

Kam směřuje vývoj nových antituberkulotik?

Where does the development of new antituberculosics aim at?

Karel Waisser

Došlo 24. května 2012 / Přijato 11. července 2012

Souhrn

Několik vědeckých skupin v České a Slovenské republice je orientováno na vývoj antituberkulotik. Uveřejněný článek byl připraven převážně z informací z Chemical Abstracts z roku 2011 a počátku roku 2012. Je to výběr z téměř 3000 zpráv pro pomoc našim vědeckým pracovníkům. Článek přináší aktuální informace, které mohou zajímat širokou farmaceutickou veřejnost.

Klíčová slova: *Mycobacterium tuberculosis* • antituberkulotika • multirezistentní mykobakterie • QSAR • hodnocení *in vivo* • biochemie mykobakterií

Summary

Several research teams in the Czech and Slovak Republics are oriented on the development of new antituberculosics. The present article is based mainly on the information from the Chemical Abstracts from the year 2011 and the beginning of the year 2012. It is a selection from almost three thousand reports aiming to help our scientists. The article presents topical information which may be of interest to several pharmaceutical professions.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* • antituberculosics • multiresistant *mycobacteria* • QSAR • evaluation *in vivo* • biochemistry of *mycobacteria*

Úvod

V osmdesátých letech 20. století jsme uveřejnili soubor přehledných sdělení o vývoji antituberkulotik za posledních 15 let. Tehdy ročně vycházelo okolo 20 původních prací. Bylo snadné je sledovat a před sepsáním původních sdělení je utřídit podle struktur antimykobakteriálně účinných látek. Odborné prognózy předpokládaly, že okolo roku 2000 tuberkulóza přestane být v technicky vyspělé části světa hrozbou. V současné době se však tuberkulóza dostává do popředí zájmu farmaceutické chemie. V tabulce 1 je uvedena statistika prací (podle Chem. Abstr.) věnovaných vývoji nových anti-

tuberkulotik. Co způsobilo to, že zájem o tento obor patří dnes mezi přední? V roce 2008 bylo celosvětově diagnostikováno 9,4 milionů nových případů onemocnění a 1,9 milionů postižených zemřelo¹⁾. V rozvojové části světa byla to nedostatečná lékařská péče. Určitou roli zde hrál i nedostatek finančních prostředků. K příčině potíží lze připočítat i neukázněnost pacientů, opouštějících chemoterapii onemocnění ještě před jeho úplným vyléčením. Tak vznikaly multirezistentní kmeny mykobakterií, vzdorující soudobým léčivům. Pro současnou velkou migraci obyvatelstva se rezistentní kmeny dostávaly do vyspělé části světa. Velký vliv má i choroba HIV. Pacienti se sníženou imunitou velmi často umírají na mykobakteriální onemocnění. Multirezistentní kmeny bakterií, které mají rezistenci vůči nejúčinnějším antituberkulotikům, tj., hydrazidu isonikotinové kyseliny (INH) a rifampicinu, se označují MDR-Tb. Pokud přibývá ještě rezistence vůči fluorovaným chinolonům a jednomu z tří dalších léčiv podávaných injekčně (kanamycinu, kapreomycinu a arrkacinu), kmeny mykobakterií se nazývají extrémně multirezistentní a označují se XDR-Tb. Nedávno byl nalezen kmen *M. tuberculosis* rezistentní vůči všem antituberkulotikům (označení TMR-Tb, tj. totálně rezistentní). Počítá se, že na 500 000 případů MDR-Tb přichází 3–5 % XDR-Tb²⁾. Výzkum antituberkulotik proti rezistentním kmenům je hlavním trendem současného vývoje²⁾.

Z uvedeného úvodu lze shrnout, že tímto vážným problémem se dnes zabývají stovky vědeckých pracovišť o pravděpodobně tisících pracovníků. Publikáční výstupy lze rozdělit na studie hledající potenciální antituberkulotika účinné *in vitro*, dále dokonalejší studie zaměřující se na hodnocení *in vivo*. Za nejperspektivnější oblast lze považovat práce vycházející s poznatků o biochemických pochodech mykobakterií. Přehled je věnován výzkumům od roku 2011, protože do roku 2010 byl již vypracován³⁾.

Potenciální antituberkulotika roku 2011

V tomto roce o perspektivních skupinách antimykobakteriálních látek byla sepsána řada přehledných referátů^{4–20)}. Některé přehledné články se zabývají biologickou aktivitou určité skupiny látek a o antituberkulózních aktivitách je tam jen málo informací^{4, 10, 12, 16)}. Jiné analyzují skupiny látek, které se jako antituberkulotika nedostaly do praxe, avšak vykazují velkou aktivitu^{12, 13)}. Nitroskupina je funkční skupinou v mnohých soudobých antituber-

prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc. (✉)
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
e-mail: waisser@faf.cuni.cz

Tab. 1. Počty prací o antituberkulotikách

Rok	Počet prací	Rok	Počet prací	Rok	Počet prací
1995	712	2001	1336	2007	2532
1996	882	2002	1508	2008	2913
1997	1069	2003	1654	2009	2913
1998	1070	2004	1820	2010	2928
1999	1110	2005	11979	2011	2926
2000	1160	2006	2913		

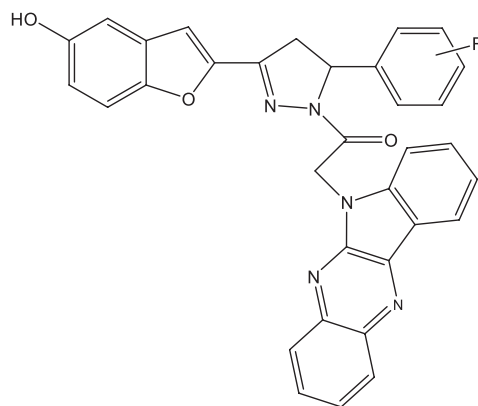
kulotikách (např. PA-824, OPC-37688) a referáty iniciují syntézu mnohých nových aktivních sloučenin. Řada přehledů je v úvodech prakticky zaměřených článků^{5, 6}. Často úspěšné látky jsou označeny pouze kódem (např. TMC207 je úspěšný derivát chinolinu). Cesta k němu je také popsána v přehledném referátu⁷. Zajímavý je i přehled věnovaný 1,4-di-*N*-oxidům chinoxalinu⁸). Kdysi na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy byly studovány *N*-oxidy pyridinu jako potenciální antituberkulotika. Studované látky byly vysoce účinné *in vitro*, avšak neúčinné *in vivo*⁹. Za úspěšné látky jsou považovány fluochinolony¹⁹. Otázce léčby tuberkulózy vyvolané rezistentními kmeny ve Velké Británii je věnován přehledový článek²⁰. V mnoha laboratořích v poslední době se hodnotí účinnost i vůči některým multirezistentním mykobakteriálním kmenům.

Potenciální antituberkulotika hodnocená *in vitro*

Potenciální antituberkulotika hodnocená *in vitro* tvoří nejpočetnější skupinu studovaných látek. Důvodem je patrně nepříliš obtížná a nákladná pracovní metodika. V České a Slovenské republice je to téměř jediný přístup. Kdysi se provádělo hodnocení *in vivo* ve výzkumném ústavu Preventivního lékařstva v Bratislavě. Patrně z finančních důvodů byly laboratoře vedené dr. Odlerovou zrušeny. Náklady u studií *in vivo* jsou daleko vyšší než u studií prováděných *in vitro*. Protože studie opírající se o hodnocení *in vitro* jsou příliš početné (v roce 2011 se jedná přibližně o 2000 sdělení), rozsah již přesahuje možnosti našeho přehledného referátu. Zpravidla se touto cestou zprvu ubírá celý výzkum antituberkulózní aktivity látek. Lépe je však aktivitu označit za antimykobakteriální. Pracovníci naší fakulty zpravidla spolupracují s Regionálním zdravotním ústavem v Ostravě. Standardní stanovení se provádí na *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* (INH rezistentním), *Mycobacterium avium* (INH rezistentním) a *Mycobacterium kansasii* klinicky izolovaném, který nevykazuje rezistenci vůči INH. Na vyžádání ústav provádí i hodnocení vůči několika multirezistentním kmenům.

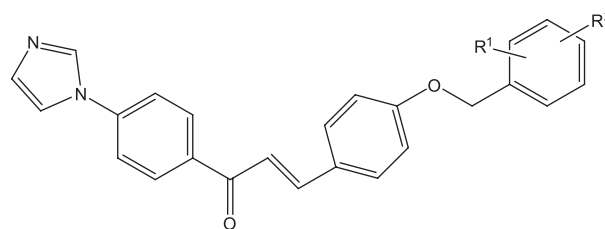
Potenciální antituberkulotika hodnocená *in vivo*

Hodnocení *in vitro* je náročnější, avšak přináší více informací. Předně pokusná zvířata musí být geneticky podobná, aby v pokusné skupině nebyly mezi zvířaty velké rozdíly. Nejčastěji se pracuje s experimentální tuberkulózou myši nebo morčat. Řada prací vykazuje nesmírně rozsáhlou chemickou část a velmi skromnou



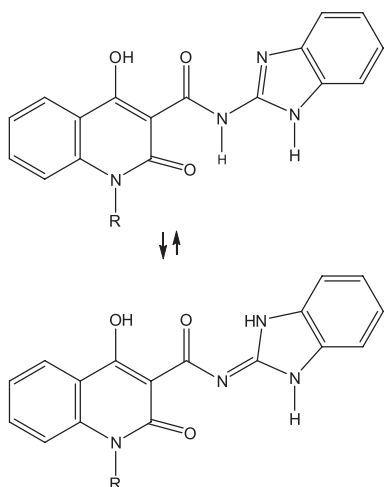
Obr. 1. Ukázka skupiny indofenazin 1,2,5-trisubstitovaných pyrazolinových derivátů hodnocených *in vivo*

biologickou část. Ve skupině pokusných zvířat musí být známa akutní toxicita. Ukážeme si některé příklady. Mezi uvedené práce patří již citovaná studie o protituberkulózních derivátech skořicových kyseliny¹². Ve skupině indofenazin-1,2,5-trisubstitovaných pyrazolinových derivátů²¹ podobných benzofuranu byla analýza prováděna na myších. Na obrázku 1 je uvedena úspěšná struktura skupiny látek, přičemž neaktivnější deriváty měly R nitroskupinu v poloze *o*- nebo *m*-.

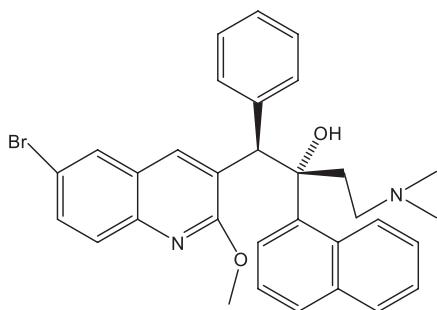


Obr. 2. Struktura protituberkulózně účinných aryloxy azolyl chalkonů

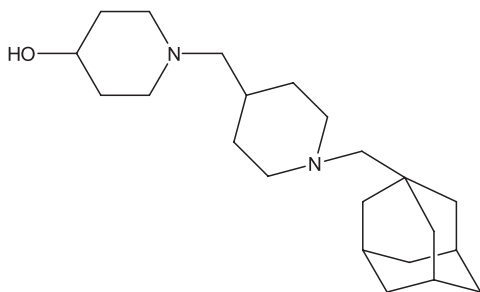
Aryloxy azolyl chalkony²² (obr. 2) byly studovány v roce 2011. Je zajímavé, že mnoho chalkonů bylo před časem studováno na Farmaceutické fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě a na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králově^{23–26}. Převážně se jednalo o azachalkony, kde jako aren byl převážně pyrazin. Hodnoceny byly pouze *in vitro*. Pokud nejsou látky hodnoceny *in vivo*, obtížně se dále prosazují do praxe. Na nových sloučeninách je vidět to, co je pro dnešní vývoj charakteristické. Výzkum se ubírá ke složitějším látkám a hodnocení se uplatňuje také *in vivo*. Z první



Obr. 3. Ukázka další skupiny hodnocené také přístupem *in vivo*²⁷⁾



Obr. 4. Struktura antituberkulotika TMC207



Obr. 5. Nové antituberkulotikum SQ609

skupiny neaktivnější látka měla R¹ 2-Cl a R² 4-Cl. Ve druhé skupině neaktivnější látka obsahovala v těchto polohách fluor (obr. 3).

V některých případech jako pokusné zvíře bylo použito morče²⁸⁾. V citované práci byl *in vivo* hodnocen rifampin, pyrazinamid a TMC207. S rifampinem a pyrazinamidem se setkáváme v mnoha učebnicích. Zbývá nám jen ukázat strukturu TMC207 (obr. 4). Je to látka vyvinutá proti multirezistentním kmenům. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ATP⁷⁾.

V mnohých studiích *in vivo* není uveden druh zvířat, pouze je uvedeno pokusná zvířata („animals“). Možná, že je použito více druhů zvířat tak, jak pracuje současný farmakologický výzkum. Další studie hodnocené *in vivo* uvádíme bez nákrešů struktur, protože jejich struktury vyplývají z názvu článku^{29–36)}. Pozastavíme se u práce vedoucí k celé skupině *in vivo* aktivních sloučenin³⁷⁾;

jako předloha byla použita látka označovaná SQ609 (obr. 5), která je již používána v praxi proti multirezistentním kmenům.

Zajímavými sloučeninami účinnými *in vivo* jsou kalixareny. Jsou to makrocyclické sloučeniny obsahující v makrocyccku čtyři až sedm cyklických substrukturálních jednotek³⁸⁾.

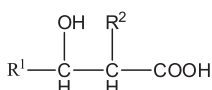
Hodnocení *in vivo* je v některých případech spojeno s klinickým výzkumem³⁴⁾.

Význam metody QSAR

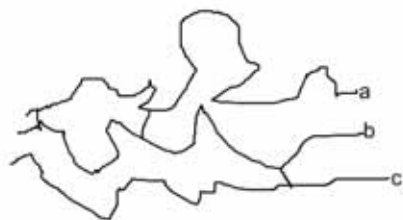
Zkratka QSAR byla vytvořena z anglického názvu „quantitative structure-activity relationships“. Zdomácněla snad ve všech jazycích. Významné začátky přístupu lze zařadit do šedesátých let 20. století, i když její kořeny sahají do ještě dřívějšího období³⁸⁾. V této době cílem QSAR studií bylo omezit počty syntetizovaných látek, protože tehdy chemické syntézy léčiv tvořily největší část nákladů. Od konterganové aféry se však bilance nákladů změnila a největší jejich část zaujímá nyní farmakologie. Význam metod QSAR však nepoklesl. Umožňují chápat logiku závislosti biologické aktivity na chemické struktuře a často pracovníky přivedou k aktivnějším sloučeninám. Často QSAR studie pomáhají ve studované skupině vyhledat neúčinnější látky. Například na našem pracovišti nás QSAR studie⁴¹⁾ přivedly do oblasti vysoce účinných antimykobakteriálních látek⁴²⁾. QSAR studii jsme uveřejnili teprve za rok po informaci o vysoce účinných látkách. Studie není dosud ukončena, protože sloučeniny jsou aktivní i proti multirezistentním kmenům. Poslední poznatek jsme dosud nepublikovali a látky jsou dále studovány na katedře biochemických věd naší fakulty. QSAR přístupy byly dále zdokonalovány. Tak vznikaly více-dimenzionální přístupy (dvou-dimenzionální 2D, troj-dimenzionální 3D). Používají větší počet deskriptorů. Jako příklad uvádíme studii ve skupině 1-cyklopropyl-6-fluor-8-methoxy-3-karboxy-4-chinolonů. Byl sledován vliv obměn substituentů v poloze 5 a 7 pomocí dvou-dimenzionálního přístupu na aktivitu vůči *M. tuberculosis* H37Rv⁴³⁾. Při QSAR studii byly používány strukturální, topologické, elektrotopologické a termodynamické deskriptory. Fluorované chinolony jsou úspěšně používány při tuberkulóze vyvolané MDR-Tb bakteriemi. Cílem další studie bylo hledání obecných vztahů mezi strukturou a aktivitou. QSAR studie se zaměřila na 20 prací používajících hodnocení vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou metodou QSAR (z toho tři z našeho pracoviště). Autoři vybrali 3224 deskriptorů, které postupně omezovali, až bylo dosaženo dobré obecné predikce⁴⁴⁾. Dále se omezíme jen na citace dvou-dimenzionálního QSAR^{45–48)} a troj-dimenzionálního QSAR^{48–51)} ve studiích protituberkulózní aktivity. Deskriptory by měly být na sobě nezávislé, jinak je prognóza obtížná. Pokus používat jako deskriptor hodnoty z ¹³C NMR jsou v přehledném referátu Verna a Hansche⁵²⁾. Metody QSAR jsou přínosem k výzkumu, avšak nejsou jediným racionálním přístupem. Dostí rozšířené jsou práce používající SAR (structure-activity-relationships). Jako příklad kombinace více přístupů uvádíme práci kolektivu kolem prof. L. Denga⁵³⁾.

Poznatky biochemie mykobakterií

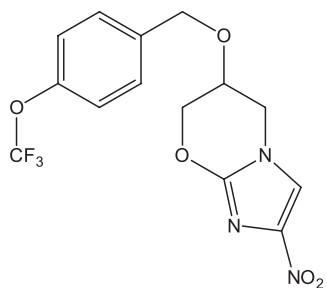
Mykobakterie se biochemickými pochody a svoji strukturou odlišují od běžných bakterií. Právě proto tuberkulóza vyvolávaná *Mycobacterium tuberculosis* (a ještě několika dalšími mykobakteriemi, jako *M. bovis*, *M. africanum*, *M. cansasii*) byla v historii lidstva nesmírně nebezpečnou chorobou. Většina antibakteriálních chemoterapeutik nepůsobila na původce tuberkulózy. Mykobakterie chrání silná buněčná stěna, která je vytvořena ze tří vrstev. První vrstvu tvoří polymer vytvořený z mykolových kyselin. Mykolové kyseliny obsahují pouze mykobakterie a korynebakterie (obr. 6). Jejich obecný vzorec odpovídá 2-alkyl-3alkyl-3-hydroxypropánové kyselině. Alkyly jsou zastoupeny uhlovodíkovým, a to i rozvětvenými řetězci. Mykolové kyseliny myko-



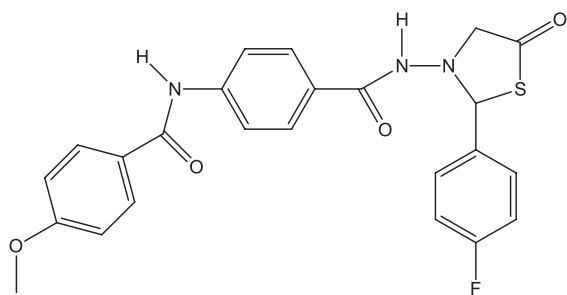
Obr. 6. Struktura mykolových kyselin



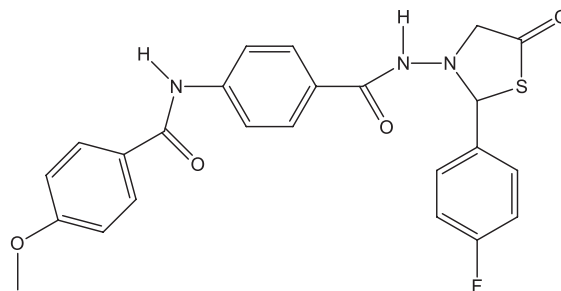
Obr. 7. Stručné schéma buněčné stěny mykobakterií (a – polymer mykolových kyselin, b – arabinoglykan, c – peptidoglykan)



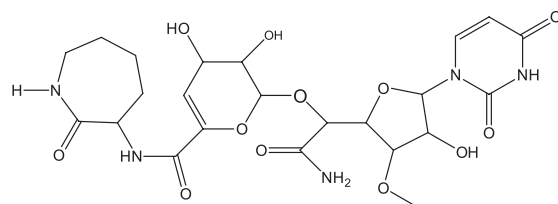
Obr. 8. PA-824 – inhibitor syntézy mykolových kyselin



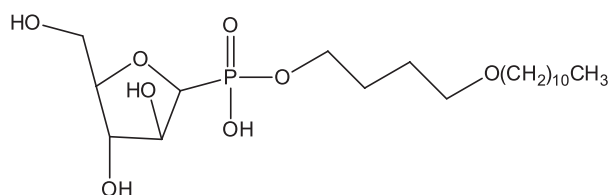
Obr. 9. N-oktasulfonylacetamid (OSA) – inhibitor syntézy mykolových kyselin



Obr. 10. Derivát 4-thiazolidinu – inhibitor syntézy arabinogalaktanu



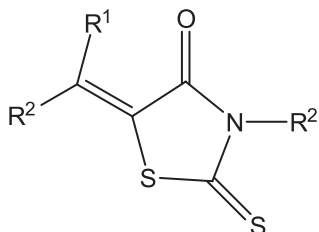
Obr. 11. Capuramycin – inhibitor syntézy arabinogalaktanu a peptidoglykanu



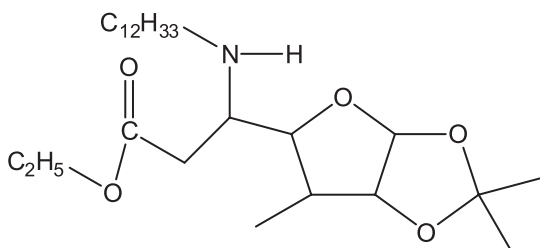
Obr. 12. Analog C-fosfátu – inhibitor syntézy arabinogalaktanu

bakterií obsahují 75–90 atomů uhlíku, u korynebakterií 32–36 atomů uhlíku.

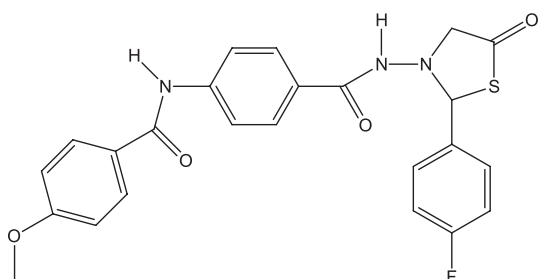
Karboxylové skupiny a hydroxyly umožňují vytvářet velmi pevná esterová spojení. Druhou vrstvu vytváří arabinogalaktan. Opět je to vysokomolekulární látka, ve které jsou monosacharidové jednotky spojeny glykosidickou vazbou. Třetí vrstvu tvoří peptidoglykan. Má však poněkud odlišné složení od peptidoglykanu běžných bakterií. Kyselina N-acetylmuramová je nahrazena N-glykolylmuramovou. V peptidových řetězcích však, podobně jako peptidoglykanu běžných bakterií, obsahuje také D-aminokyseliny. Všechny tři vrstvy jsou spojeny chemickými vazbami, např. vrstva mykolových kyselin je esterovou vazbou připojena k arabinogalaktanu. Proto jsou všechny tři vrstvy společně označovány jako mykolyl-arabinogalaktanyl-peptidoglykanový komplex (mAGP). K tomuto komplexu je dále nekovalentně připojen lipoarabinomanan. Je tedy zřejmé, že antituberkulotika, útočící na takto složitý útvar, musí mít odlišnou strukturu od běžných antibakteriálních chemoterapeutik (obr. 7).



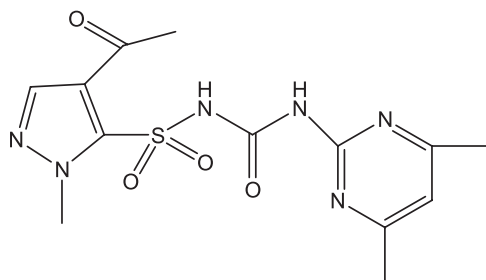
Obr. 13. Rhodanin 5372 – inhibuje spojení arabinogalaktanu s peptidoglykanem



Obr. 14. Derivát 5-aminofuranosy – inhibitor biosyntézy peptidoglykanu



Obr. 15. Derivát 4-thiazolidinu – inhibitor biosyntézy peptidoglykanu



Obr. 16. K12147 – inhibitor biosyntézy rozvětvených aminokyselin

Klasická antituberkulotika této skupiny byla objevena náhodou, bez znalosti biochemie mykobakterií. Příklady uvádíme: Peptidoglykan ohrožuje cykloserin, který inhibicí alanin racemasy brání tvorbě D-alaninu. Syntézu arabinogalaktanu ohrožuje ethambutol. Do syntézy mykolových kyselin zasahuje INH (hydrazid isonikotinové kyseliny) a thioamidy substituované isonikotinové kyseliny (ehtioamid, prothioamid), thiosemikarbazon 4-acetaminobenzaldehydu (thiacetazon), 4,4'-bis-(isopentyloxy)thiokarbonalid (isoxyl). Tyto vzorce opět neuvádíme, protože jsou v běžných učebnicích. Proti multirezistentním kmenům bylo nutné vytvořit nové

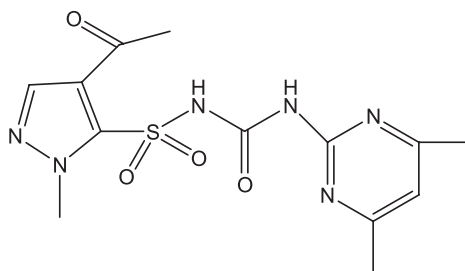
struktury. Ukážeme⁵⁴⁾ si některá léčiva vyvinutá před rokem 2011 (obr. 8 až 15).

Z uvedených příkladů vyplývá, že útoky na buněčné stěny mohou přinést slibné výsledky. Hodně úspěšných klasických antituberkulotik bylo cíleno také tímto směrem. Řada dalších antituberkulotik působí inhibicí biosyntézy některých bílkovin, inhibicí biosyntézy některých aminokyselin, zasahuje do respiračního řetězce a inhibicí biosyntézy, syntézy případně štěpení DNA, nebo RNA. Opět se vraťme před rok 2011.

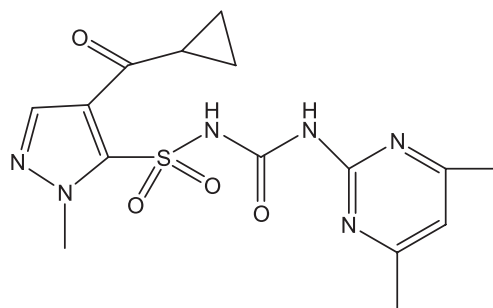
Inhibitory biosyntézy rozvětvených aminokyselin se svým účinkem podobají některým herbicidům. Z látek vyvinutých proti tuberkulóze si uvedeme K12147 (obr. 16), K13010 (obr. 17) a K13030 (obr. 18).

Proteosyntézu inhibují streptomycin, kanamycin, kapreomycin, viomycin klaritromycin, linezolid (obr. 19), RU 66252 (obr. 20), Rbx7644 (obr. 21), Rbx8700 (obr. 22), DA2867 (obr. 23) a pleuromutilin (obr. 24). Mechanismus účinku inhibitorů proteosyntézy spočívá ve vazbách na ribozomální podjednotky.

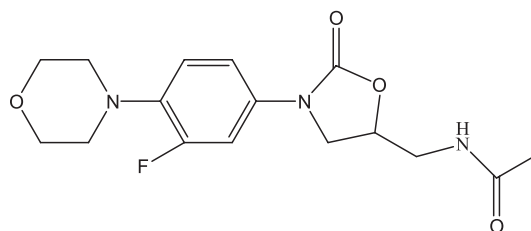
Uvedené příklady nejsou vyčerpávající. Setkáváme se s inhibitory buněčného dělení, inhibitory některých kinas, s látkami zasahujícími do respiračního řetězce,



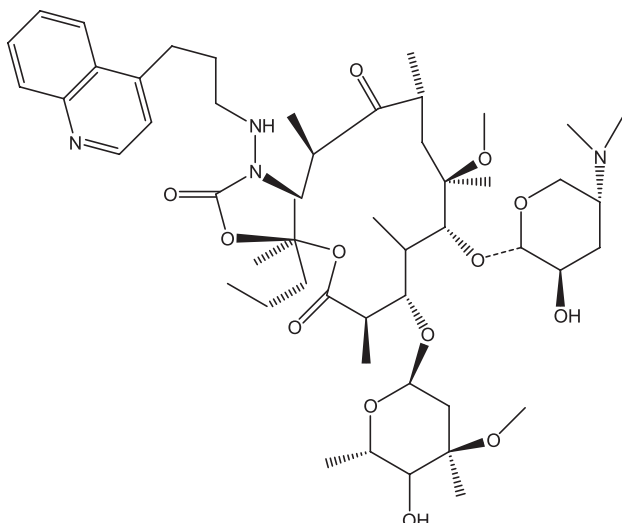
Obr. 17. K13010 – inhibitor biosyntézy rozvětvených aminokyselin



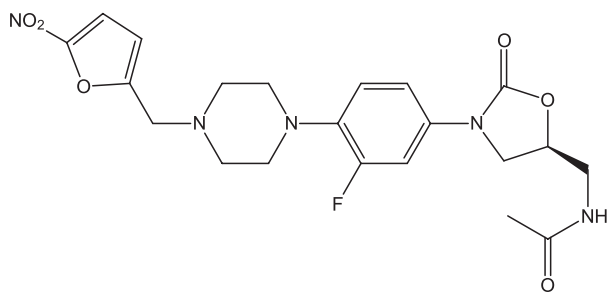
Obr. 18. K13030 – inhibitor biosyntézy rozvětvených aminokyselin



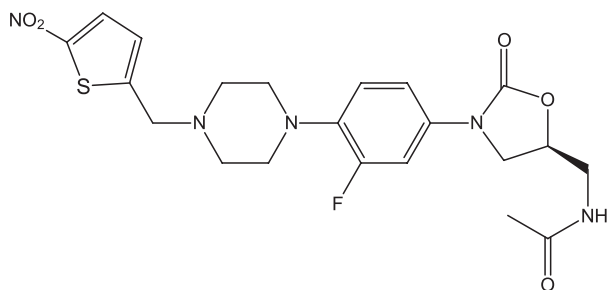
Obr. 19. Linezolid – inhibitor proteosyntézy



Obr. 20. RU66252 – inhibitor proteosyntézy



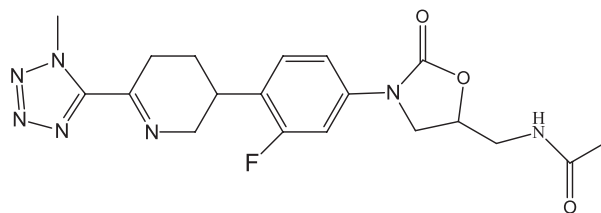
Obr. 21. RBx7644, ranbenzolid – inhibitor proteosyntézy



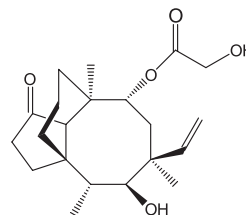
Obr. 22. Rbx8700 – inhibitor proteosyntézy

inhibitory některých reduktas, inhibitory buněčné replikace (fluorované chinolony), inhibitory biosyntézy ATP. Lze říci, že již před rokem 2011 byla připravena řada protituberkulózních látek pro případné zásahy proti multirezistentním kmenům, z nichž některé se dostaly až na klinické testy. Svět se tedy připravuje na útoky multirezistentních bakterií. Vraťme se však opět do roku 2011.

Byly hledány modifikace odvozené od rifampicinu, tedy léčiva, která se váží na RNA polymerasu³¹⁾ Rifampicin a INH patřily mezi nejvýznamnějšího antituberkulotika. Velké úsilí bylo zaměřeno na substituční modifikace ethionamidu, tedy inhibitoru syntézy arabinogalaktanu⁶⁵⁾. Na obrázku 5 je uvedena struktura SQ609³⁷⁾. Pozornost na blokování biosyntézy arabinanů byla zaměřena i na benzothiazinony⁵⁵⁾. Práce však vznikla již v roce 2009. Několik dalších studií bylo také orientováno na inhibici buněčné stěny mykobakte-



Obr. 23. DA 7867 – inhibitor proteosyntézy



Obr. 24. Pleuromutilin – inhibitor proteosyntézy

rií^{57–58)}. Pokus byl o inhibici alanin-racemasy⁵⁹⁾, tedy zábranu vzniku D-aminokyselin (což je mechanismus podobný cykloserinu, který vede k poškození peptidoglykanu). Setkáváme se také se zásahy do enzymů za účasti dalších aminokyselin. Pozornost byla věnována methionin aminopeptidase^{60–63)}. Methionin aminopeptidasa je metallo-proteasa, která odstraňuje N-koncový methionin při syntéze proteinu. Ve studii byla nalezena skupina 2,3-dichlor-1,4-naftochinonů jako vhodný cíl pro další výzkum inhibitorů. Dalším místem zásahu byl thymin. Útok byl veden na inhibici thymidin-monofosfat kinas⁶⁵⁾. Dále můžeme uvést některé další kinas⁶⁶⁾ nebo gyrasy⁶⁷⁾ a některé syntetasy⁶⁸⁾. Je velmi obtížné zpracovat celý rozsah biochemických prací zaměřených na zásahy do biochemických pochodů mykobakterií. Pouze za rok 2011 a počátek roku 2012 jich bylo uveřejněno 84.

Kam kráčí vývoj nových antituberkulotik

Na závěr se budeme snažit odpovědět na otázku, která je v nadpisu celého článku. Rozhodně nejdůležitější studie vycházejí z poznatků o biochemických pochodech mykobakterií. Například v některých citacích^{22–26)} byla zmínka o azachalkonech jako potenciálních antituberkulotikách. V práci z letošního o roku je objasněn mechanismus účinku jako inhibice protein tyrosin fosfatasy⁶⁹⁾. Nechceme tím říci, že ostatní přístupy jsou nepřínosné. Hodnocení *in vitro* může iniciovat k dalšímu výzkumu. Nicméně však pracoviště opírající se pouze o *in vitro* hodnocení jsou v nevýhodě proti pracovním skupinám používajícím dokonalejší přístupy. Při hodnocení *in vivo* je nutné předem stanovit toxicitu látek vůči používaným zvířatům. Je to další krok k poznání účinku látek. Epidemiologická situace je v Evropské unii poměrně příznivá⁹⁰⁾. Výskyt choroby se pohybuje pod hladinou 50 případů/100 000 obyvatel. V České republice je ročně

hlášeno 900 nových onemocnění a recidiv. Světem však obchází hrozba multirezistentních kmenů *M. tuberculosis*. Je tedy otázkou, jaký bude další vývoj s pohledem na velkou současnou migraci obyvatelstva. V některých asijských zemích byly nalezeny i totálně rezistentní kmeny odolné vůči všem léčivům (TDR-Tb). Hledání nových potenciálních antituberkulotik se v Čechách a na Slovensku zabývá několik vědeckých týmů. Bohužel jsou však odkázány pouze na postupy hodnocení *in vitro*. Proti multirezistentním kmenům *M. tuberculosis* (MDR-Tb) jsou v České republice registrovány pouze některé fluorované chinolony a kanamycin. U extrémně multirezistentních kmenů *M. tuberculosis* (XDR-Tb) je léčba značně obtížná. Naštěstí jejich výskyt je poměrně nevelký. Dalším problémem je špatná komunikace našich vědeckých pracovišť s farmaceutickými výrobními koncerny. I když u nás byla nalezena řada sloučenin s významnou aktivitou, a to i proti rezistentním kmenům, do praxe se nedostala žádná. Vývoj nového léčiva je dnes spojen s tak nesmírnými náklady, že od rozpadu výrobního podniku SPOFA v českém a slovenském regionu je žádná z farmaceutických firem nedokáže realizovat.

Střet zájmů: žádný.

Literatura

1. **World Health Organization.** Global tuberculosis kontrol, a short update to the 2009 report. WHO/HTM/TB/2009.426. Geneva: WHO 2009.
2. **Da Silva P. E. A., Polomino J. C.** Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66, 1417–1430.
3. **Yew W. W., Lange C., Leung C. C.** Treatment of tuberculosis: update 2010. *Eur. Res. J.*, 2011; 31(2), 441–462.
4. **Srikanth L., Raj V. V., Raghunandan N., Venkateshwerlu L.** Recent advances and potential pharmacological activities of benzimidazole derivatives. *Der Pharma Chemica.* 2011; 3(2), 177–193.
5. **Lee S. H., Kim S., Yun M. H., Lee Y. S., Cho S. N., Oh T., Kim P.** Synthesis and antitubercular activity of monocyclic nitroimidazole. Insight from acenazole. *Bioorg. Med. Chem. Letter* 2011; 21(5), 1515–1518.
6. **Thomson A. M., Sutherland H. S., Palmer B. D., Kmentova I., Blasser A., Franzblau S. G., Wan B., Wang Y., Ma Z., Denny W. A.** Synthesis and structure-activity relationships of varied ether linker analogues of antitubercular drug (6S)-2-nitro-6-((4-(trifluoromethoxy)benzyl)oxy)-6,7-dihydroxy-5H-imidazo-[2,1-b][1,3]oxazine(PA-824). *J. Med. Chem.* 2011; 54(19), 6561–6585.
7. **Guillemont J., Mayer C., Poncelet A., Bourdrez X., Andries K.** Diarylquinolines, synthesis partway and quantitative structure-activity relationship studies leading to the discovery of TMC 207. *Future Med. Chem.* 2011; 3(11), 1345–1360.
8. **Vicente E., Villar R., Pérez-Silanes S., Aldana I., Goldman R., Monge A.** Quinoxaline 1,4-dioxide and the potential for treating tuberculosis. *Infections Disorders – Drug Targets* 2011; 11, 196–294.
9. **Čeladník M., Košťálová Z., Jíška S., Waisser K., Kubala E., Palát K.** Antituberkulotika. XVII. Funkční deriváty kyseliny 4-halogenpikolinové a jejich N-oxidů. *Českoslov. Farm.* 1975; 25(5), 181–185.
10. **Swarnalatha G., Prasanthi G., Sirisha M., Chetty C. M.** 1,4-Dihydropyridine: A multifunctional molecule – A review, *International J. ChemTech. Research* 2011; 3(1), 75–89.
11. **Suddigut N., Ahsan W., Alam M. S., Ali R., Jain S., Azad B., Akhtan J.** Triazoles as potential bioactive agents. *Int. J. Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2011; 8(1), 161–169.
12. **De P., Yoya G. K., Constaqt P., Bedo-Belval F., Duran H., Saffon N., Daffé M., Balta M.** Design synthesis, and biological evaluation of new cinnamic derivatives as antitubercular agents. *J. Med. Chem.* 2011; 54(5), 1449–1461.
13. **Imramovský A., Pauk K., Pejchal V., Hanousek J.** Salicylanilide and their derivatives as perspective anti-tuberculosis drugs: Synthetic routes and biological evaluation, *Mini-Reviews in Org. Chemistry.* 2011; 8(2), 211–220.
14. **Krátký M., Vinšová J.** Salicylanilides ester prodrugs as potential antimicrobial agents. – a reviews. *Curr. Pharmacol. Design* 2011; 17(2), 3494–3505.
15. **Mayer A. M. S., Rodrigues A. D., Berlinck R. G.-S., Fusetano N.** Marine pharmacology in 2007–2008: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities: affecting the immune and nervous system and other miscellaneous mechanism of action. *Comparative Biochem. and Physiology, Part C Toxicology and Pharmacology* 2011; 153(2), 191–222.
16. **Kharb R., Sharma P., C., Yar M. S.** Pharmacological significance of triazole scaffold. *J. Enzyme Inhibition and Medicinal. Chem.* 2011; 26(1), 1–21.
17. **Lamichhane O.** Novel target in *M. tuberculosis*: search for new drugs. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 17(1), 25–33.
18. **Chen T. Ch., Lu P. L., Lin Ch. Y., Lin W. R., Chen Y. H.** Fluoroquinolones are associated with delayed treatment and resistance in tuberculosis a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Diseases* 2011; 15(3), e211–e216.
19. **Biava M., Porretta G. C., Poce G., Battilicchio C., Alfonso S., de Logu A., Manetti F., Botta M.** Developing pyrrole – derived antimycobacterial agents: a rational lead optimization approach. *Chem. Med. Chem. Minireviews.* 2011; 6, 593–599.
20. **Study A., Goodman A., José R. J., Loyse A., O'Donoghue M., Kon O. M., Dedicioot M. J., Harrison T. S., John L., Lipman M., Cooke G. S.** Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) treatment the UK: a study of injectable use and toxicity in practice. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66, 1815–1820.
21. **Manna K., Agrawal Y. K.** Potent in vitro and in vivo antitubercular activity of certain newly synthesized indophenazine 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives bearing bezofuran, *Med. Chem. Res.* 2011; 20(3), 300–306.
22. **Marrapu V., Chaturvedi V., Singh Shu, Singh Shy, Sinha S.** Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Eur. J. Med. Chem.* 2011; 46(9), 4302–4310.
23. **Opletalová V.** Chalkony a jejich heterocyklická analoga jako potenciální terapeutika bakteriálních onemocnění. *Česk. Slov. Farm.* 2000; 49(6), 278–284.
24. **Opletalová V., Pour M., Kuneš J., Buchta V., Silva L., Králová K., Chlupáčková M., Meltrová D., Peterka M., Posledníková M.** Synthesis and biological evaluation of (E)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2006; 71(1), 44–58.
25. **Chlupáčková M., Opletalová V., Kuneš J., Silva L., Buchta V., Dušková J., Králová K.** Synthesis and biological evaluation of same ring-substituted (E)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2005; 33, 31–43.
26. **Opletalová V., Hartl J., Patel A., Plát K. Jr., Buchta V.** Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antitungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 2002; 57(2), 135–144.
27. **Ukrainete I. V., Grinevich L. A., Tkach A. A., Gorokhova O. V., Kravchenko V. N., Sim G.** 4-Hydroxy-2-quinolones. 191. Synthesis, tautomerism and biological activity of benzimidazol-2-ylamides of 1R-4-hydroxy-2-oxo-1.2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 2011; 46(11), 1364–1370.
28. **Shang S., Shanley C. A., Caraway M. L., Orme E. A., Henao-Tamayo M., Hascall-Dove L., Ackart D., Lenaerts A.,**

- Basaraba R. J., Orme I. M., Orodway D. J. Activities TMC 207, Rifampin, and Pyrazinamide against *Mycobacterium tuberculosis* infection in guinea pigs. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 2011; 55(1), 124–131.
29. Moraski G. C., Markley L. D., Hipskind P. A., Boshoff H., Cho S., Franzblau S. G., Miller M. J. Advent of imidazo[1, 2-a]pyridine-3-carboamides with potent multi- and extended drug resistant antituberculosis activity. *Med. Chem. Letters* 2011; 2(6), 466–470.
 30. Cherian J., Choi I., Nayyar A., Manjunatha U. H., Mukherjee T., Lee Y. S., Boshoff H. I., Singh R., Ha Y. H., Goodwin M., Lakshminarayana S. B., Nioyomrattanakit P., Jiricek J., Ravindran S., Dick T., Keller T. H., Dartois V., Barry C. E. Structure-activity relationships antitubercular nitroimidazoles. 3. Extrapolation of linker and lipophilic tail of ((S)-2-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo-[2,1-b][1,3]oxazin-6-yl)-(4-trifluoromethoxybenzyl)amine (6-amino PA-824). *J. Med. Chem.* 2011; 54(16), 5639–5659.
 31. Jiri Y., Gill S. K., Kiirchhoff P. D., Wan B., Franzblau S. G., Garcia G. A., Showalter H. D. H. Synthesis and structure activity relationships of novel substituted 8-amino,8-thio, and 1,8-pyrazole congeners of antitubercular rifamycin S and rifampin. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2011; 21(20), 6094–6099.
 32. Halouska S., Fenton R. J., Barletta R. G., Powers R. Prediction the *in vivo* mechanism of action for drug leads using NMR metabolomics. *Chem. Biol.* 2012; 7(1), 166–171.
 33. Flipo M., Desreses M., Lecat-Guillet N., Dirie B., Carette X., Leroux F., Piveteau C., Demirkaya F., Lens Z., Rucktooa P., Villeret V., Christophe T., Jeon H. K., Loch C., Brodin P., Déprez B., Baulard A. R. Ethionamide boosters: Synthesis, biological activity, and structure-activity relationships of a series of 1,2,4-oxadiazole EhR inhibitors. *J. Med. Chem.* 2011; 54(8), 2994–3010.
 34. Escribano J., Rivero-Hernández C., Rivera H., Barros D., Castro-Pichel J., Pérez-Herrán E., Mendoza-Losana A., Angulo-Barturen I., Ferrer-Bazaga S., Jiménez-Navarro E., Ballé L. 4 Substituted thioquinolines and thiazoloquinolines: Potent, selective, and Tween-80 *in vitro* dependent families of antitubercular agents with moderate *in vivo* activity. *Chem. Med. Chem.* 2011; 6(12), 2252–2263.
 35. Singh N., Pandey S. K., Arand N., Dwivedi R., Singh S., Sinha S. K., Chaturvedi V., Jaiswal N., Srivastava A. K., Shah P., Siddiqui M. I., Tripathi R. P. Synthesis, molecular modeling and bio-evaluation of cycloalkyl fused 2-aminopyrimidines as antitubercular and antidiabetic agents *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2011; 21(16), 4404–4408.
 36. Amaral L., Martins M., Viveiros M. Thioridazine: Alternative and potentially effective therapy of the XDR-Tb patient. *Letters in Drug Design and Discovery* 2011; 8, 130–132.
 37. Bogatcheva E., Hanrahan C., Nikonenko B., de Santos G., Reddy V., Chen P., Barbosa F., Einck L., Nacy C., Protopopova M. Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2011; 21(18), 5353–5357.
 38. De Groote M. A., Gilliland J. C., Wells C. I., Brooks E. J., Woolhiser L. K., Gruppo V., Poloquin Ch. A., Orme I. M., Lenaerts A. J. Comparative studies evaluating mouse model used for efficacy testing of experimental drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(3), 1237–1247.
 39. Goodworth K. J., Hervé A. C., Stavropoulos E., Hervé G., Casades I., Hill A. M., Weingarten G. G., Tascon R. E., Colston M. J., Hailes H. C. Synthesis and *in vivo* biological activity of large-ringed calixarenes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tetrahedron* 2011; 67(2), 373–382.
 40. Meermann B., Bockx M., Laenen A., Van Looveren Ch., Cuyckens F., Vanhaecke F. Speciation analysis of bromine-containing drug metabolites in feces samples from a human *in vivo* study by means of HPLC/ICP-MS combined with on-line isotope dilution. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 402, 439–448.
 41. Petrliková E., Waisser K., Doležal R., Holý P., Gregor J., Kuneš J., Kaustová J. Antimycobacterial 3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones substituted on phenyl and benzoxane moiety in position 6. *Chem. Papers* 2011; 65(3), 352–366.
 42. Petrliková E., Waisser K., Divišová H., Husáková P., Vrabcová P., Kuneš J., Kolář K., Stolaříková J. Highly active antimycobacterial derivatives of benzoxazine. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18(23), 8178–8187.
 43. Prajapati K., Singh S., Pathak A. K., Mehla P. QSAR analysis on some 8-methoxy quinoline derivatives as H37Rv (MTB) inhibitors. *Int. J. Chem. Tech. Research* 2011; 3(1), 408–422.
 44. Kovalishyn V., Andres de Sousa J., Ventura C., Leitao R. E., Martins F. QSAR modeling of antitubercular activity of diverse organic compounds. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems* 2011; 107(1), 69–74.
 45. Sharma M. C., Sjarma S. 2D QSAR study of 7-methyljuglone derivatives. An approach to design anti-tubercular agents. *J. Pharmacology and Toxicology* 2011; 6(6), 499–504.
 46. Subramaniam R., Rao G., Pai S. P. N. 2D QSAR studies of some novel quinazolinone derivatives as antitubercular agents. *J. Comput. Met. Mol. Design* 2011; 1(3), 69–82.
 47. Sawant R. L., Wadekar J. B., Lanke P. QSAR analysis of structurally similar antitubercular isatin analogues. *Latin American J. Pharmacy* 2011; 30(4), 773–780.
 48. Khuni R. C., Khedkar V. M., Chawda R. S., Chauhan N. A., Parikh A. R., Coutinho E. C. Synthesis, antitubercular evaluation and 3D-QSAR study of N-phenyl-3-(4-fluorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2012; 22(1), 666–678.
 49. Kumar U. Ch., Shaik M. 3-D QSAR CoMSTA models of arylamides for prediction of enoyl acyl carrier protein reductase inhibitory activity. *J. Pharmaceutical Sciences and Technology* 2011; 3(1), 536–542.
 50. Puratchikody A., Natarajan R., Jayapal M., Doble M. Synthesis, *in vitro* antitubercular activity and 3D-QSAR of novel quinoxaline derivatives. *Chemical Biology and Drug Design* 2011; 78(6), 988–998.
 51. Khunt R. C., Khedkar V. M., Chawda R. S., Chauhan N. A., Parikh A. R., Coutinho E. C. Synthesis, antitubercular evaluation and 3D-QSAR study of N-phenyl-3-(4-fluorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2012; 22(1), 666–678.
 52. Verma R. P., Hansch C. Use of ¹³C NMR chemical shift as QSAR/QSPR descriptor. *Chem. Reviews* 2011; 111(4), 28665–2899.
 53. Deng L., Diao J., Chen P., Pujari V., Yao Y., Cheng G., Crick D. C., Prasad B. V. V., Song Y. Inhibition of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase by lipophilic phosphonates: SAR, QSAR and crystallographic studies. *J. Med. Chem.* 2011; 54(13), 4721–4734.
 54. Petrliková E. Protituberkulózní látky a jejich další antimykobakteriální období. Dizerační práce Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2010.
 55. Makarov V., Manina G., Mikusova K., Möllmann U., Ryabova O., Saint-Joanis B., Dhar N., Pasca M. R., Bironi S., Lucarelli A. P., Milano A., De Rossi E., Balanova M., Bobovska A., Dianiskova P., Kordulakova J., Sala C., Fullam E., Schneider P., McKinney J. D., Brodin P., Christophe T., Waddell S., Butcher P., Albrethsen J., Rosenkrants I., Brosch R., Nandi V., Bharath S., Gaonkar S., Shandil R. K., Balasubramanian V., Balganesh T., Tyagi S., Grosse J., Riccardi G., Cole S. T. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science* 2009; 324 801–804.
 56. Barry C. S., Backus K. M., Barry C. E., Davis B. G. ESI-MS assay of *M. tuberculosis* cell wall antigen 85 enzymes permits substrate profiling and design of mechanism-based inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133(34), 13232–13235.
 57. Dutta N. K., Mehra S., Kaushal D. A *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor network responds to cell-envelope

- damage by promising anti-mycobacterial thioridazine. *PLoS One* 2010; 5(4), e10069.
58. Li Y., Zhou Y., Ma Y., Li X. Design and synthesis of novel cell wall inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* GlmM and GmU. *Carbohydrate Research* 2011; 346(13), 1714–1720.
 59. Anthony K. G., Strych U., Yeug K. R., Shoen C. S., Perez O., Krause K. L., Cynymon M. H., Arristoff P. A., Koski R. A. New classes of alanine racemase inhibitors identifies by high-throughput screening show antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2011; 6(5), e20374.
 60. Olaley O., Raghunand T. R., Bhat S., He J., Tyagi S., Lamichhane G., Gu P., Zhou J., Zhang Y., Grosset J., Bishai W. R., Liu J. O. Methionine aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as novel antimycobacterial targets. *Chem Biol.* 2010; 17(1), 86–97.
 61. Lu J. P., Yuan X. H., Ye Q. Z. Structural analysis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by bengamide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2012; 47(1), 479–484.
 62. Olaley O., Raghunand T. R., Bhat S., Chong C., Gu P., Zhou J., Zhang Y., Bishai W. R., Liu J. O. Characterization of cloquinol and analogues as novel inhibitor of aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2011; 91, 561–565.
 63. Olaley O. A., Bishai W. R., Liu J. O. Targeting the role of N-terminal methionine processing enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009; 89, 555–559.
 64. Frecer V., Seneci P., Miertus S. Computer-assisted combinatorial design of bicyclic thymidine analogs as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* thymidine monophosphate kinase. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2011; 25(1), 31–49.
 65. Onajole O. K., Govender P., van Helden P. D., Kruger H. G., Maguire G. E. M., Wild I., Govender T. Synthesis and evaluation of S109 analogues as potential anti-tuberculosis candidates. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45(5), 2075–2079.
 66. Saidenberg D. M., Passerselli A. W., Rodrigues A. V., Basso L. A., Santos D. S., Palma M. S. Shikimate kinase (EC 2.7.1.71) from *Mycobacterium tuberculosis*: Kinetic and structural dynamics of potential molecular target for drug development. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18(9), 1259–1318.
 67. Chopra S., Matsuyama K., Tran T., Malerich J. P., Wan B., Franzblau S. G., Lun S., Guo H., Maiga C. M., Bishai W. R., Madrid P. B. Evaluation of gyrase B as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(2), 415–421.
 68. Jatana N., Jangid S., Khare G., Tyagi A. K., Latha N. Molecular modeling studies of fatty acyl-CoA synthetase (FadD 13) from *Mycobacterium tuberculosis* – a potential target for the development of antitubercular drugs. *J. Mol. Model.* 2011; 17(1), 301–313.
 69. Chiaradia L. D., Martins P. G. A., Cordeiro M. N. S., Guido R. V. C., Ecco G., Andricopulo A. D., Yunes R. A., Vernal J., Nunes R. J., Terenzi H. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and Ptp B) *J. Med. Chem.* 2012; 55(1), 390–402.
 70. Bártů V. Tuberkulóza ve světle 21. století. *Medical Tribune* 2010; 4, D2 tematická příloha. ISSN 1214-8911.



PRAKTICKÝ SLOVNÍK MEDICÍNY, 10. aktualizované vydání

Martin Vokurka, Jan Hugo a kol.

Maxdorf 2011, 520 str.
ISBN: 978-80-7345-262-9
Cena: 595 Kč
Formát: A5, váz.



Desáté, rozšířené vydání úspěšného lékařského výkladového slovníku pro širokou veřejnost obsahuje více než 11 000 hesel a rozsáhlou přílohu normálních laboratorních hodnot. Srozumitelný a přehledný výklad doplněný příklady a ilustracemi umožňuje porozumět tomu, co lékař píše a říká, tj. lékařským zprávám, nálezům apod. Čtenář také získá jistotu, jak odborné pojmy vyslovit a jak je používat. K proniknutí do jazyka medicíny dále přispívá přehled a výklad lékařských zkratk i vysvětlení slangových výrazů užívaných zdravotníky.

Hesla zahrnují orgány lidského těla, jejich funkce a poruchy, popis několika set nemocí a syndromů, jejich příznaků, lékařských vyšetření a různých způsobů léčby, přibližně 1500 hesel se vztahuje k lékům. Pozornost je věnována zvláště nemocem srdce a cév (infarkt myokardu, angina pectoris, vysoký krevní tlak), zhoubným nemocem (nádory, leukemie), cukrovce, nemocem žláz s vnitřní sekrecí, kožním nemocem, ženským nemocem, duševním chorobám (včetně různých závislostí) či poruchám v oblasti sexuality. Významnou oblastí je těhotenství a porod, velký počet hesel se týká vrozených nemocí a poruch. Poučné a zajímavé bývá také vysvětlení původu slov (etymologie), kterým jsou mnohá hesla doplněna.

O oblibě slovníku svědčí i 94 000 dosud prodaných výtisků v předchozích devíti postupně rozšiřovaných vydáních.

Objednávky zasílejte e-mailem nebo poštou: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i název časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli.