. činila 1024 mg/l už po 24 hodinách a najúčinnjšou látkou bol derivát XIII. s minimálnou inhibičnou koncentráciou 512 mg/l.

Účinnosť derivátov pri *E. faecalis* sa prejavovala väčšou diverzitou než u stafylokoka. Látky VII. až XVI. boli s hodnotami MIC 1024 mg/l alebo >1024 mg/l menej účinnými než deriváty VII., IX., X. a XI., u ktorých bola zistená minimálna inhibičná koncentrácia 256 mg/l. Derivát XI. taktiež zodpovedal rovnakým hodnotám, no po 48 hodinách bola odčítaná MIC 512 mg/l. U zvyšných látok boli zistené koncentrácie 1024 mg/l alebo viac než 1024 mg/l.

U *B. cereus* bol najúčinnjšou zlúčeninou derivát XIII., u ktorého bola odčítaná hodnota MIC 128 mg/l. Nasledoval derivát XV. s 256 mg/l a u zvyšných látok boli hodnoty MIC 512, resp. 1024 mg/l. Pri žiadnej z látok neboli zistené hodnoty vyššie než 1024 mg/l.

Podľa výsledkov sa dá usudzovať, že z testovaných gram pozitívnych mikroorganizmov vykazoval najvyššiu citlivosť pre deriváty sulfónamidov práve *B. cereus*, u ktorého nebolo zaznamenané prekročenie rozmedzia testovaných koncentrácií. Výsledky testovania sú uvedené v tabuľke 7.

### 3.6.3 Testovanie gram negatívnych baktérií

Z gram negatívnych baktérií bolo testovanie citlivosti vykonané pre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* a *P. mirabilis*.

Deriváty u *P. aeruginosa* vykazovali nízku účinnosť a hodnoty MIC pre väčšinu látok bola 1024 mg/l. Najmenej účinnou zlúčeninou bol derivát XV., kde MIC >1024 mg/l značila rezistentnosť *P. aeruginosa* v testovanom koncentračnom rozmedzí. Podobné výsledky boli odčítané aj pri baktériách *K. pneumoniae* a *P. mirabilis*, no pri viacerých derivátoch boli hodnoty MIC väčšie než 1024 mg/l (niekedy až po 48 hodinách) a látky boli voči klebsielle a proteu menej účinné. Najväčšiu citlivosť z testovaných gram negatívnych baktérií preukázala *E. coli*, kde u derivátov VI. a VII. boli hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie na úrovni 256 mg/l (so zvýšením na 512 mg/l po 48 hodinách). Deriváty s najmenšou účinnosťou voči *E. coli* boli XI., XII., XIII. a XV.

Z výsledkov vyplýva, že účinnosť derivátov je nižšia pri gram negatívnych baktériách než u gram pozitívnych zástupcoch. V priemere najvyššia citlivosť k testovaným látkam bola zistená u *E. faecalis*, v absolútnych číslach boli deriváty najúčinnjšie u *B. cereus* s najmenšou nameranou MIC 128 mg/l. Naproti tomu *E. faecalis* vykazoval v testovanom koncentračnom rozmedzí rezistenciu u troch derivátov, *B. cereus* bol na všetky zlúčeniny citlivý.

Zo zistených hodnôt vyplýva, že účinnosť testovaných derivátov sulfónamidov je nižšia než u klasických antibiotík.

Výsledky testovania sú uvedené v tabuľke 8.

#### 3.6.4 Testovanie kvasiniek

K testovaniu boli použité kmene *C. albicans* a *C. tropicalis*.

Najnižšia odčítaná hodnota MIC u *C. albicans* bola 256 mg/l, najvyššia 1024 mg/l. Vyššia účinnosť bola zistená u *C. tropicalis* s najnižšou hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie na úrovni 32 mg/l u zlúčeniny XVI. Naproti tomu väčšina derivátov vykazovala MIC 1024 mg/l.

Taktiež ako u testovaných baktérií, aj u zástupcoch kvasiniek boli deriváty menej účinné než klasické antibiotiká.

Výsledky testovania sú uvedené v tabuľke 9.

#### 3.6.5 Testovanie bakteriostatického a baktericídneho účinku

Bakteriostatický resp. baktericídny účinok derivátov bol testovaný vyočkovaním inokula z jamiek mikrotitračných doštičiek na pevné médium. Očkovalo sa z jamiek prislúchajúcich hodnotám MIC. Na Petriho miskách sa sledoval nárast kolónii, ktorý značil bakteriostatický účinok látky. Ak nárast nebol pozorovaný, látka mala baktericídne vlastnosti.

- *S. aureus*: pri väčšine látok bol nárast prítomný všade a nebolo nutné vyočkovanie na pevné médium. Tieto vzorky pôsobili bakteriostaticky. Pri MSA XIII. (MIC 512 mg/l) a MSA XV. (MIC 1024 mg/l) bolo vykonané vyočkovanie a deriváty sa prejavili ako bakteriostatické (viditeľný masívny nárast kolónii).
- *E. faecalis*: u každého testovaného derivátu došlo následne k vyočkovaniu na pevné médium; vo všetkých prípadoch bol účinok látok bakteriostatický (s prevažne masívnym nárastom).
- *B. cereus*: deriváty MSA II., V., X., XI. a XV. pôsobili baktericídne, keďže na Petriho miskách po vyočkovaní nebol viditeľný nárast kolónii. U derivátov III., IV., VI. a XVI. bol prítomný nárast, no len v malej miere, viditeľné ojedinelé kolónie. U zvyšných látok bol nárast masívny.

- *P. aeruginosa*: všetky testované zlúčeniny mali bakteriostatický účinok so zvyčajne masívnym nárastom, pri MSA VI. a XIII. bol nárast slabší a u MSA XV. boli prítomné ojedinelé kolónie.
- *E. coli*: všetky testované deriváty prejavili bakteriostatický účinok s masívnym nárastom kolónii na pevnom médiu, u MSA IX. bol nárast slabší.
- *K. pneumoniae*: všetky testované látky boli bakteriostatické a vyočkovanie nebolo potrebné, prípadne ak nebola MIC hraničná k vyočkovaniu došlo, no nárast bol prítomný (v masívnej miere) a potvrdil bakteriostatický účinok.
- *P. mirabilis*: bakteriostatický účinok všetkých derivátov, prítomný masívny nárast.
- *C. albicans* a *C. tropicalis*: u kvasiniek testovanie bakteriostatického resp. baktericídneho účinku nebolo vykonané.

Tab. 7: Hodnoty testovania pre gram pozitívne baktérie

G+	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>
I.	>1024	512	512
II.	>1024	256 (512; 48h)	1024
III.	>1024	512	1024
IV.	>1024	512	1024
V.	>1024	512	1024
VI.	>1024	256 (512, 48h)	1024
VII.	1024 (>1024, 48h)	256	512
VIII.	1024 (>1024, 48h)	512	512 (1024, 48h)
IX.	>1024	256	512 (1024, 48h)
X.	>1024	256	1024
XI.	>1024	256	512
XII.	>1024	>1024	512
XIII.	512	>1024	128
XIV.	>1024	1024	512
XV.	1024	1024	256
XVI.	>1024	>1024	1024

- Rímskymi číslicami značené sulfónamidy
- Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie v mg/l
- Hodnoty v zátvorkách vyjadrujú MIC po 48 hodinách kultivácie

Tab. 8: Hodnoty testovania pre gram negatívne baktérie

G-	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>
I.	1024	512	1024	1024
II.	1024	512 (>1024; 48h)	>1024	1024 (>1024, 48h)
III.	1024	512	>1024	1024
IV.	1024	512 (1024; 48h)	1024 (>1024, 48h)	1024 (>1024, 48h)
V.	1024	512 (1024; 48h)	>1024	1024
VI.	1024	256 (512, 48h)	>1024	1024 (>1024, 48h)
VII.	1024	256 (512, 48h)	1024	1024
VIII.	1024	512	>1024	1024 (>1024, 48h)
IX.	1024	512	>1024	1024 (>1024, 48h)
X.	1024	512	1024 (>1024, 48h)	1024 (>1024, 48h)
XI.	1024	>1024	1024 (>1024, 48h)	1024 (>1024, 48h)
XII.	1024	>1024	1024	1024 (>1024, 48h)
XIII.	1024	>1024	1024	1024
XIV.	1024	1024	1024	1024 (>1024, 48h)
XV.	>1024	>1024	1024	1024
XVI.	1024	512	1024	1024 (>1024, 48h)

- Rímskymi číslicami značené sulfónamidy
- Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie v mg/l
- Hodnoty v zátvorkách vyjadrujú MIC po 48 hodinách kultivácie

Tab. 9: Hodnoty testovania pre kvasinky

Kvasinky	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
I.	512	1024
II.	512	1024
III.	512	1024
IV.	256	1024
V.	256	1024
VI.	256	1024
VII.	256	1024
VIII.	256 (512; 48h)	1024
IX.	256 (512; 48h)	1024
X.	256 (512; 48h)	1024
XI.	256 (512; 48h)	1024
XII.	1024	256
XIII.	1024	512
XIV.	1024	512
XV.	1024	512
XVI.	1024	32

- Rímskymi číslicami značené sulfónamidy
- Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie v mg/l
- Hodnoty v zátvorkách vyjadrujú MIC po 48 hodinách kultivácie

## 4. ZÁVER

Cieľom práce bolo testovanie citlivosti vybraných bakteriálnych kmeňov a zástupcov eukaryotických mikroorganizmov *Candida* k morpholinomethylfenyl derivátom benzénsulfónamidov. Látky sú odvodené od benzénsulfónamidov, ktoré sa vyžívajú v klinickej liečbe, čo zvýšilo očakávania k účinnosti derivátov voči testovaným mikroorganizmom. Účinnosť látok, resp. citlivosť kmeňov bola testovaná mikrodilučnou metódou a bakteriostatický, prípadne baktericídny účinok bol preukázaný vyočkovaním na pevné médium.

Z výsledkov vyplýva, že voči stafylokokom sú účinné len dva deriváty (MSA XIII. a MSA XV.), zatiaľ čo ostatné deriváty *S. aurea* neinhibovali. Pri *E. faecalis* preukázali testované látky vyššiu účinnosť a inhibičnú schopnosť sa neprejavila len pri troch zlúčeninách (MSA XII., MSA XIII. a MSA XVI.). U *B. cereus* preukázali všetky deriváty inhibičné vlastnosti s pomerne dobrou účinnosťou (MIC 256 mg/l pri MSA XV.).

U gram negatívnej *P. aeruginosa* sa uplatnila väčšina derivátov až na MSA XV., kde bola MIC >1024 mg/l. Zvyšné látky vykazovali pomerne nízku účinnosť s hodnotami MIC 1024 mg/l. V prípade *K. pneumoniae* a *P. mirabilis* bola približne polovica testovaných látok neúčinná a zvyšné zlúčeniny vykazovali len slabú efektivitu s MIC 1024 mg/l. Lepšie výsledky boli odčítané pri *E. coli*, kde sa neuplatnili deriváty MSA XI., MSA XII., MSA XIII. a MSA XV., no deriváty MSA XI. a MSA XII. mali u gram negatívnych baktérii s MIC 256 mg/l najlepšiu účinnosť.

Inhibičná schopnosť zlúčenín pri kvasinkách bola lepšia než u gram negatívnych baktériách. Pri testovaní *C. albicans* bola viac než polovica derivátov účinná s MIC 256 mg/l. *C. tropicalis* vykázala miernu citlivosť taktiež u väčšiny derivátov (MIC 1024 mg/l), no u MSA XVI. s minimálnou inhibičnou koncentráciou 32 mg/l bol výsledok lepší.

Z odčítaných hodnôt sa dá usudzovať, že testované deriváty sulfónamidov majú potenciál skôr u gram pozitívnych baktérii a kvasiniek, než pri gram negatívnych kmeňoch, čo môže zodpovedať napr. inej fyziológii alebo zloženiu bunkovej steny mikroorganizmov. Záverom sa dá povedať, že deriváty mali určitý účinok voči všetkým testovaným kmeňom, no oproti bežne používaným antibiotikám bol nižší a potenciál testovaných látok uplatniť sa ako liečivá sa javí byť obmedzený.

## 5. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ALLANI, Baraa G. „synthesis of sulfanilamide“. Pharmacy college (presentation), 2021. [cit. 2021-07-12]. Dostupné z:  
[https://www.researchgate.net/publication/349805992\\_synthesis\\_of\\_sulfanilamide](https://www.researchgate.net/publication/349805992_synthesis_of_sulfanilamide)
2. ASINI, T. OWA, A. SCOZZAFAVA and C.T. SUPURAN. Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [online]. 2004, 14(1) [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1002/med.10047>. Dostupné z:  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X03010424?casa\\_token=qk6BzSkVBsIAAAAA:Vkg5BtQTSrREI7kMnduA4AqtEmdw-KNfCJfE4Z5g5JiNjJjeXqOZJJ25peJ-px2QxjedYViD2g#bBIB20](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X03010424?casa_token=qk6BzSkVBsIAAAAA:Vkg5BtQTSrREI7kMnduA4AqtEmdw-KNfCJfE4Z5g5JiNjJjeXqOZJJ25peJ-px2QxjedYViD2g#bBIB20)
3. ARGYROPOULOU, I., A. GERONIKAKI, P. VICINI and F. ZANI. Synthesis and biological evaluation of sulfonamide thiazole and benzothiazole derivatives as antimicrobial agents. *Inflow: Arkivoc*. [online]. 2009, 2009(6) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1551-7012. Dostupné z:  
<http://ikee.lib.auth.gr/record/225990/files/SynthesisandBiological.pdf>
4. AZZAM, R.A., R.E. ELSAYED and G.H. ELGEMEIE. Design and Synthesis of a New Class of Pyridine-Based N-Sulfonamides Exhibiting Antiviral, Antimicrobial, and Enzyme Inhibition Characteristics. *Inflow: ACS Omega*. [online]. 2020, 5(40) [cit. 2021-07-12]. ISSN 2470-1343. Dostupné z:  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.0c03773>
5. BAHRAMI, K., M.M. KHODAEI and J. ABBASI. Synthesis of sulfonamides and sulfonic esters via reaction of amines and phenols with thiols using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–POCl<sub>3</sub> system. *Inflow: Tetrahedron*. [online]. 2012, 68(25) [cit. 2021-07-07]. ISSN 0040-4020. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402012005583>



6. BASANAGOUDA, M., K. SHIVASHANKAR, M.V. KULKARNI, V.P. RASAL, H. PATEL, S.S. MUTHA and A.A. MOHITE. Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4-azidomethyl coumarin. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2010, 45(3) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409006655?casa\\_token=ai0EVHdqda0AAAAA:o1yA2wUzXIN0N7M7ADo2xHxKpJr8co3IoEsBxJ3H\\_u1kUViV516HSu-8rIwBZyufeFsYu2vCow#tbl1](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409006655?casa_token=ai0EVHdqda0AAAAA:o1yA2wUzXIN0N7M7ADo2xHxKpJr8co3IoEsBxJ3H_u1kUViV516HSu-8rIwBZyufeFsYu2vCow#tbl1)
7. Bayot, M.L. a B.N. BRAGG. Antimicrobial Susceptibility Testing. *Inflow: StatPearls: Treasure Island* [online]. StatPearls Publishing, 2021 [cit. 2021-7-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
8. BECHEKER, I., H. BERREDJEM, W. BOUFAS and B. MALIKA. The Antibacterial and Cytotoxic Activities of Four New Sulfonamides Against Clinical Gram-Negative Bacteria. *Inflow: Int. J. Pharm. Sci.* [online]. 2016, 39(2) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/307453398\\_The\\_Antibacterial\\_and\\_Cytotoxic\\_Activities\\_of\\_Four\\_New\\_Sulfonamides\\_Against\\_Clinical\\_Gram-Negative\\_Bacteria](https://www.researchgate.net/publication/307453398_The_Antibacterial_and_Cytotoxic_Activities_of_Four_New_Sulfonamides_Against_Clinical_Gram-Negative_Bacteria)
9. BENHAMÚ, B., M. MARTÍN-FONTECHA, H. VÁZQUEZ-VILLA, L. PARDO and M.L. LÓPEZ-RODRÍGUEZ. Serotonin 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonists for the Treatment of Cognitive Deficiency in Alzheimer's Disease. *Inflow: J. Med. Chem.* [online]. 2014, 57(17) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1520-4804. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm5003952>
10. BERREDJEM, H., Y. REGGAMI, M. BENLAIFA, M. BERREDJEM and N. BOUZERNA. Antidiabetic and Hypolipidemic Potential of 3, 4-dihydroisoquinolin-2(1H)- Sulfonamide in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Inflow: International Journal of Pharmacology*. [online]. 2015, 11(3) [cit. 2021-07-07]. doi: 10.3923/ijp.2015.226.235. Dostupné z: <https://scialert.net/fulltext/?doi=ijp.2015.226.235>

11. BOUCHOUCHA, A., S. ZAATER, S. BOUACIDA, H. MERAZIG and S. DJABBAR. Synthesis and characterization of new complexes of nickel (II), palladium (II) and platinum(II) with derived sulfonamide ligand: Structure, DFT study, antibacterial and cytotoxicity activities. *Inflow: Journal of Molecular Structure*. [online]. 2018, 1161 [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.02.057>. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286018302035?casa\\_token=JtgfYwQlsloAAAAA:6fTIFRHoZN1A3bMt1xjOf3UdV38pu0LJ9\\_VmKNYSXLbxbYIe2wiEmlxYjjP7Ju5JP3QLxib6FA](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286018302035?casa_token=JtgfYwQlsloAAAAA:6fTIFRHoZN1A3bMt1xjOf3UdV38pu0LJ9_VmKNYSXLbxbYIe2wiEmlxYjjP7Ju5JP3QLxib6FA)
12. CADDICK, C., J.D. WILDEN and D.B. JUDD. Direct Synthesis of Sulfonamides and Activated Sulfonate Esters from Sulfonic Acids. *Inflow: J. Am. Chem. Soc.* [online]. 2004, 126(4) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1520-5126. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja0397658>
13. COHEN, L.S. and L.E. CLUFF. The Sulfonamides. *Inflow: The American Journal of Nursing*. [online]. 1961, 61(6) [cit. 2021-06-29]. doi: 10.2307/3451714. Dostupné z: [www.jstor.org/stable/3451714](http://www.jstor.org/stable/3451714)
14. COPPOC, Gordon L. FOLIC ACID ANTAGONISTS: (Sulfonamides and Related Drugs). *Www.cyto.purdue.edu/* [online]. Purdue Research Foundation, 1996 [cit. 2021-6-30]. Dostupné z: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/17/chmrx/sulfas.htm>
15. DĄBROWSKI, J.M., L.G. ARNAUT, M.M. PEREIRA, K. Urbańskad and G. Stochela. Improved biodistribution, pharmacokinetics and photodynamic efficacy using a new photostable sulfonamide bacteriochlorin. *Inflow: Med. Chem. Commun.* [online]. 2012, 3(4) [cit. 2021-07-01]. ISSN 2040-2511. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/md/c2md00308b>

16. FARAH, Y., O. MANSOUR and J. HERBALI. Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). *Inflow: In-vitro In-vivo In-silico Journal*. [online]. 2018, 1(1) [cit. 2021-06-29]. ISSN Coming Soon. Dostupné z: <https://openaccesspub.org/ijij/article/749>
17. FERNÁNDEZ-VILLA, D., M.R. AGUILAR and L. ROJO. Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Inflow: International Journal of Molecular Sciences*. [online]. 2019, 20(20) [cit. 2021-06-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829374/>
18. GAO, Hai-De, P. LIU, Y. YANG and F. GAO. Sulfonamide-1,3,5-triazine-thiazoles: discovery of a novel class of antidiabetic agents via inhibition of DPP-4. *Inflow: RSC Advances*. [online]. 2016, 6(86) [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1039/C6RA15948F>. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c6ra15948f/unauth#!divAbstract>
19. GAUDILLIÈRE, Jean-Paul. Review of *The First Miracle Drugs: How the Sulfa Drugs Transformed Medicine*. *Bulletin of the History of Medicine*. *Inflow: Bulletin of the History of Medicine*. [online]. 2009, 83(1) [cit. 2021-06-29]. ISSN 1086-3176. Dostupné z: <https://muse.jhu.edu/article/261689>
20. GEITMAN, I.Y., N.P. NEUGODOVA, N.N. Tseitlin and G. Ya. KIVMAN. Pharmacokinetics of sulfalene in man depending on the drug form. *Inflow: Pharmaceutical Chemistry Journal*. [online]. 1979, 13(8) [cit. 2021-07-01]. ISSN 1573-9031. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F00772216#citeas>
21. GONG L., C.F. THORN, M.M. BERTAGNOLLI, T. GROSSER, R.B. ALTMAN and T.E. KLEIN. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Inflow: Pharmacogenet*

*Genomics*. [online]. 2012, 22(4) [cit. 2021-07-07]. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834f94cb.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303994/>

22. GUERRA, J.G., E. FALCONI, J.C. PALOMINO, L. BENAVENTE and E. ANTUNEZ de MAYOLO. Clinical evaluation of norfloxacin versus cotrimoxazole in urinary tract infections. *Inflow: European Journal of Clinical Microbiology*. [online]. 1983, 2 [cit. 2021-07-07]. doi:

<https://doi.org/10.1007/BF02029529>. Dostupné z:

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02029529>

23. HELMHOLZ, Henry F. The use of sulfanilamide as a urinary antiseptic. *Inflow: The Journal of Pediatrics*. [online]. 1937, 11(2) [cit. 2021-07-07]. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(37\)80129-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(37)80129-8). Dostupné z:

[https://www.jpeds.com/article/S0022-3476\(37\)80129-8/fulltext](https://www.jpeds.com/article/S0022-3476(37)80129-8/fulltext)

24. HIGGINS, A.F., A. LEWIS, P. NOONE, M.L. HOLE. Single and multiple dose cotrimoxazole and metronidazole in colorectal surgery. *Inflow: British Journal of Surgery*. [online]. 1980, 67(2) [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1002/bjs.1800670206>. Dostupné z:

<https://bjssjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bjs.1800670206>

25. HORN, M., A. JÍLKOVÁ and M. MAREŠ. Katepsinove proteazy v patologii. *Inflow: Chemické listy*. [online]. 2014, 108(4) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z:

<http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/524>

26. HOSSEIN N., M. SARGOLZAEI and F. FARIDBOD. Prediction of physico-chemical properties of bacteriostatic N1-substituted sulfonamides: Theoretical and experimental studies. *Inflow: Acta Chimica Slovenica*. [online]. 2017, 64(4) [cit. 2021-06-30]. ISSN 1580-3155. Dostupné z:

<https://journals.matheo.si/index.php/ACSi/article/view/3357>

27. CHOCHAN, Z.H., A. RAUF, M.M. NASEER, M.A. SOMRA and C.T. SUPURAN. Antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of some sulfonamide-derived chromones. *Inflow: Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. [online]. 2006, 21(2) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1475-6374. Dostupné z:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756360500533059>
28. CHOCHAN, Z.H., A.U. SHAIKH, M.M. NASEER and C.T. SUPURAN. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of metal-based furanyl derived sulfonamides. *Inflow: Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. [online]. 2006, 21(6) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1475-6374. Dostupné z:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756360600829316>
29. CHOCHAN, Z.H., M.H. YOUSOUFI, A. JARRAHOUPUR and T.B. HADDA. Identification of antibacterial and antifungal pharmacophore sites for potent bacteria and fungi inhibition: Indolenyl sulfonamide derivatives. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2010, 45(3) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409005996>
30. CHOCHAN, Z.H., H.A. SHAD, M.H. YOUSOUFI and T.B. HADDA. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2010, 45(7) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z:  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S022352341000228X?casa\\_token=UZ9ZjsJlj50AAAAA:JKp5F56YjU-MWxK4ssouJWIZb1hF53At5y-9o6LWIF0SpSSb9MEC1FwOFqAqyF4GZn5SIcXoMA](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S022352341000228X?casa_token=UZ9ZjsJlj50AAAAA:JKp5F56YjU-MWxK4ssouJWIZb1hF53At5y-9o6LWIF0SpSSb9MEC1FwOFqAqyF4GZn5SIcXoMA)
31. JABUSCH, T.W. and R.S. TJEERDEMA. Partitioning of Penoxsulam, a New Sulfonamide Herbicide. *Inflow: J. Agric. Food Chem.* [online]. 2005, 53(18) [cit. 2021-07-07]. doi:  
<https://doi.org/10.1021/jf050767g>. Dostupné z:  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf050767g>

32. JAYACHANDRAN, S., A. LLERAS-MUNNEY and K.V. SMITH. Modern Medicine and the Twentieth Century Decline in Mortality: Evidence on the Impact of Sulfa Drugs. *Inflow: American Economic Journal: Applied Economics*. [online]. 2010, 2(2) [cit. 2021-06-29]. ISSN 1945-7790. Dostupné z:  
<https://faculty.wcas.northwestern.edu/~sjv340/sulfa.pdf>
33. KARATUNA, Onur et al. Quality Assurance in Antimicrobial Susceptibility Testing. AKYAR, Isin. *Latest Research into Quality Control* [online]. 2012 [cit. 2021-7-12]. ISBN 978-953-51-5141-8. Dostupné z:  
<https://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/quality-assurance-in-antimicrobial-susceptibility-testing>
34. KAWAI, T., I. KAZUHIKO, N. TAKAYA, Y. YAMAGUCHI, R. KISHII, Y. KOHNO and H. KURASAKI. Sulfonamide-based non-alkyne LpxC inhibitors as Gram-negative antibacterial agents. *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [online]. 2017, 27(4) [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.059>. Dostupné z:  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X16313385?casa\\_token=TCVfvqTCLUIAAAAA:PDfpWTmjpWMjfuH\\_QyDp4SwQNj-f-JGZRSVb0MufO5z36gwOuxe\\_H0y5NKeFwdK07ih4bTKHrw](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X16313385?casa_token=TCVfvqTCLUIAAAAA:PDfpWTmjpWMjfuH_QyDp4SwQNj-f-JGZRSVb0MufO5z36gwOuxe_H0y5NKeFwdK07ih4bTKHrw)
35. KECHE, A.P., G.D. HATNAPURE, R.H. TALE, A.H. RODGE, S.S. BIRAJDAR and V.M. KAMBLE. A novel pyrimidine derivatives with aryl urea, thiourea and sulfonamide moieties: Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial evaluation. *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [online]. 2012, 22(10) [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.092>. Dostupné z:  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12004222?casa\\_token=7-QO35XBIzAAAAAA:O8-BL5RkpM\\_EbU4GTnBPhrMi536mWkoOOGPG7RFY7jLyCHP\\_-LXxVYhW2PKUFL6SAxzS0VEMyA](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12004222?casa_token=7-QO35XBIzAAAAAA:O8-BL5RkpM_EbU4GTnBPhrMi536mWkoOOGPG7RFY7jLyCHP_-LXxVYhW2PKUFL6SAxzS0VEMyA)

36. KHOLODOV, L.E., L.M. POLUKHINA, E.T. LILYN, L.P. KLIMOVA, A.A. OSTROVSKAYA, T.A. GEMBITSKAYA and R.M. ZASLAVSKAYA. Pharmacokinetics of sulfalene. II. Clinical study. hereditary causes of pharmacokinetic parameters. *Inflow: Pharmaceutical Chemistry Journal*. [online]. 1978, 12 [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01188701>. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01188701>
37. KOCK, de M., J. TARNING, L. WORKMAN, M.M. NYUNT, I. ADAM, K.I. BARNES and P. DENTI. Pharmacokinetics of Sulfadoxine and Pyrimethamine for Intermittent Preventive Treatment of Malaria During Pregnancy and After Delivery. *Inflow: CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. [online]. 2017, 6(7) [cit. 2021-07-07]. doi: 10.1002/psp4.12181. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5529735/>
38. KOŁACZEK, A., I. FUSIARZ, J. ŁAWECKA and D. BRANOWSKA. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. *Inflow: Chemik, BioMed Central*. [online]. 2014, 68(7) [cit. 2021-07-07]. ISSN 0009-2886. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Rafik\\_Karaman/post/im\\_working\\_on\\_sulphonamids\\_antibacterial\\_does\\_any\\_one\\_prepear\\_any\\_analogs\\_for\\_sulphonamids\\_and\\_which\\_rout\\_he\\_use\\_paper\\_are\\_needed\\_thanks/attachment/59d6355a79197b8077992ee6/AS%3A383878217912320%401468535107273/download/Sulfonamides+1.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rafik_Karaman/post/im_working_on_sulphonamids_antibacterial_does_any_one_prepear_any_analogs_for_sulphonamids_and_which_rout_he_use_paper_are_needed_thanks/attachment/59d6355a79197b8077992ee6/AS%3A383878217912320%401468535107273/download/Sulfonamides+1.pdf)
39. KOŁACZKOWSKI, M., M. NOWAK, M. PAWŁOWSKI and A.J. BOJARSKI. Receptor-Based Pharmacophores for Serotonin 5-HT<sub>7</sub>R Antagonists-Implications to Selectivity. *Inflow: J. Med. Chem*. [online]. 2006, 49(23) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1520-4804. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm060300c>
40. KRAJAČIĆ, M.B., P. NOVAK, M. CINDRIĆ, K. BRAJŠA, M. DUMIĆ and N. KUJUNDŽIĆ. Azithromycin–sulfonamide conjugates as inhibitors of resistant *Streptococcus pyogenes* strains. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2007, 42(2) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523406002844?casa\\_token=c5VkWlvktesAAAAA:A6QaA9ep1FLXyzNr-gE0ynIPxKBoZvnbbAULOXM3knn-0zla60VsxtsdXYwMOBrrqOhJ38x3QQ](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523406002844?casa_token=c5VkWlvktesAAAAA:A6QaA9ep1FLXyzNr-gE0ynIPxKBoZvnbbAULOXM3knn-0zla60VsxtsdXYwMOBrrqOhJ38x3QQ)

41. LAL, J., S.K. GUPTA, D. THAVASELVAM and D.D. AGARWAL. Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2013, 64 [cit. 2021-07-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523413001608?casa\\_token=W5UvI4biKAAAAAAA:caFzchJDo2kPNQFAddEjMkidRreThE1L6MV18fU4CMVF4ygKeRCZYyQCEiB7fNDmBCe8jLzXDA](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523413001608?casa_token=W5UvI4biKAAAAAAA:caFzchJDo2kPNQFAddEjMkidRreThE1L6MV18fU4CMVF4ygKeRCZYyQCEiB7fNDmBCe8jLzXDA)
42. LIU, W. et al. A Strategy for the Synthesis of Sulfonamides on DNA. *Inflow: Org. Lett.* [online]. 2019, 21(24) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1523-7052. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.orglett.9b03843>
43. LOH, B., L. VOZZOLO, B.J. MOK, Ch.Ch. LEE, R.J. FITZMAURICE, S. CADDICK and A. FASSATI. Inhibition of HIV-1 Replication by Isoxazolidine and Isoxazole Sulfonamides. *Inflow: Chemical Biology & Drug Design*. [online]. 2010, 75(5) [cit. 2021-07-07]. doi: 10.1111/j.1747-0285.2010.00956.x. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1747-0285.2010.00956.x>
44. MARWA, K.J., M.F. MUSHI, E. KONJE, P.E. ALELE, J. KIDOLA and M.M. MIRAMBO. Resistance to Cotrimoxazole and Other Antimicrobials among Isolates from HIV/AIDS and Non-HIV/AIDS Patients at Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania. *Inflow: AIDS Research and Treatment*. [online]. 2015, 2015 [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/103874>. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/art/2015/103874/>



45. MERCER, D.K. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Inflow: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. [online]. 2020, 10 [cit. 2021-07-12]. doi: 10.3389/fcimb.2020.00326. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00326/full>
46. MERMIN, J. et al. Cotrimoxazole prophylaxis by HIV-infected persons in Uganda reduces morbidity and mortality among HIV-uninfected family members. *Inflow: AIDS*. [online]. 2005, 19(10) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1473-5571. Dostupné z: [https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2005/07010/Reversion\\_of\\_metabolic\\_abnormalities\\_after.8.aspx](https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2005/07010/Reversion_of_metabolic_abnormalities_after.8.aspx)
47. MIZDAL, C.R., S.T. STEFANELLO, P.A. NOGARA, F.A.A. SOARES, Lenice de LOURENÇO MARQUES and M.M.A. de CAMPOSA. Molecular docking, and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides on *Pseudomonas aeruginosa*. *Inflow: Microbial Pathogenesis*. [online]. 2018, 125 [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.004>. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018315754?casa\\_token=sLQyxVjWDi8AAAAA:LjRQebOcMHFKsfAu89TZV1GuJz9oYVXfG-5Y1r1F1MhQx\\_7ayB6-RtOFMgiRjMLvXO5hDvQYkw](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018315754?casa_token=sLQyxVjWDi8AAAAA:LjRQebOcMHFKsfAu89TZV1GuJz9oYVXfG-5Y1r1F1MhQx_7ayB6-RtOFMgiRjMLvXO5hDvQYkw)
48. MONDAL, Sumanta. INSTITUTE OF PHARMACY, GITAM. *Sulfonamides: Lecturer Notes* [online]. 2017 [cit. 2021-6-29]. doi:10.13140/RG.2.2.30831.94882. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/321938118\\_Sulfonamides](https://www.researchgate.net/publication/321938118_Sulfonamides)
49. MWAUNGULU, F.B.D., Sian FLOYD, Amelia C. CRAMPIN et al. Cotrimoxazole prophylaxis reduces mortality in human immunodeficiency virus-positive tuberculosis patients in Karonga District, Malawi. *Bulletin of the World Health Organisation* [online]. SciELO - Scientific Electronic Library, 2004, **82**(5), 354-363 [cit. 2021-7-12]. Dostupné z: <https://www.scielosp.org/article/bwho/2004.v82n5/354-363/en/#ModalArticles>

50. NGUYEN, S., A. PASQUET, L. LEGOUT, E. BELTRAND, L. DUBREUIL, H. MIGAUD, Y. YAZDANPANAHA and E. SENNEVILLE. Efficacy and tolerance of rifampicin–linezolid compared with rifampicin–cotrimoxazole combinations in prolonged oral therapy for bone and joint infections. *Inflow: Clinical Microbiology and Infection*. [online]. 2009, 15(12) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1469-0691. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14648618>
51. ÖZBEK, N., H. KATIRCIOĞLU, N. KARACAN and T. BAYKAL. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry*. [online]. 2007, 15(15) [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.05.037>. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808960700452X?casa\\_token=gCbiIw\\_qHhQAAAAA:PASQkaIwak872OvyYwm7IFoMKl6fPYBlpmGx7oL0kQMk1n1F7qA5YMrIuAk\\_EnayJYXMitwy0A](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808960700452X?casa_token=gCbiIw_qHhQAAAAA:PASQkaIwak872OvyYwm7IFoMKl6fPYBlpmGx7oL0kQMk1n1F7qA5YMrIuAk_EnayJYXMitwy0A)
52. ÖZDEMİR, Ü.Ö., P. GÜVENÇ, E. ŞAHİN and F. HAMURCU. Synthesis, characterization and antibacterial activity of new sulfonamide derivatives and their nickel(II), cobalt(II) complexes. *Inflow: Inorganica Chimica Acta*. [online]. 2009, 362(8) [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2008.11.029>. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169308006981?casa\\_token=O723I8sT-P0AAAAA:1q9x7jetNNIRxuhQsm8pr8PvCGmxn5eAl7Vkl7J1lq-XA\\_tjqYKoPoJewFRHSv9DSGQF4ltzRg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169308006981?casa_token=O723I8sT-P0AAAAA:1q9x7jetNNIRxuhQsm8pr8PvCGmxn5eAl7Vkl7J1lq-XA_tjqYKoPoJewFRHSv9DSGQF4ltzRg)
53. ÖZKAN, H. and B. DEMIRCI. Synthesis and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Sulfonamide Derivatives Containing Tetrazole and Oxadiazole Rings. *Inflow: J. Heterocyclic Chem.* [online]. 2016, 56(9) [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1002/jhet.3647>. Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jhet.3647?casa\\_token=TAmcgzzOxFYAAAA%3ANZF6rkICNKBiVdpX-\\_T52ynvI6L0bZSnv67KRqFNmzvLd3YOi\\_Q6az0OBT8wyp8prbKkxDBMc0NXacI](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jhet.3647?casa_token=TAmcgzzOxFYAAAA%3ANZF6rkICNKBiVdpX-_T52ynvI6L0bZSnv67KRqFNmzvLd3YOi_Q6az0OBT8wyp8prbKkxDBMc0NXacI)

54. PESCHERS, U.M., V. KEMPF, K. JUNDT, I. AUTENRIETH and T. DIMPFL. Antibiotic Treatment to Prevent Urinary Tract Infections after Urodynamic Evaluation. *Inflow: Int Urogynecol J.* [online]. 2001, 12 [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1007/s001920170048>. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s001920170048>
55. QADIR, M.A., M. AHMED and M. IQBAL. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of novel sulfonamides derived through condensation of amino group containing drugs, amino acids, and their analogs. *Inflow: Biomed Res Int.* [online]. 2015, 2015 [cit. 2021-07-07]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354722/>
56. QADIR, M.A., M. AHMED, H. ASLAM, S. WASEEM and M.I. SHAFIQ. Amidine Sulfonamides and Benzene Sulfonamides: Synthesis and Their Biological Evaluation. *Inflow: Journal of Chemistry.* [online]. 2015, 2015 [cit. 2021-07-12]. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/524056>. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/524056/>
57. QADIR, M.A., M. AHMED and A. KHALEEQ. Synthesis, antibacterial and antifungal possession of amino acids containing sulfonamide moieties. *Inflow: Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* [online]. 2016, 29(5) [cit. 2021-07-21]. ISSN 1011-601X. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/306510753\\_Synthesis\\_antibacterial\\_and\\_antifungal\\_possession\\_of\\_amino\\_acids\\_containing\\_sulfonamide\\_moieties](https://www.researchgate.net/publication/306510753_Synthesis_antibacterial_and_antifungal_possession_of_amino_acids_containing_sulfonamide_moieties)
58. RAI, D. and R.K. SINGH. Synthesis and antibacterial activity of benzamides and sulfonamide derived from 2-amino-5-bromo/nitropyridine against bacterial strains isolated from clinical patients. *Inflow: Indian Journal of Chemistry.* [online]. 2011, 50B(7) [cit. 2021-07-12]. ISSN 0975-0983. Dostupné z:

<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/12098/1/IJCB%2050B%287%29%20931-936.pdf>

59. REDDY, N.S., M.R. MALLIREDDIGARI, S. COSENZA, K. GUMIREDDY, S.C. BELL, E.P. REDDY and M.V.R. REDDY. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [online]. 2004, 14(15) [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.016>. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X04006511?casa\\_token=PMwMrKRzNAoAAAAA:XZazEbpY0W5it3vBginG1j5R4ZQU4ubo5iZgzQzBrpr6cOsmLMZk\\_6P5QS7f9uXB8LUttftazg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X04006511?casa_token=PMwMrKRzNAoAAAAA:XZazEbpY0W5it3vBginG1j5R4ZQU4ubo5iZgzQzBrpr6cOsmLMZk_6P5QS7f9uXB8LUttftazg)
60. RUBIN, P. Gerhard Domagk (1895-1964) and the Origin of Anti- Bacterial Therapy. *Inflow: Internal Med Res Open J*. [online]. 2018, 3(2) [cit. 2021-06-29]. doi: 10.31038/IMROJ.2018322. Dostupné z: <https://researchopenworld.com/gerhard-domagk-1895-1964-and-the-origin-of-anti-bacterial-therapy/>
61. RUSSELL, M.H., J.L. SALADINI and F. LICHTNER. Sulfonylurea herbicides. *Inflow: Pestic. Outlook*. [online]. 2002, 13(4) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1465-8933. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2002/PO/b206509f>
62. SAGHIR, S.A. and R.A. ANSARI. *Reference Module in Biomedical Sciences: Pharmacokinetics* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2021-7-1]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383621542>
63. SERENI, F., L. PERLETTI, E. MARUBINI and G. MARS. Pharmacokinetic Studies with a Long-Acting sulfnamide in Subjects of Different Ages: A Modern Approach to Drug Dosage Problems in Developmental Pharmacology. *Inflow: Pediatr Res*. [online]. 1968, 2(1) [cit. 2021-07-01]. ISSN 1530-0447. Dostupné z:

<https://www.nature.com/articles/pr19683>

64. SHAABANI, A., E. SOLEIMANI and A.H. Rezayan. A novel approach for the synthesis of alkyl and aryl sulfonamides. *Inflow: Tetrahedron*. [online]. 2007, 48(12) [cit. 2021-07-07]. ISSN 0040-4020. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403907001487>
65. SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J.J.C. ARTS and P. HABIBOVIC. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *Inflow: Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. [online]. 2018, 37(2) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1435-4373. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780537/>
66. SIBERRY, George Kelly et al. 113 - Management of HIV Infection. LONG, Sarah S., Charles G. PROBER a Marc FISCHER. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* [online]. Fifth Edition. Elsevier, 2018, 681-689.e2 [cit. 2021-7-12]. ISBN 978-0-323-40181-4. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323401814001134>
67. SKÖLD, Ola. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Inflow: Veterinary Research, BioMed Central*. [online]. 2001, 32(3-4) [cit. 2021-07-07]. doi: 10.1051/vetres:2001123. Dostupné z:  
<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902703/document>
68. SKÖLD, Ola. Sulfonamides and trimethoprim. *Inflow: Expert Review of Anti-infective Therapy*. [online]. 2010, 8(1) [cit. 2021-06-30]. ISSN 1744-8336. Dostupné z:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.09.117>

69. SKÖLD, O. and G. SWEDBERG. Sulfonamides and Trimethoprim. MAYERS, Douglas L., Jack D. SOBEL, Marc OUELLETTE, Keith S. KAYE a Dror MARCHAIM. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume I* [online]. Second Edition. Springer International Publishing, 2017, s. 345-358 [cit. 2021-6-30]. ISBN 978-3-319-46718-4. Dostupné z:  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-46718-4\\_24](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-46718-4_24)
70. SORIANO-CORREA, C., R.O. ESQUIVEL and R.P. SAGAR. Physicochemical and structural properties of bacteriostatic sulfonamides: Theoretical study. *Inflow: International Journal of Quantum Chemistry*. [online]. 2003, 94(3) [cit. 2021-06-30]. ISSN 1097-461X. Dostupné z:  
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/qua.10597?casa\\_token=RiNETlkLdn0AAA%3AK8ruFpmgrF4zHwf3gboclEzfVyDv2ED0\\_WiBOs8pmuXXb\\_kaO7M3BZjC8w6MwcjYUhrwjP4xewluSvg%3Fsaml\\_referrer](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/qua.10597?casa_token=RiNETlkLdn0AAA%3AK8ruFpmgrF4zHwf3gboclEzfVyDv2ED0_WiBOs8pmuXXb_kaO7M3BZjC8w6MwcjYUhrwjP4xewluSvg%3Fsaml_referrer)
71. STEMPAK, D., J. GAMMON, J. HALTON, M. CHAMPAGNE, G. KOREN and S. BARUCHEL. Modulation of Celecoxib Pharmacokinetics by Food in Pediatric Patients. *Inflow: Clinical Pharmacology & Therapeutics*. [online]. 2005, 77(3) [cit. 2021-07-07]. ISSN 1532-6535. Dostupné z:  
<https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.clpt.2004.10.015>
72. SUPURAN, C.T., A. CASINI and A. SCOZZAFAVA. Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Inflow: Med. Res. Rev.* [online]. 2003, 23 [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1002/med.10047>. Dostupné z:  
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.10047?casa\\_token=C6xBU0FWg-QAAAAA:a0315-midsyur4wiUQyWHj6Bbpcmboizl3H0fjmRPH8WuZE14PzObeZsyEtx6PP0twGM4-PVg7LEXIQ](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.10047?casa_token=C6xBU0FWg-QAAAAA:a0315-midsyur4wiUQyWHj6Bbpcmboizl3H0fjmRPH8WuZE14PzObeZsyEtx6PP0twGM4-PVg7LEXIQ)

73. TAČIĆ, A., V. NIKOLIĆ, L. NIKOLIĆ and I. SAVIĆ. Antimicrobial sulfonamide drugs. *Inflow: Advanced technologies*. [online]. 2017, 6(1) [cit. 2021-06-29]. doi: 10.5937/savteh1701058T. Dostupné z: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2406-2979/2017/2406-29791701058T.pdf>
74. TAHRIRI, M., M. YOUSEFI, K. MEHRANI, M. TABATABAEE and M.D. ASHKEZARI. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Two Novel Sulfonamide Schiff Base Compounds. *Inflow: Pharmaceutical Chemistry Journal*. [online]. 2017, 51(5) [cit. 2021-07-12]. doi: 10.1007/s11094-017-1626-z. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11094-017-1626-z>
75. TANG, C. et al. In-vitro metabolism of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, by allelic variant forms of human liver microsomal cytochrome P450 2C9: correlation with CYP2C9 genotype and in-vivo pharmacokinetics. *Inflow: Pharmacogenetics*. [online]. 2001, 11(3) [cit. 2021-07-07]. ISSN 0960-314X. Dostupné z: [https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/Abstract/2001/04000/In\\_vitro\\_metabolism\\_of\\_celecoxib,\\_a.6.aspx?sessionEnd=true](https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/Abstract/2001/04000/In_vitro_metabolism_of_celecoxib,_a.6.aspx?sessionEnd=true)
76. WEXLER, D.J. Sulfonylureas and meglitinides in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *UpToDate* [online]. [cit. 2021-7-12]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/sulfonylureas-and-meglitinides-in-the-treatment-of-type-2-diabetes-mellitus>
77. WORMSER, G.P., G.T. KEUSCH and R.C. HEEL. Co-trimoxazole(Trimethoprim-sulfamethoxazole). *Inflow: Drugs*. [online]. 1982, 24 [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.2165/00003495-198224060-00002>. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-198224060-00002>
78. ZAJDEL, P. et al. Antidepressant and antipsychotic activity of new quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole targeting serotonin 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>2A</sub>/5-

HT7 and dopamine D2/D3 receptors. *Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry*. [online]. 2013, 60 [cit. 2021-07-07]. ISSN 0223-5234. Dostupné z:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412007192?casa\\_token=fzvRLT6RLDwAAAAA:HLQaS2NaHbZ3F1nIgdFvC0gGw3ZQuILt1mrI0a2A8i7CUZVRGNH5HFiAokeE6V2-RCBVbD-yvg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412007192?casa_token=fzvRLT6RLDwAAAAA:HLQaS2NaHbZ3F1nIgdFvC0gGw3ZQuILt1mrI0a2A8i7CUZVRGNH5HFiAokeE6V2-RCBVbD-yvg)

79. ZHAO, Z. et al. Novel indole-3-sulfonamides as potent HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). *Inflow: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. [online]. 2008, 18(2) [cit. 2021-07-07]. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.085>. Dostupné z:

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X07013960?casa\\_token=yCQFW\\_5\\_q9wAAAAA:M1CBcOpltlJiNFhLnQDIH-4O1pN03DXEIcbYxy7oDrqRcY1toBh1sn4Bs7iQbAH-hz\\_0oP4dg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X07013960?casa_token=yCQFW_5_q9wAAAAA:M1CBcOpltlJiNFhLnQDIH-4O1pN03DXEIcbYxy7oDrqRcY1toBh1sn4Bs7iQbAH-hz_0oP4dg)

80. ZINNER, S.H., MAYER, K.H. et al. 33 - Sulfonamides and Trimethoprim. BENNETT, John E., Raphael DOLIN and Martin J. BLASER. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* [online]. Eighth Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015, s. 410-418 [cit. 2021-6-29]. ISBN 9781455748013. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455748013000333>

#### **Korporácie a internetové zdroje bez konkrétneho autora:**

- *Antimicrobial Susceptibility Testing* [online]. University Collage Dublin [cit. 2021-7-12]. Dostupné z:

[https://www.ucd.ie/vthweb/t4media/UCDVH\\_VDL\\_Vitek\\_Info\\_document.pdf](https://www.ucd.ie/vthweb/t4media/UCDVH_VDL_Vitek_Info_document.pdf)

- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "*sulfa drug*". [online]. 20.07.1998. 28.06.2017 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z:

<https://www.britannica.com/science/sulfonamide>



- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "*Sulfonamide drugs*". [online]. ©2021 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/history-of-medicine/Medicine-in-the-20th-century#ref412865>
- DrugBank. *Sulfasalazine*. [online]. 13.06.2005. 27.06.2021 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00795>
- DrugBank. *Sulfisoxazole*. [online]. 13.06.2005. 27.06.2021 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00263>
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Inflow: Clinical Microbiology and Infection*. [online]. 2000, 6(9) [cit. 2021-07-12]. ISSN 1469-0691. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>
- PubChem. *Sulfanilamide*. [online]. 16.09.2004. 03.07.2021 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfanilamide>
- PubChem. *Naratriptan*. [online]. 25.03.2005. 26.06.2021 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naratriptan>
- PubChem. *Sulfamethoxazole*. [online]. 25.03.2005. 03.07.2021 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole>

- PubChem. *Sulfisoxazole*. [online]. 25.03.2005. 26.06.2021 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfisoxazole>
- PubChem. *Sulfalene*. [online]. 26.03.2005. 03.07.2021 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfalene>
- PubChem. *Sulfadoxine*. [online]. 26.03.2005. 03.07.2021 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadoxine>
- RxList. *Sulfanilamide*. [online]. 27.01.2020 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: [https://www.rxlist.com/consumer\\_avc\\_sulfanilamide/drugs-condition.htm](https://www.rxlist.com/consumer_avc_sulfanilamide/drugs-condition.htm)
- Sermo. *Colorful History of a Miracle Drug (Sulfanilamide)*. [online]. 02.05.2017 [cit. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://www.sermo.com/blog/insights/colorful-history-miracle-drug-sulfanilamide/>
- VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. "poločas, biologický ". [online]. © 1998-2021 | [cit. 2021-07-01]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/polocas-biologicky>
- WikiSkripta. *Reverzní transkriptáza*. [online]. 22.01.2012. 07.05.2021 [cit. 2021-07-07]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Reverzn%C3%AD\\_transkript%C3%A1za](https://www.wikiskripta.eu/w/Reverzn%C3%AD_transkript%C3%A1za)