

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí
mikrodiluční bujónové metody I**

**(Evaluation of activity of potential antifungal substances through the use
of microdilution broth method I)**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2010

Jana ŠTVRTECKÁ

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 18.4. 2010

Jana Štvrtecká

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Marcele Vejsové Ph.D. za odbornou pomoc, rady a připomínky při vypracování této diplomové práce.

Za poskytnutí vzorků testovaných látek děkuji Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D., Mgr. Aleši Imramovskému, Doc. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc., Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D., Mgr. Evě Petrlíkové a Prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc.

Za cenné rady a technickou pomoc v laboratoři děkuji paní laborantce Idě Dufkové a Mgr. Janě Mandíkové.

OBSAH

OBSAH	2
ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Charakteristika houbových organismů	10
2.2 Taxonomie a charakteristika lékařsky významných hub	10
2.2.1 Zygomycetes (houby spájkivé)	12
2.2.2 Ascomycetes (houby vřeckovýtrusé)	12
2.2.3 Basidiomycetes (houby stopkovýtrusé)	12
2.2.4 Deuteromycetes (Fungi imperfecti, houby nedokonalé)	13
2.3 Testovací kmeny hub	13
2.3.1 <i>Candida albicans</i>	13
2.3.2 <i>Candida tropicalis</i>	14
2.3.3 <i>Candida krusei</i>	14
2.3.4 <i>Candida glabrata</i>	14
2.3.5 <i>Trichosporon beigeli</i>	15
2.3.6 <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
2.3.7 <i>Absidia corymbifera</i>	16
2.3.8 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	16
2.4 Základní rozdělení houbových onemocnění	17
2.4.1 Mykotoxikózy	17
2.4.2 Mykoalergózy	18
2.4.3 Mycetismy	18
2.4.4 Mykózy	19
2.5 Laboratorní diagnostika lékařsky významných hub	22
2.5.1 Mikroskopické vyšetření	22
2.5.2 Kultivační vyšetření	23
2.5.3 Biochemická identifikace	23
2.5.4 Sérologické testy	23
2.5.5 Molekulárně biologické techniky	24

2.6	Terapie mykotických infekcí	24
2.6.1	Látky vytvářející póry: polyenová antibiotika.....	24
2.6.2	Inhibitory syntézy ergosterolu	26
2.6.3	Látky zasahující do funkcí buněčného jádra.....	31
2.6.4	Látky inhibující syntézu buněčné stěny (echinokandiny).....	33
2.7	Testování antifungální aktivity v podmínkách <i>in vitro</i>	34
2.7.1	Standardizované postupy	34
2.7.2	Diluční techniky.....	35
2.7.3	Difúzní agarové techniky.....	35
2.7.4	Ostatní metody:.....	37
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	Materiál	38
3.1.1	Pomůcky a přístroje	38
3.1.2	Chemikálie a média	38
3.1.3	Testovací kmeny	40
3.1.4	Testované látky	41
3.2	Metodika	56
3.2.1	Příprava suspenzí testovacích kmenů hub	56
3.2.2	Příprava ředící řady testovaných látek.....	56
3.2.3	Plnění mikrotitrační destičky	57
3.3	Hodnocení výsledků	57
4	VÝSLEDKY	58
4.1	Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny.....	58
4.2	Arylaminopyraziny	58
4.3	Estery pyrazinkarboxylové kyseliny.....	58
4.4	Pyrazin-2,3-dinitrily.....	58
4.5	Benzoxazepin–diony.....	59
4.6	Diamidy	59
4.7	Styrylbenzoxazoly	59
4.8	Deriváty (Z)-5arylmethyliden-2-thioxothizolidin-4-on.....	60
4.9	Deriváty esteru cholesterolu a alkanových kyselin.....	60
4.10	Deriváty thiosalicylamidů.....	60
4.11	Tabulkový přehled výsledků.....	61
5	DISKUZE	71

6	ZÁVĚR	77
7	SEZNAM LITERATURY	78

ABSTRAKT

Jana Štvrtecká

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody I

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalýtika

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit *in vitro* potenciální antifungální aktivitu látek nasyntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv a na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Pro testování látek byla použita mikrodiluční bujónová metoda. Sloučeniny byly otestovány na pěti kmenech kvasinek a třech kmenech vláknitých hub patogenních pro člověka: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/1, *Trichosporon beigeli* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Celkem bylo otestováno 80 látek rozdělených do deseti skupin podle chemické struktury: anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny, arylaminopyraziny, estery pyrazinkarboxylové kyseliny, pyrazin-2,3-dinitrily, benzoxazepin-diony, diamidy, styrylbenzoxazoly, deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on, deriváty esteru cholesterolu a alkanových kyselin, deriváty thiosalicylamidů.

Nejvýraznější antifungální aktivitu vykazovaly deriváty thiosalicylamidů, jako výhodná se u těchto látek jevila substituce chlórem a brómem. Naopak nejméně účinnými skupinami látek byly anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny, arylaminopyraziny, estery pyrazinkarboxylové kyseliny a styrylbenzoxazoly.

Nejúčinnějšími látkami byly z derivátů thiosalicylamidů T5622, T5625, T5620; z derivátů esteru cholesterolu a alkanových kyselin látka T6056 a z pyrazin-2,3-dinitrilů látka VL1-C1.

Ze všech testovacích kmenů byl nejcitlivějším a nejčastěji inhibovaným kmenem *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Z našich dosažených výsledků není možné vyvozovat konečné závěry, pro potvrzení účinků *in vitro* by bylo nutné provést další testy na širší škále druhového spektra.

ABSTRACT

Jana Štvrtecká

Evaluation of activity of potential antifungal substances through the use of microdilution broth method I

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralové

Medical bioanalytic

The aim of this thesis is to evaluate the potential *in vitro* antifungal activity of selected drugs synthesised on the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control and on the Department of Anorganic and Organic Chemistry on the Faculty of Pharmacy in Hradec Kralové.

For drug testing was used the microdilution broth method. The tested compounds were tested on followed five yeast strains and three filamentous fungi models which are pathogenic for humans: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon beigeli* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445.

80 compounds were divided into 10 groups according to their chemical structures: anilides of pyrazin carboxyl acids, arylamin pyrazines, pyrazin carboxyl acid esters, pyrazine-2,3-dinitriles, benzoxazepin-diones, diamides, styryl benzoxazoles, derivatives of (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on, ester derivatives of cholesterol and alcan acids and derivatives of thiosalicylamides.

The highest antifungal activity was observed in group of derivatives of thiosalicylamides. Advantage of this group of substances was substitution by chlorine and bromine. Whereas the least antifungal effect was found in groups of anilides of pyrazin carboxyl acids, arylamin pyrazines, pyrazin carboxyl acid esters and styryl benzoxazoles.

The most effective derivatives of thiosalicylamides were compounds T5622, T5625 and T5620; from ester derivatives of cholesterol and alcan acids the compound T6056 and from pyrazine-2,3.dinitriles the compound VL1-C1.

Trichophyton mentagrophytes 445 was the most susceptible and most inhibited strain out of all of the tested strain models.

Nevertheless, it is not possible to deduce the final conclusions from our results. For confirmation of *in vitro* activities it would be necessary to provide some more tests in a broad strain specificity.

SEZNAM ZKRATEK

AC	– <i>Absidia corymbifera</i> 272
AF	– <i>Aspergillus fumigatus</i> 231
AIDS	– Acquired immune deficiency syndrome
CA	– <i>Candida albicans</i> ATCC 44859
CG	– <i>Candida glabrata</i> 20/I
CK	– <i>Candida krusei</i> E28
CLSI	– Clinical Laboratory Standard Institute
CNS	– Centrální nervový systém
CT	– <i>Candida tropicalis</i> 156
ČR	– Česká republika
DMSO	– Dimethylsulfoxid
DNA	– Deoxyribonukleová kyselina,
MFC	– Minimální fungicidní koncentrace
MIC	– Minimální inhibiční koncentrace
MOPS	– 3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina
NCCLS	– National Committee for Clinical Laboratory Standards
PC	– Personal computer
R	– Rezistentní
RNA	– Ribonukleová kyselina
S	– Susceptible (citlivý)
SDD	– Susceptible-Dose Dependent (citlivý v závislosti na dávce)
SGA	– Sabouradův glukózový agar
TB	– <i>Trichosporon beigelii</i> 1188
TM	– <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445

1 ÚVOD

V důsledku zvyšující se úrovně zdravotní péče, tj. zavádění moderních chemoterapeutik pro nádorová onemocnění, katetrizace pacientů, rozvoj transplantančních programů, dále rozsáhlé používání širokospektrých antibiotik, a také s větší možností cestování, přibylo v posledních letech incidence mykotických onemocnění. Závažným problémem spolu se zvyšujícím se počtem infekcí je vzrůstající rezistence patogenů k účinkům antimykotik. Přitěžujícím faktorem je rostoucí počet imunoalterovaných pacientů začátkem 80. let s pandemií AIDS, zvláště u těchto pacientů způsobují houbové mykotické infekce komplikovaná a systémová onemocnění, často končící fatálně.

Proto je v současné době výzkum intenzivně zaměřen na vývoj nových, účinnějších a méně toxických antifungálních látek. Důležitou součástí výzkumu je testování účinnosti látek v podmínkách *in vitro*.

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit aktivitu potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovány byly sloučeniny syntetizované na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv a na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Pro experimenty bylo použito pět testovacích kmenů kvasinek a tři kmeny vláknitých hub patogenních pro člověka.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika houbových organismů

Houby (*Mycety*) tvoří rozsáhlou skupinu mikroorganismů, která má více než sto tisíc druhů. Dříve se houby řadily mezi stélkaté rostliny, ale některé jejich vlastnosti však vedly k tomu, že byly z rostlinné říše vyčleněny a nyní tvoří samostatný celek. Říše hub (*Fungi, Mycetes* apod.) zahrnuje chemoheterotrofní, eukaryotní, jedno- a vícebuněčné organismy, které se od rostlin odlišují zejména nepřítomností chlorofylu. Jedná se tedy většinou o organismy saprofytické nebo parazitické pro vyšší rostliny a živočichy. Významným rozdílem je také přítomnost složitých cukrů v buněčné stěně, zejména chitinu, případně chitosanu, mannanu a glukanu. Další důležitou vlastností je přítomnost steroidních látek v cytoplasmatické membráně, které na rozdíl od člověka nevznikají syntézou cholesterolu, nýbrž ergosterolu. Dále se mikromycety vyznačují schopností střídat pohlavní a nepohlavní způsob rozmnožování a tím vytvářet sexuální (*teleomorfy*) a asexuální (*anamorfy*) stádia (Ondrovčík, 2003).

Houby jsou významnou součástí životního prostředí, které ovlivňují jak pozitivně, tak i negativně. Kladný vliv je dán schopností některých druhů destruovat organické součásti odpadů a uvolňovat pro koloběh biogenní prvky. Význam pro člověka je velmi rozmanitý. V potravinářském a farmaceutickém průmyslu se využívá jejich schopností produkovat antibiotika, organické kyseliny, bílkoviny, vitamíny, enzymy, pigmenty. Využívá se také jejich kvasných vlastností pro výrobu potravin a nápojů. V neposlední řadě jsou velmi důležitou součástí vědeckého výzkumu, kde slouží jako modelové organismy ke genetickým studiím. Na druhou stranu mohou houby způsobovat velké ztráty např. v zemědělství. Některé druhy mohou negativně působit na člověka produkcí látek pro lidský organismus toxických, tzv. mykotoxinů, nebo se mohou uplatňovat jako alergeny, případně mohou způsobit přímé napadení živé tkáně. Zvláště u imunoalterovaných pacientů jsou oportunní houby schopny vyvolávat velmi závažné a komplikované systémové mykózy.

2.2 Taxonomie a charakteristika lékařsky významných hub

Přirozený systém a klasifikace hub je založena především na jejich ontogenetickém vývoji a způsobu rozmnožování. Dále pak na základě odlišné

morfologie spór a jiných buněčných struktur, popř. na základě různých biochemických vlastností. Říše hub se dělí do čtyř základních skupin: hlenky Myxomycota, Chytridiomycota, Oomycota, Eumycota. Prakticky všechny pro člověka potenciálně patogenní druhy se řadí mezi Eumycota (Buchta, 1998).

Tab. 1 Taxonomie lékařsky významných hub, Eumycota (Buchta, 1998)

TRÍDA	ŘÁD	ROD
ZYGOMYCETES	Mucorales	<i>Absidia</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>
	Entomophthorales	<i>Basidiobolus</i> <i>Conidiobolus</i>
ASCOMYCETES	Eurotiales	<i>Talaromyces</i> <i>Eurotium</i> <i>Arthroderma</i> <i>Ajellomyces</i>
	Hypocreales	<i>Claviceps</i>
BASIDIOMYCETES	Agaricales	<i>Amanita</i> <i>Boletus</i> <i>Inocybe</i> <i>Tricholoma</i>
FUNGI IMPERFECTI (DEUTEROMYCETES)	Blastomycetes	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Malassezia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Trichosporon</i>
	Hyphomycetes	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Blastomyces</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Fusarium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Histoplasma</i> <i>Microsporum</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichophyton</i>

2.2.1 Zygomycetes (houby spájkivé)

Jedná se o rychle rostoucí houby, kolonie na pevném agaru jsou tvořeny vysokým vzdušným myceliem z tlustých a polymorfních bledě se barvicích hyf, které jsou málo septované či neseptované. Charakteristické je jak pohlavní rozmnožování za vzniku zygospor, tak nepohlavní proces pomocí sporangiospor, které vznikají endogenně ve sporangíích.

Většina druhů se vyskytuje v přírodě v saprofytické podobě a tvoří podstatnou složku půdní mikroflóry. Menší část parazituje živočichy, rostliny a jiné houby. Pro člověka je potenciaálně patogenní ve smyslu oportunní infekce u imunitně či somaticky oslabených jedinců. Některé druhy produkují důležité organické kyseliny a proto se využívají v biotechnologiích, např. *Rhizopus stolonifer* při výrobě kyseliny fumarové a od ní odvozovaných léčiv (Kod'ousek, 2003).

2.2.2 Ascomycetes (houby vřeckovýtrusé)

Třída Ascomycetes je nejpočetnější všeobecně rozšířená skupina hub, která je charakterizována septovaným myceliem. Nepohlavní rozmnožování se děje prostřednictvím jedno- nebo vícebuněčných konidií, které se tvoří exogenně na specializovaných hyfách (*konidioforech*). Sexuální rozmnožování je spojené s tvorbou askospor, vznikají endogenně ve vřecku po spojení samčích (*anteridium*) a samičích (*askogonium*) specializovaných hyf a po následné meióze a mitóze. Můžeme sem zařadit jak druhy saprofytické, tak i parazitické pro rostliny a živočichy. Několik zástupců je považováno za mykorhizní - mykorhizní symbióza je vzájemně prospěšný vztah mezi kořeny rostlin a některými půdními houbami. Asi třetina patří k tzv. lichenizovaným houbám (Sedlářová a Vašutová, 2007).

2.2.3 Basidiomycetes (houby stopkovýtrusé)

Skupina hub s převážně makroskopickými plodnicemi, společným znakem jsou výtrusy, zvané basidiospóry, které vznikají na povrchu ztlustlých kyjovitých buněk, zvaných basidie. Mycelium je vláknité přehrádkované, rozlišujeme dva druhy: monokaryotické (primární) a dikaryotické (sekundární), jež je ve vegetativní fázi převažující. Pohlavní rozmnožování je výsledkem splynutí primárních mycelií za vzniku dikaryotického mycelia. Na něm se za příhodných podmínek vytváří plodnice (basidiomata), v jejichž výtrusné vrstvě dochází ke karyogamii a následné meióze. Nepohlavní rozmnožování je méně významné, exogenně se vytváří konidie, blastospory či dochází k fragmentaci stélky. Většina druhů žije saprofytický, někteří zástupci jako

mykorhizní symbionti, část parazituje na rostlinách, vzácně i na člověku (Sedlářová a Vašutová, 2007)

2.2.4 Deuteromycetes (Fungi imperfecti, houby nedokonalé)

Jedná se o uměle vytvořenou skupinu hub, která zahrnuje pouze druhy, u nichž se nevytváří teleomorfa nebo není známa, po objevení teleomorfy je druh zařazen do přirozeného systému a z Deuteromycet vyřazen. Zahrnuje anamorfy všech druhů, i těch, u kterých se teleomorfy vzácně tvoří, ale anamorfa je převládajícím stadiem. Rozmnožování se děje výhradně pomocí konidií, jež jsou tvořeny přímo na myceliu nebo na konidioforech.

Většina druhů patogenních pro člověka spadá do dvou pomocných tříd:

Blastomycetes - nesporogenní kvasinková stadia vřeckatých i stopkovýtrusných hub. Významnými zástupci jsou např. kmeny způsobující onemocnění kůže až systémové choroby organismu – *Candida*, *Cryptococcus*, kvasinkovitá stadia snětí – *Rhodotorula*.

Hyphomycetes - nejpočetnější skupina imperfektních hub zahrnující většinou anamorfy Ascomycetes např. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epidermophyton*, *Trichophyton* (Sedlářová a Vašutová, 2007).

2.3 Testovací kmeny hub

2.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans je široce rozšířená diploidní patogenní kvasinka, která u lidí způsobuje povrchové infekce sliznic a kůže a systémová onemocnění. Vlastní 6-8 chromosomů a je heterozygotní (Novák et al., 2003; Dorko et al., 2002).

C. albicans se běžně vyskytuje na mukózních membránách 80 % lidské populace. Při poruše rovnováhy mikrobiálního osídlení nebo u imunokompromitovaných pacientů se může vyvinout mukózní infekce vedoucí k orální nebo vaginální kandidóze. Nejčastěji postihuje HIV pacienty, pacienty po transplantaci kostní dřeně a onkologické pacienty po chemoterapii. Vaginální kandidóza bývá největším problémem u mladé sexuálně aktivní populace žen. U některých imunitně oslabených pacientů a u pacientů v rekonvalescenci po operacích je *C. albicans* schopna přejít do krevního řečiště a způsobit život ohrožující systémové infekce (Southern et al., 2008).

2.3.2 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis je diploidní kvasinka, která se vyskytuje na pokožce, v nose, krku a trávicím traktu zdravých lidských hostitelů po celém světě. Tato kvasinka je zodpovědná za 4-24% výskyt kandidemií (Desnos-Ollivier et al., 2008).

Candida tropicalis je označována jako potenciálně nebezpečná kvasinka schopná napadat kompromitované pacienty vnímavé k oportunním infekcím. Uvádí se, že *C. tropicalis* je jednou z nejčastěji se vyskytujících oportunních kvasinek u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Zvýšený výskyt *C. tropicalis* byl také hlášen u onkologických pacientů na nemocničních odděleních. Byla identifikována také jako časté etiologické agens u různých onemocnění, jako jsou pyelonefritidy, infekce dolního močového traktu, tromboflebitidy, artritidy, meningitidy, rozsáhlé orgánové infekce, perikarditidy a kandidové vulvovaginitidy (Fromtling et al., 1987). Napadení gastrointestinálního traktu *C. tropicalis* bylo pozorováno pouze u neutropenických pacientů (Gelfand, 1989).

C. tropicalis dobře roste v aerobních podmínkách při 25°C a 37°C, vytváří bílé drsné kolonie s moučným povlakem. Na rozdíl od *C. albicans* napadá mnohem častěji podslizniční krevní cévy a tak dokáže postihnout celý trávicí trakt. Příčinou vysoké invazivity je schopnost kvasinky produkovat extracelulární proteolytické enzymy a tak ve zvýšené míře napadat své hostitele.

2.3.3 *Candida krusei*

C. krusei je nosokomiální kvasinka, která podobně jako ostatní zástupci tohoto kmene způsobuje nebezpečné infekce u imunitně oslabených pacientů. Infekce *C. krusei* mnohdy prodlužují hospitalizaci pacientů v nemocnicích a mohou končit i smrtí, působí patogenně u pacientů s hematologickými abnormalitami a u pacientů po transplantaci. *C. krusei* je primárně rezistentní k flukonazolu, nejčastěji používanému antimykotiku, proto působí problémy s terapií, dále projevuje sníženou vnímavostí proti některým antimykotickým léčivům, jako jsou např. flucytosin a amfotericin B (Pfaller, 2008). *Candida krusei* byla nejčastěji prokázána u pacientů, kteří dříve podstoupili léčbu těmito antimykotiky. Proto je třeba zvážit přínos pacientovi a riziko vzniku rezistence při preventivní léčbě flucytosinem (Hautala, 2007).

2.3.4 *Candida glabrata*

Historicky byla *C. glabrata* považována jako součást běžné flóry zdravých jedinců (Stenderup a Pederson, 1962). Nicméně v posledních dvou desetiletích, důsledkem

selekcí tlaku azolových antimykotik, ke kterým má *C. glabrata* sníženou citlivost, se zvýšil počet infekcí přidružených s tímto houbovým agens. *Candida glabrata* se nyní objevuje jako důležitý patogen u slizničních mykóz a infekcích krevního řečiště, v posledních letech se objevuje také velmi často při ústních mykózách. V závislosti na místě infekce se v současné době řadí jako druhý nebo třetí nejčastěji izolovaný druh kvasinek ze všech ohlášených případů kandidóz. Ve srovnání s ostatními non-*albicans* *Candidy* dosahuje *Candida glabrata* nejvyššího stupně úmrtnosti, smrtelných následků dosahuje při infekcích krevního řečiště cca u 50 % nádorových onemocnění a 100% u pacientů po transplantacích kostní dřeně (Li et al., 2007).

2.3.5 *Trichosporon beigellii*

Trichosporon beigellii je hojně rozšířená kvasinka vyskytující se hlavně v půdě, ale i na lidské kůži nebo respiračním traktu spolu s normální flórou. Způsobuje plísňová onemocnění vlasů s bílým povlakem. Jedná se o neškodnou povrchovou infekci, která se běžně objevuje v tropických a subtropických oblastech. U zdravých jedinců kvasinka příležitostně způsobuje povrchové dermatitidy. U imunitně oslabených jedinců, např. u pacientů s HIV infekcí nebo předčasně narozených dětí, může vést až k systémovým mykózám (Erer et al., 2000). Nejčastěji se vyskytuje v moči zejména oslabených pacientů, vzácně může způsobovat i případy peritonitidy, chronické meningitidy, stenozní ezofagitidy, endoftalmitidy, artritidy, cholangitidy a hepatitidy (Erer et al., 2000; Mathews a Prabhakar, 1995).

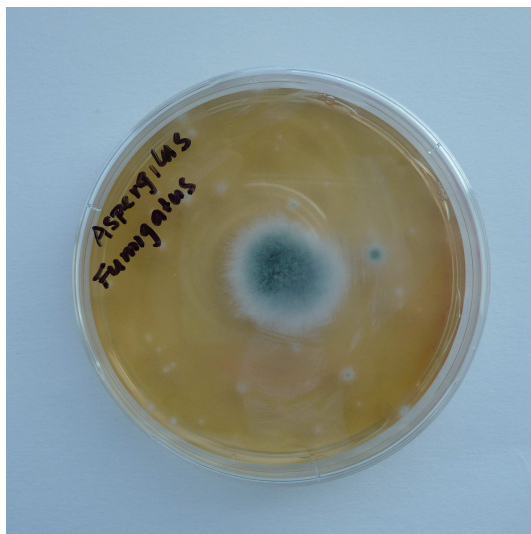
2.3.6 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je saprofytická houba, která hraje důležitou roli v přeměně uhlíku a dusíku v prostředí (Heines, 1995). *A. fumigatus* se přirozeně vyskytuje v půdě, ale přežívá a roste také v organických zbytcích. Je schopen se přenášet vzduchem a u imunitně oslabených jedinců působit fatální invazivní infekce (Latgé, 1999).

A. fumigatus považován za nejrozšířenějšího fungálního patogena, zodpovědného za více než 90 % lidských aspergilových infekcí (Latgé, 2001). Jednou z nejrozšířenějších hub je díky svým konidiím, které se přenáší vzduchem. Hojně sporuluje za tvorby tisíců konidií v průměru 2-3 μm , které jsou vlivem prostředí uvolňovány do ovzduší a mohou tak dosáhnout až do plicních sklípků (Latgé, 1999).

Inhalace konidií může u zdravého člověka vyvolat nežádoucí reakci, *A. fumigatus* považován za slabého patogena, který je zodpovědný za mnohá alergická onemocnění,

např. farmářská plíce. Tato onemocnění jsou klinicky pozorována u jedinců, kteří jsou opakovaně vystavováni působení aspergillových konidií (Latgé, 1999; Letgé 2001).



Obr. 1 *Aspergillus fumigatus* na SGA po 48 hod kultivaci při 35°C

Foto: Bc. Blanka Černá

2.3.7 *Absidia corymbifera*

Absidia corymbifera je jediná z rodu *Absidia*, která může způsobit onemocnění člověka (Constantinides, 2008). Podobně jako jiné hub, např. rod *Aspergillus*, je rod *Absidia* schopný, díky svým proteolytickým vlastnostem, pronikat kůží a působit patogenně. *A. corymbifera* je saprofytický organismus s rozšířením po celém světě. Vyskytuje se v půdě, ale dá se izolovat i z rozkládajících rostlin. Spóry se mohou přenášet inhalací, ingescí, přímým kontaktem nebo nosokomiálně (Ribes, 2000).

Je známo, že *A. corymbifera* přežívá extrémní podmínky. Byla dokonce identifikována na nálezu boty pravěkého člověka staré 5300 let (Hasselwandter a Ebner, 1994).

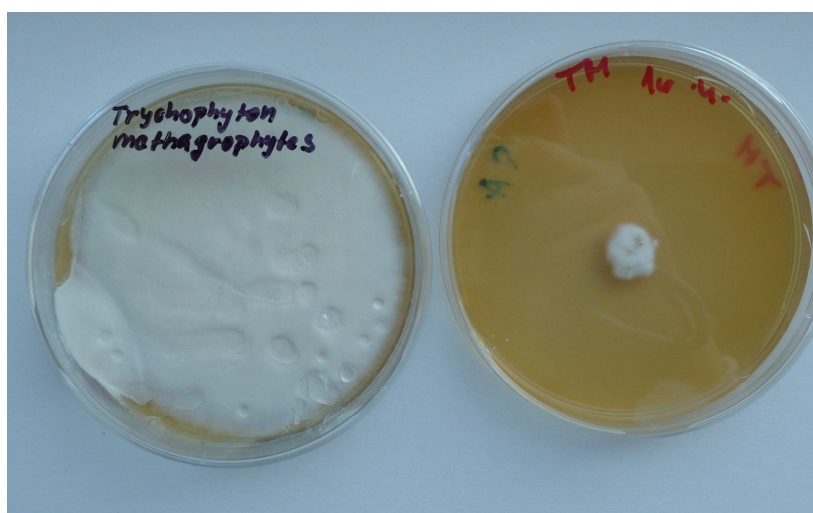
Klinicky se infekce *A. corymbifera* projevuje v kožní, plicní, rhino-cerebrální, gastrointestinální a diseminované formě (Ribes, 2000; Cloughley, 2002). Velká variabilita existuje u kožních infekcí, projevujících se od nehojících vředů k rychle se rozvíjející šedočernou vrstvou pokryté nekróze kůže (Thami, 2003).

2.3.8 *Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton mentagrophytes je členem homogenní skupiny hub zvaných dermatofyty, díky sekreci keratinolytických proteáz má schopnost poškozovat nebo

trávit keratinizované oblasti u člověka, ptáků a ostatních savců. Infekce u člověka vznikají kontaktem s postiženým zvířetem. Vyskytuje se po celém světě a napadá mnoho hostitelů (Oyeka, 2000).

Akutní infekce způsobená dermatofyty vzniká po proniknutí konidií do kůže a penetraci do stratum corneum. *T. mentagrophytes* je nenáročný, ochotně roste při vysoké vlhkosti a přítomnosti živin poskytovaných stratum corneum. To pravděpodobně vysvětluje zvýšený výskyt houbových infekcí kůže v teplém a vlhkém prostředí (Hashimoto, 1997).



Obr. 1 *Trichophyton mentagrophytes* SGA po 5 denní a 24 hod kultivaci při 27°C

Foto: Bc. Blanka Černá

2.4 Základní rozdělení houbových onemocnění

Chorobné stavy vyvolané houbami představují velmi pestrou a různorodou kapitolu, obvykle je dělíme do čtyř základních skupin:

- Mykotoxikózy
- Mykoalergózy
- Mycetismy
- Mykózy

2.4.1 Mykotoxikózy

Mezi mykotoxikózy řadíme onemocnění vyvolaná metabolickými produkty hub – mykotoxiny. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky různé chemické struktury, tyto látky jsou výhradně produkty sekundárního metabolismu hub. Nejvýznamnějšími

producenty jsou zástupci rodů *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Phoma* a *Stachybotrys*. K intoxikaci dochází nejčastěji kontaminovanou potravou, vzácně také inhalací a přímým kontaktem. Pro vyšší živočichy představují mykotoxiny významný rizikový faktor. Na organismus působí celou řadou účinků (Ondrovčík, 2003):

- **Akutní a chronická toxicita** – závisí na struktuře toxinu a na druhu živočicha jež je účinkům vystaven. Významnými zástupci jsou např. aflatoxiny a ochratoxiny, které na organismus působí hepatotoxicky, citrinin a ochratoxiny jsou výrazně nefrotoxické a citreoivridin nebo kyselina penicilová vykazují účinky kardiotoxické.
- **Cytotoxicita** – projevuje se především zástavou mitózy a inhibicí růstu, a to především při působení aflatoxinů a cytochalazinů.
- **Mutagenita a teratogenní účinky** – jako mutageny se uplatňují mykotoxiny, které interferují s DNA, např. aflatoxin B, fusarin C, sterigmatocystin, versicolorin A nebo deriváty antrachinonu. Teratogenita byla experimentálně prokázána u aflatoxinu B, citrininu a ochratoxinu A.
- **Imunosupresivní účinky** – časté jsou především u hub rodu *Fusarium*. Mezi časté toxiny s tímto účinkem se řadí především aflatoxiny, ochratoxin A nebo kyselina mykofenolová (Ondrovčík, 2003).

2.4.2 Mykoalergózy

Jako mykoalergózy označujeme hypersenzitivní reakce imunitního systému na některé metabolické produkty a hmotné částice houbovitého původu. Alergické stavy hrozí u vnímavých osob všude tam, kde je masivní nárůst plísňového mycelia a v ovzduší vysoký počet spor nebo mykotoxinů. Vcelku se tyto stavy zásadně neliší od přecitlivělostí vyvolaných jinými alergeny. K nejčastějším alergenním houbám se řadí např. houby rodu *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a některé kvasinky (Bednář, 1996).

2.4.3 Mycetismy

Jedná se o chorobné stavy vzniklé požitím plodnic vyšších hub a následné intoxikaci organismu působícími toxiny. Tyto toxiny se dělí do dvou skupin: cytotoxiny (amanitoxiny, phallotoxiny) a neurotoxiny (muskarin). Phallotoxiny jsou po požití odpovědné za gastrointestinální obtíže, amanitoxiny způsobují poškození somatických buněk tím, že inhibují proteosyntézu RNA polymerázy II. Vliv muskarinu na organismus je dán stimulací parasymptiku, jiné neurotoxiny mohou způsobovat

halucinogenní nebo anticholinergní efekty. Nejčastějšími původci u nás jsou např. *Amanita phalloides*, *Amanita pantherina*, *Amanita muscaria*, *Entoloma lividum*, *Boletus satanas* (Buchta, 1998).

2.4.4 Mykózy

Jako mykózy označujeme pravá infekční onemocnění, která jsou vyvolána vesměs mikromycetami, ve většině případů se řadí mezi houby vřeckaté nebo imperfektní a jen zcela výjimečně mezi houby stopkovýtrusé. Houby napadají tkáň nebo tělní tekutiny a následnou proliferací a diferenciací vedou k jejich poškození (Bednář, 1996).

Podle rozsahu postižení rozlišujeme mykózy:

- **lokalizované** – je-li postižen jeden orgán nebo určitá anatomická lokalita
- **systémové (diseminované, generalizované)** – jsou-li postiženy dva a více orgánů

Dělení podle anatomické lokalizace:

- **povrchové** (superficiální)
- **kožní** (kutánní)
- **podkožní** (subkutánní)
- **hluboké** (orgánové, viscerální)

2.4.4.1 Patogeneze

I když u různých mikromycet je základ patogenity multifaktoriální, u většiny mykotických infekcí jsou nutné základní kroky k rozvoji onemocnění:

1. **Adherence** na sliznici nebo stratum corneum.
2. **Penetrance** do tkáně hostitele pro dosažení cílových orgánů. Některé houby při invazi do tkáně přecházejí z vláknité formy do kvasinkovité, což je zřejmě způsobeno změnou metabolismu (př. houby dimorfní). Naopak u kvasinky *Candida albicans* je invaze spojena s přeměnou ve formu vláknitou.
3. **Množení ve tkáni** je možné pouze za předpokladu, že houby snášejí teplotu a fyzikálně chemické podmínky prostředí. Musí být také schopny překonávat obranné mechanismy hostitele např. schopnost tvořit cytotoxiny proti imunokompetentním buňkám.
4. **Poškození tkáně** je zřejmě působeno přímo invazí s poškozením buněk a rovněž toxickým účinkem zánětlivé reakce. Houby mohou také tvořit velké masy, které vyvolávají obstrukci a poškození např. ledvin nebo bronchů. Některé jsou schopné prorůstat cévami a vést ke vzniku trombů a nekróz. Invazivní houby během infekčního procesu nevyklučují toxiny škodlivé pro hostitele (Bednář, 1996).

2.4.4.2 Povrchové mykózy

Povrchové mykózy jsou vyvolány saprofytickými houbami, lokalizovány jsou v nejsvrchnějších vrstvách kůže tj. stratum corneum. Nejčastější povrchovou mykózou je Pityriasis versicolor. Jedná se o chronické, nezánettivé onemocnění způsobené lipofilní kvasinkou *Malassezia furfur*. Napadá místa s větším výskytem mazových žláz – střed hrudníku, postranní části trupu, odtud se může dále šířit i na horní končetiny a krk. Typickým projevem jsou růžové až světle hnědé, ostře ohraničené okrouhlé skvrny velikosti čočky. Ložiska se postupně zvětšují, snadno se olupují a vytvářejí souvislé depigmentované léze, které jsou až na výjimky nezánettivé (Stuchlík, 2007).

2.4.4.3 Kožní mykózy (dermatomykózy)

Vyvolány jsou houbami, které se množí pouze v keratinových vrstvách kůže a kožních adnex (vlasy, nehty). Nejvýznamnějšími patogeny jsou dermatofyta, skupina blízce příbuzných hub, které patří do tří rodů: *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton* (Bednář, 1996).

Mykózy vyvolané dermatofyty se označují jako dermatofytózy, protože klinicky nelze velmi často určit původce onemocnění, používáme pro ně název *tinea*. Podle postižené lokality pak hovoříme o *tinea capitis* (vlasy), *tinea barbae* (vousy), *tinea manuum* (ruce), *tinea pedum* (nohy), *tinea corporis* (hladká kůže), *tinea unguium* (nehty), atd. Podle zdroje nákazy a místa přirozeného výskytu můžeme dermatofyty rozdělit na tři skupiny:

1. **Geofilní** - druhy běžně žijící v půdě (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi*).
2. **Zoofilní** - rezervoárem je zvíře, nejčastěji kočka, pes (*Microsporum canis*), hovězí dobytek (*Trichophyton verrucosum*), drobní hlodavci, především morčata (*Trichophyton mentagrophytes*), zánettivá reakce je výrazná, intenzivnější než u hostitelského zvířete, ale s tendencí k rychlejšímu hojení.
3. **Antropofilní** - primárně vázané na člověka (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum*), zánettivá reakce bývá malá nebo zcela chybí, onemocnění má sklon k chronicitě (Stuchlík, 2007).

2.4.4.4 Podkožní mykózy

Jsou vyvolávány houbami, které žijí saprofytický v půdě, na rozkládajících se rostlinách a dřevě. Onemocnění vzniká při poranění a zanesení mykotického agens do rány, postiženy jsou hlubší vrstvy kůže, subkutánní tkáň, popř. také kosti. Výskyt této infekce je především v subtropických a tropických oblastech. Rozšířená je především

sporotrichóza jejímž původcem je dimorfní houba *Sporothrix schenckii*. Jedná se o chronický granulomatózní zánět tvořící mnohočetná ložiska, abscesy až ulcerace (Bednář, 1996).

2.4.4.5 Hluboké (systémové) mykózy

Systémové mykózy jsou závažná a život ohrožující onemocněním, dochází k poškození jednoho nebo více orgánů anebo se jedná o diseminaci s následným nebezpečím septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů.

Rozlišujeme mykózy primární a sekundární. U primárních jsou nečastějšími původci dimorfní houby rodu *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*. U zdravých jedinců má postižení těmito agens asymptomatický nebo mírný průběh, nejčastěji se projevující jako pulmonální infekce. V jiných případech může být původcem primárních mykóz kvasinka *Cryptococcus neoformans*, většina infekcí má asymptomatický průběh, u jedinců s poškozením buněčné imunity vyvolává závažné systémové onemocnění s afinitou k CNS (Buchta, 1998).

Jako sekundární mykózy označujeme infekce imunoalterovaných pacientů způsobené oportunními houbami, které pro zdravého jedince nepředstavují reálné nebezpečí. V našich podmínkách se setkáváme zejména s kandidami, aspergily, kryptokoky a zygomycetami.

Kandidóza – známo je asi 150 druhů kandid, některé z nich se uplatňují jako původci onemocnění u člověka. Nejčastějšími původci jsou *Candida albicans*, dále tzv. non-*albicans* kmeny *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata*. Kandidové infekce lze rozdělit na formy mukokutánní a systémové. Mukokutánní formy se objevují jak u imunokompetentních, tak u imunodefektních pacientů, kde mají velmi těžký průběh. Mezi nejčastější infekce patří soor, oesophagitis, intestinální kandidózy, vulvovaginální, kožní, a nehtové infekce, balanitis, dermatitis. Při formě systémové dochází k izolovanému postižení orgánů (játra, plíce, ledviny, CNS, kostní dřeň), diseminaci, fungémií a septikémií (Tomšíková, 2006).

Aspergilóza – nejčastějším původcem aspergilóz jsou vláknité houby *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger*. Aspergily patří k nejrozšířenějším houbám v prostředí, jako bioaerosoly jsou stále přítomné v ovzduší. Vzhledem k jejich velikosti (2,5 – 3,0 μm) se dostávají až do plicních alveolů, kde mohou působit jako saprofité, alergeny nebo invazivní původci. Podle toho lze rozdělit klinické formy: saprofytická aspergilóza (aspergilom), alergická bronchopulmonální aspergilóza a invazivní aspergilová pneumonie (Tomšíková, 2006).

Zygomykóza – lékařsky nejvýznamnějšími zástupci jsou plísně řádu Mucorales, tj. rody *Mucor*, *Rhizopus* a *Absidia*. Člověk se infikuje nejčastěji vdechnutím spor, méně alimentárně nebo kožním poraněním. Z infekcí je nejběžnější forma rhinocerebrální s postižením nosu, paranasálních dutin, očnice a mozku. Nověji tato infekce přibývá při orgánových transplantacích, mycelium hub rychle prorůstá do lumen vén a artérií, kde vyvolává trombózy a rozsáhlé nekrózy tkáně. Systémová zygomykóza má velmi rychlý průběh a prakticky stoprocentní smrtelnost (Bednář, 1996).

2.5 Laboratorní diagnostika lékařsky významných hub

Pro přesné určení etiologického agens je důležitý správný odběr vzorku a transport do laboratoře. Při provádění odběru se musí postupovat tak, aby nedošlo k sekundární kontaminaci.

Při vyšetření povrchových mykóz jsou nejvhodnějšími vzorky šupinky kůže, vzorky vlasů s vlasovými kořínky, části nehtů. Při podezření na podkožní mykózy jsou odebírány vzorky krusty, seškrabky, aspiráty hnisu a bioptický materiál. Při infekcích sliznic se provádějí stěry z postiženého místa a do laboratoře jsou odesílány v transportních půdách. U systémových infekcích se odběry provádějí z co největšího počtu míst.

Pro diagnostiku etiologického agens v infikovaném organismu slouží přímé a nepřímé metody průkazu.

2.5.1 Mikroskopické vyšetření

Pro mikroskopické vyšetření je možné preparáty připravit přímo z infekčního materiálu nebo z kultur. Vzorky nehtů, šupinky kůže a vlasy lze vyšetřit po částečném natrávení tkáně hydroxidem sodným nebo draselným. V preparátech posuzujeme houbové elementy, hodnotíme jejich morfologii a počet, sledujeme délku, sílu, členění, tvar a uspořádání mikrostruktur.

Tekuté materiály, jako jsou sputa, punktáty, vaginální sekrety a podobně, je možné pro lepší diferenciaci struktur barvit např. dle Grama, Giemsy nebo použít fluorescenční znázornění (Franc a Hejzlar, 1984).

Nejlepším prostředkem k průkazu a studiu téměř neporušených houbových elementů, jejich růstu a uspořádání ve tkáních slouží histologické preparáty. Je několik specifických metod barvení, za nejvhodnější se považuje PAS (Periodic Acid Schiff) a stříbření dle Grocotta (Fragner, 1984).

2.5.2 Kultivační vyšetření

Univerzální kultivační půdou pro veškeré mikromycety je Sabouradův agar obohacený o glukózu příp. maltózu. Selektivní agar pro kultivaci dermatofytů obsahuje cykloheximid a chloramfenikol. Přídavek antibiotik omezuje růst saprofytických druhů, které jako rychleji rostoucí potlačují vývin patogenů a způsobují kontaminaci a znehodnocení kultivací (Franc a Hejzlar, 1984). U některých infekcí však může přídavek cykloheximidu výsledky zkreslovat, poněvadž je schopen potlačovat růst celé řady vláknitých hub a některých kvasinek. Proto při podezření na smíšené infekce dermatofytů s kvasinkami, případně jinými houbami, užíváme současně jak půd s chloramfenikolem a cykloheximidem, tak i jen s chloramfenikolem (Fragner, 1984).

2.5.3 Biochemická identifikace

Cukerné auxanogramy – slouží k bližší identifikaci kvasinek, znázorňují nám, který cukr je kultura schopná asimilovat. V pozitivním případě dochází k mléčnému zákalu kolem cukerných disků na povrchu agaru s naočkovaným kmenem.

Dusíkaté auxanogramy – nám ukazují na zdroj dusíku, který je kultura schopná asimilovat.

Zymogramy – slouží ke zjištění kvasných schopností kultur. Používají se půdy obsahující různé cukry a acidobazický indikátor, zkvašení je zaznamenáno změnou zbarvení pH indikátoru (Fragner, 1984).

V dnešní době se často používají spíše komerční stripy (ID 32, Auxacolor, atd.)

2.5.4 Sérologické testy

V posledních deseti letech hraje sérologie systémových mykóz významnou roli nejen v diagnostice, ale také ve sledování pacientů během terapie. Účinnost sérologických testů závisí na kvalitě antigenních preparátů. Purifikované molekuly mohou dávat mnohem specifitější reakce.

Sérologické testy: imunodifúze, ELISA, imunobolling, dip-stick test, exoantigen test pro identifikaci kultury dimorfních hub.

Použitá metoda musí zjistit, zda je infekce vůbec přítomna a zda pozitivní nález odráží invazi nebo kolonizaci infekce. Důležitá je také volba vyšetřovaných vzorků. Závěrečná diagnostika však stále spočívá na izolaci a kultivaci agens a na histologickém výsledku (Tomšíková, 2006).

2.5.5 Molekulárně biologické techniky

Do popředí diagnostiky houbových infekcí se dostává možnost využití analýzy sekvencí nukleových kyselin u těch druhů hub, kde použití běžných diagnostických metod je problematické buď pro obtížnou kultivaci nebo pro zkřížené imunologické reakce.

Sondy tvořené sekvencemi některých kyselin lze využít pro diagnostiku a studium patogeneze onemocnění. Lze vybrat optimální sondy komplementární k danému úseku nukleové kyseliny, které jsou schopné prokázat jak jednotlivé druhy mikrobů, tak toxigenní kmeny anebo kmeny rezistentní (Tomšíková, 2006).

2.6 Terapie mykotických infekcí

Pro úspěšnou léčbu houbových onemocnění je důležité přesné stanovení diagnózy na základě klinického, mikroskopického, kultivačního, eventuálně histologického a sérologického vyšetření. O vhodnosti léčby také rozhoduje v jakém stadiu je onemocnění zachyceno (akutní, subakutní a chronické), jeho lokalizace (vlasatá část hlavy, volná kůže, intertriginózní lokalizace, nehty) a hloubka (Diamantová, 2003). K léčbě kožních a slizničních mykóz často postačuje lokální aplikace antimykotik. Při myotické sepsi nebo při napadení vnitřních orgánů se musí přistoupit k systémové terapii.

Léčiva pro terapii mykóz, mají rozdílné mechanismy účinku. Místem zásahu může být cytoplazmatická membrána buňky hub. Působením antibiotik nystatinu nebo amfotericinu B vznikají hydrofilní póry, které působí netěsnost membrány. Další možností působení je inhibice syntézy ergosterolu, který je pro buněčnou membránu nezbytný. Místem zásahu je také metabolismus buněčného jádra při podání flucytozinu (Lüllmann, 2004) nebo buněčná stěna (echinokandiny).

V praxi se setkáváme s těmito skupinami léčiv: polyenová antibiotika, azolová antimykotika (imidazolové a triazolové deriváty), alylaminy, morfoliny a další.

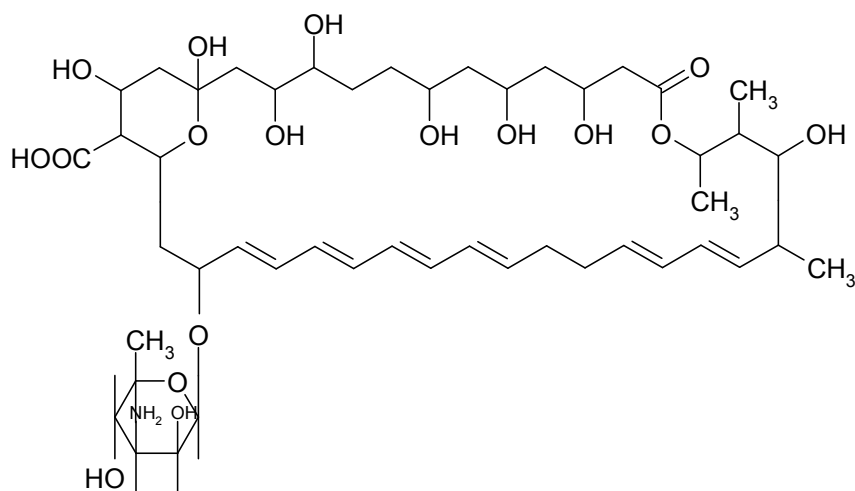
2.6.1 Látky vytvářející póry: polyenová antibiotika

Z dostupných antimykotik patří polyenová k nejstarším, která se nevstřebávají po perorálním podání. Po parenterální aplikaci jsou značně toxická, špatně pronikají do tkání, přestože působí pouze fungistaticky, jejich antimykotický efekt je značný (Suchopár, 1996).

Mechanismus účinku je dán schopností zabudovat se společně s ergosterolem do buněčné membrány takovým způsobem, že vznikne hydrofilní pór. Tím tyto látky mají vlastnosti ionoforů (Lüllmann, 2004).

Nystatin

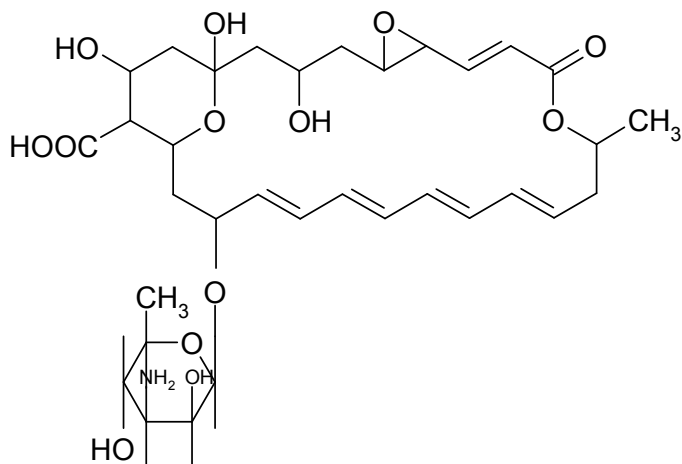
Antibiotikum produkované *Streptomyces noursei*. Používá se při léčbě kandidóz a aplikuje se výhradně lokálně. Po perorálním podání se nevstřebává a proto se užívá při terapii mykotických nemocí gastrointestinálního traktu. Při onemocnění sliznic dýchacích cest je možné jej podávat i ve formě aerosolu (Lüllmann, 2004; Suchopár, 1996).



Obr.1 Nystatin

Natamycin (pimaricin)

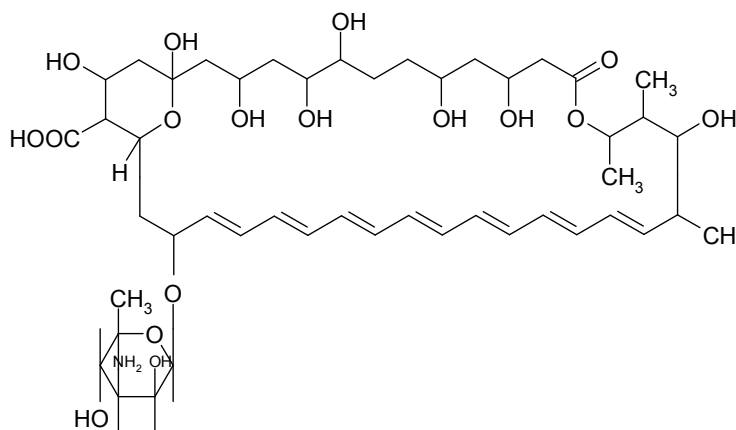
Polyenové lokální antibiotikum se stejnými vlastnostmi a použitím jako nystatin, získává se ze *Streptomyces natalensis* (Lüllmann, 2004).



Obr.2 Natamycin

Amphotericin B

Antibiotikum se širokým antimykotickým spektrem účinku, produktem *Streptomyces nodosus*. Určeno pouze k parenterální aplikaci, působí fungistaticky, při vyšších koncentracích fungicidně. Není schopen pronikat do CNS, sklivce, slin a moči. Využívá se k terapii infekcí vyvolaných *Cryptococcus neoformans*, aspergily, blastomycety, kandidami, histolazmaty a některými kmeny rodu *Mucor* a *Rhizopus*. Lokálně se používá pouze k terapii kandidóz. Mezi nežádoucí účinky po intravenózní aplikaci dominuje poškození ledvin, zřídka je popisována i porucha jaterních funkcí. Výrazně vyšší toleranci a nižší výskyt nežádoucích účinků mají liposomální lékové formy, od běžné formy se bohužel liší výrazně i cenou (Lüllmann, 2004; Suchopár, 1996).



Obr. 3 Amphotericin B

2.6.2 Inhibitory syntézy ergosterolu

2.6.2.1 Azolová antimykotika

Mezi azolová antimykotika řadíme sloučeniny, které jako aktivní skupinu obsahují imidazolový nebo triazolový kruh. Obě skupiny patří mezi velmi účinná a širokospektrá antimykotika s fungistatickými účinky (Hynie, 2003).

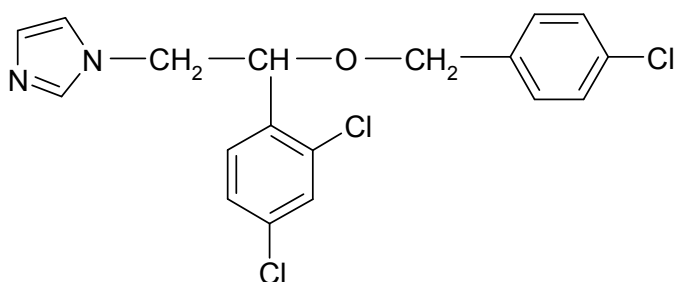
Účinek azolových derivátů je dán schopností inhibovat syntézu ergosterolu, ekvivalentu cholesterolu v buněčné membráně hub. Azolová antimykotika se vážou v cytochromu P450 na železo hemu, které je nutné pro funkci 14- α -demetylázy, a tím zabraňují přeměně lanosterolu na ergosterol (Lüllmann, 2004).

Imidazolové deriváty:

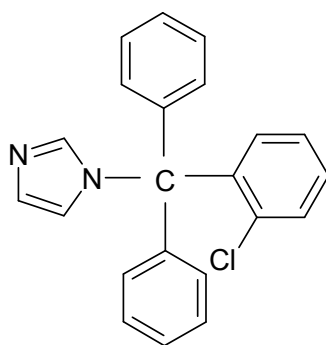
Imidazolová antimykotika se používají u závažných a chronických mykotických infekcí. Mají dobrou toleranci a relativně malé nežádoucí účinky. Z imidazolových

derivátů první generace mají v současnosti největší význam **ekonazol** a **klotrimazol**, hojně jsou dnes využívány v dermatologii a gynekologii. V 70. letech minulého století se pravidelně používal k terapii systémových mykóz také **mikonazol**, dnes se ale tato látka pro řadu vedlejších účinků již nevyrábí a byla nahrazena modernějšími triazoly (Doležal, 2002; Carrillo-Munoz, 2004).

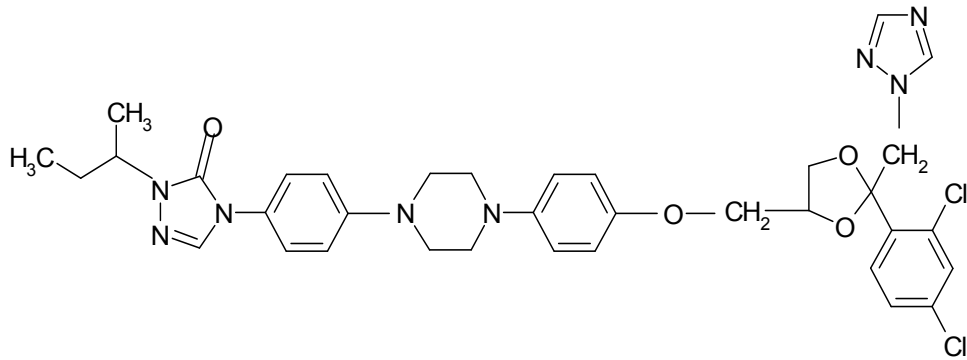
Zástupcem druhé generace imidazolových derivátů je perorální antimykotikum **ketokonazol**, využívá se v dermatologii a gynekologii, lze jej také využít k léčbě a profylaxi lehčích forem kandidóz a endemických mykóz (Doležal a Buchta, 2006). V některých případech, zvláště při déletrvajícím podání se však vyskytly těžké poruchy jater. Ketokonazol inhibuje cytochrom-P450-dependentní monooxygenázu a tím i biotransformaci různých léčiv. Vysoké dávky také vedou ke snížení syntézy steroidních hormonů (Lüllmann, 2004).



Obr. 4 Ekonazol



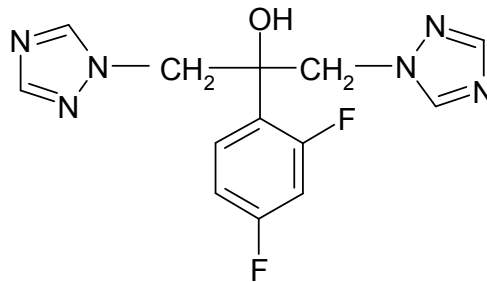
Obr. 5 Klotrimazol



Obr. 8 Itrakonazol

Flukonazol

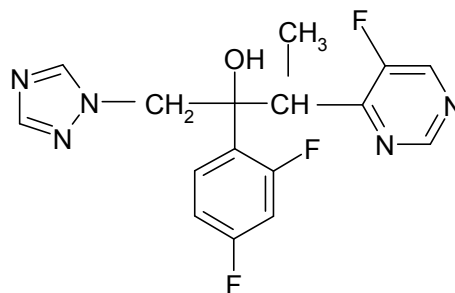
Možnost perorální i parenterální aplikace, má dlouhý biologický poločas (cca 30 hod). Vyžívá se zejména u mykóz vnitřních orgánů vyvolaných kandidami a kryptokoky. Poměrně dobře se snáší, mohou se však vyskytnout gastrointestinální potíže a exantém (Lüllmann, 2004). Široké používání flukonazolu sebou nese i riziko vývoje rezistence při dlouhodobém nebo opakovaném podávání, zejména u pacientů s AIDS trpících chronickou orofaryngeální kandidózou (Doležal a Buchta, 2006).



Obr. 9 Flukonazol

Vorikonazol

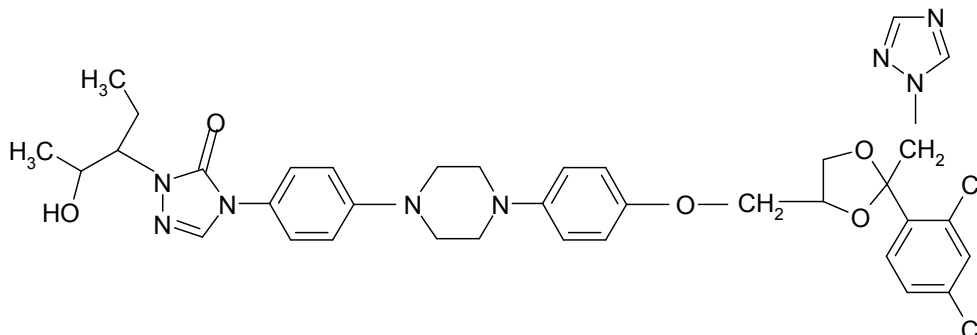
Vyznačuje se vysokou aktivitou na většinu druhů kandid a fungicidním účinkem na aspergily. Je lékem volby u prokázaných závažných aspergilových infekcí a infekcí vyvolaných flukonazol rezistentními kandidami (Marek, 2005).



Obr. 10 Vorikonazol

Posakonazol

Posakonazol je hydroxylovaným analogem itrakonazolu, jedná se o širokospektré triazolové antimykotikum, zejména pak s vystupňovanou aktivitou proti aspergilům. Navíc má i důležitý *in vitro* účinek proti zygomycetům (Doležal a Buchta, 2006).



Obr. 11 Posakonazol

Ravukonazol

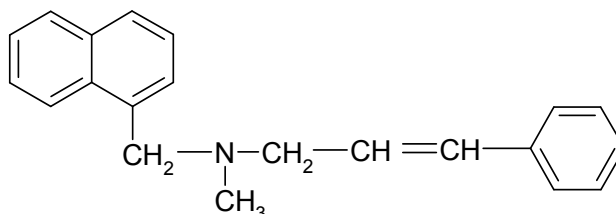
Ravukonazol je širokospektrý derivát flukonazolu s velmi dobrým efektem na kvasinky, působí také na flukonazol rezistentních kmenů, dále na kryptokoky a řadu vláknitých hub, včetně aspergilů (Doležal a Buchta, 2006).

2.6.2.2 Allylaminy

Allylaminové deriváty jsou synteticky získané látky, jejichž mechanismem účinku je inhibice biosyntézy ergosterolu, avšak na rozdíl od azolových chemoterapeutik v časnější fázi, specificky se vážou na skvalenepoxidázu, která katalyzuje jeden z prvních kroků biosyntézy (Doležal, 2002).

Naftifin

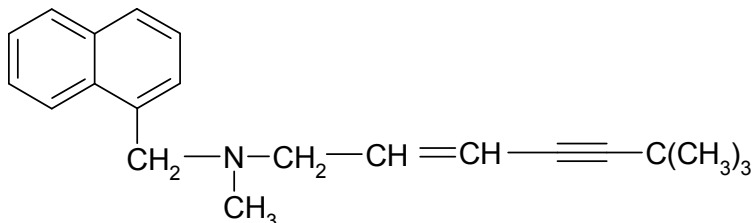
Naftifin působí fungicidně a má široké antimykotické spektrum, navíc působí antiflogisticky. Účinný je zejména proti dermatofytům a kandidózám včetně trichomykóz a onychomykóz. Při lokální aplikaci není třeba se obávat systémových nežádoucích účinků (Lüllmann, 2004).



Obr. 11 Naftifin

Terbinafin

Podobně jako naftifin se používá lokálně, navíc je však vhodný i pro perorální podání. Může se použít při mykózách nehtů a kůže vyvolaných dermatofyty a nereagujících na lokální léčbu (Lüllmann, 2004).

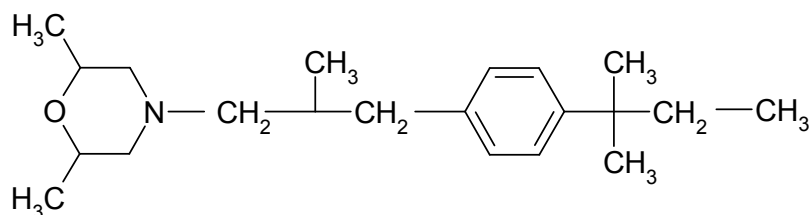


Obr. 12 Terbinafin

2.6.2.3 Morfoliny

Amorolfin

Amorolfin je fungicidní morfolinový derivát, který inhibuje syntézu ergosterolu na dalším stupni za místem působení azolů. Využívá se pro léčbu infekcí vyvolaných dermatofyty a kvasinkami, dobře prostupuje nehtovou ploténkou a vytváří účinné koncentrace i v nehtovém lůžku, používá se ve formě laku na nehty (Lüllmann, 2004).



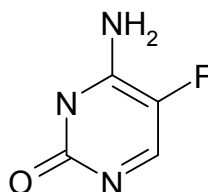
Obr. 13 Amorolfin

2.6.3 Látky zasahující do funkcí buněčného jádra

Flucytozin

Díky přítomnosti enzymu cytozindeaminázy u některých hub, dochází intracelulárně k jeho konverzi na 5-fluoruracil, který účinkuje jako antimetabolit při syntéze nukleové kyseliny. Používá jako antifungální léčivo s relativně úzkým spektrem účinku, působí především na kandidy a kryptokoky, částečně i na aspergily a některé původce subkutánních mykóz. Flucytosin má velmi dobrou farmakokinetiku, eliminační poločas je cca 4 hod, ale bohužel na něj často vzniká sekundární rezistence. K podání je v perorální formě, u akutních, život ohrožujících mykóz lze použít i intravenózní infuze.

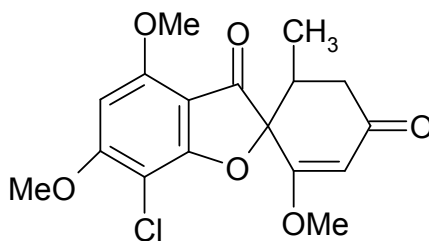
Používá se nejčastěji v kombinaci s amfotericinem B, ale v poslední době i s triazolovými chemoterapeutiky. V ČR není tento preparát registrován (Barchiesi et al., 2000; Lüllmann, 2004).



Obr. 14 Flucytozin

Griseofulvin

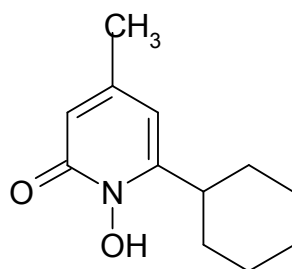
Přírozené antibiotikum produkované mikromycetou *Penicillium griseofulvum*. Působí na dermatofyty rodu *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*. Mechanismus účinku spočívá v inhibici mitózy, zasahuje na úrovni mitotického vřeténka a vede k poškození syntézy nukleových kyselin s následnou poruchou růstu hyfových vláken (Borgers, 1980). Griseofulvin se po delším užívání kumuluje v keratinizovaných tkáních, kde působí fungistaticky. Podává se takřka výhradně v perorální formě, k místu svého působení musí dospět krevní cestou, nejlépe se vstřebává po jídle bohatém na tuky (Lüllmann, 2004). Postupně je ze své pozice vytlačován výhodnějšími antifungálními preparáty jak ve smyslu širšího spektra, tak příznivějšího farmakologického profilu (Dastghaib, 2005).



Obr. 15 Griseofulvin

Ciklopirox

Léčivo s širokým antimykotickým spektrem, dobře proniká do hlubších vrstev kůže a nehtů i při lokálním nanášení. Má podobný profil jako amorolfín, ale s jiným mechanismem účinku. Působí jako inhibitor proteosyntézy, tím že narušuje transport bílkovin do nitra buněk. Účinná látka se v topických přípravcích nachází ve formě soli s olaminem (Carrillo-Munoz, 2004).



Obr. 16 Ciklopirox

2.6.4 Látky inhibující syntézu buněčné stěny (echinokandiny)

Kaspofungin

Jde o semisyntetický polycyklický polypeptid, interferuje se specifickým enzymem hub, s 1,3- β -glukansyntázou. Látka má široké antimykotické spektrum, působí na infekce vyvolané kandidami a aspergily. V klinických studiích bylo dosaženo dobrých výsledků zejména u pacientů s oslabenou imunitou a invazivními aspergilovými infekcemi, kdy nebylo možné použít jiná antibiotika. Kaspofungin se podává infuzí (Lüllmann, 2004).

Anidulafungin

Anidulafungin je semisyntetický echinokandin, lipopeptid syntetizovaný z produktu fermentace *Aspergillus nidulans*. Způsobuje inhibici tvorby 1,3- β -D glukanu, hlavní složky buněčné stěny hub. Antimykotikum vykazuje fungicidní aktivitu proti kandidám a aktivitu proti oblastem aktivního buněčného růstu hyf rodu *Aspergillus fumigatus*. Farmakokinetika je charakterizována rychlým biologickým poločasem tj. cca 0,5 – 1 hod.

Micafungin

Jedná se o antimykotikum ze skupiny echinokandinů, nekompetitivně inhibuje syntézu 1,3- β -D glukanu. Podobně jako anidulafungin vykazuje fungicidní účinky proti většině kvasinkám rodu *Candida* a významně inhibuje aktivně rostoucí hyfy rodu *Aspergillus*. Micafungin se aplikuje intravenózně, farmakokinetika je v rozmezí denních dávek 12,5-200 mg a 3-8 mg/kg lineární. Při opakovaném podávání nedochází ke kumulaci, ustáleného stavu se obvykle dosáhne během 4 až 5 dnů.

2.7 Testování antifungální aktivity v podmínkách *in vitro*

Stanovení *in vitro* citlivosti mikromycet k antifungálním látkám nabývá na významu se zvyšujícím se výskytem mykotických infekcí. Testování je důležitou součástí výzkumu a vývoje nových antimykotických léků, vyšetřování slouží k vyhledávání nových látek s potenciální antimykotickou aktivitou. Dalším důvodem je vyskytující se rezistence některých druhů mikromycet a potřeba klinika volit nejen vhodný preparát, ale také dávku v závislosti na citlivosti mikromycety k danému antimykotiku (Maláttová, 2007).

Vzhledem k morfologické a fyziologické variabilitě hub a různorodosti struktury antifungálních látek, nelze vypracovat univerzální metodiku testování antimykotik *in vitro*. Příslušné testy musí splňovat několik základních podmínek: metoda musí být standardizována, výsledky musí být reprodukovatelné a tedy v rámci i mimo laboratoř srovnatelné a nakonec musí existovat korelace mezi výsledkem testu *in vitro* a výsledkem terapie pacienta (Buchta, 2002).

2.7.1 Standardizované postupy

Celosvětově respektovaná Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI dříve NCCLS) schválila již v roce 1997 dokument M27-A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti kvasinek k antimykotikům (v platnosti je verze M27-A2 z roku 2002) a později dokument M38-A pro vláknité mikromycety. Jedná se o metodu kvantitativní, která poskytuje možnost stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) a umožňuje dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD–Susceptible-Dose Dependent), rezistentní (R). Metodika pro testování citlivosti kvasinek k flukonazolu diskovou difúzní metodou, publikovaná v roce 1996 Barrym a Braunem, byla v roce 2004 uznána CLSI jako standard M44-A (Maláttová, 2007).

Tab.2 Interpretační kritéria standardu CLSI M27 [MIC v g/ml] (Maláttová, 2007)

	citlivý (S)	citl. závislá na dávce (SDD)	intermediární	rezistentní (R)
flukonazol	≤ 8	16-32		≥64
itrakonazol	≤ 0,125	0,25-0,50		≥1
vorikonazol	≤ 1	2		≥4
flucytosin	≤ 4		8-16	≥32

2.7.2 Diluční techniky

U dilučních testů se testovaná látka ředí pomocí tekuté půdy (bujónu) nebo pomocí agarového média. Hodnotí se stupeň zákalu dle daných kritérií. Tyto metody umožňují kvantitativní stanovení citlivosti, vyjádřenou jako MIC. Rovněž lze stanovit minimální fungicidní koncentraci (MFC) (Buchta, 2002).

Diluční bujónová metoda:

Provádí se ve dvou základních modifikacích: zkumavková makrodiluce a destičková mikrodiluce.

Makrodiluční bujónový test – představuje standardní dokument M27-A2 pro testování kvasinek. Jedná se o základní test, od kterého se odvozují ostatní vyvíjené metody. Metoda se vyznačuje dobrou přesností, standardizací a reprodukovatelností. Pro svou náročnost provedení je metoda nevhodná pro rutinní použití (Buchta, 2002).

Mikrodiluční bujónová metoda – je zmenšeným formátem standardu M27-A2, test se provádí v mikrotitračních destičkách s plochým dnem s dvanácti sloupci a osmi řadami. Jamky jsou plněny růstovým médiem obsahující odstupňované koncentrace testované látky, poslední sloupec slouží jako kontrola, obsahuje růstové médium s rozpouštědlem bez testované látky. Jako růstové médium slouží RPMI 1640, které může být obohaceno o glukózu. Poté se jamky naočkují připraveným inokulem testovacích kmenů hub, po inkubaci se odečítají hodnoty MIC vizuálně anebo spektrofotometricky (Buchta, 2002). Pro fungistické látky je jako kritérium MIC zvolena 80% a vyšší inhibice (IC_{80}) nárůstu testovacích kmenů v porovnání s kontrolou .

Agarová diluční metoda:

Testovaná látka o dané koncentraci je aplikována do agaru a testované kmeny hub jsou naočkovány na povrchu agarové plotny. Metoda je relativně přesná, standardizovaná a reprodukovatelná. Technicky, časově i materiálně je však náročná, a proto její hlavní uplatnění je v experimentální oblasti (Buchta, 2002).

2.7.3 Difúzní agarové techniky

Diskový difúzní test:

Je to metoda jednoduchá, levná a spolehlivá. Je založena na principu difúze antimykotické látky z disku do agarové půdy, kde se vytvoří koncentrační spád testovaného antimykotika (Buchta, 2002). Podle dokumentu CLSI M44-A je pro testování je doporučen Müller-Hinton agar obohacený 2 % glukózy a 0,5 g methylenové modři, pH media by se mělo pohybovat mezi 7,2 – 7,4. Disková difúzní metoda v

kombinaci s PC technikou umožňuje dle zóny inhibice růstu vytvořené kolem disku zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce, rezistentní. Interpretační kritéria jsou dána pouze pro flukonazol a vorikonazol, metoda není standardizována pro vláknité mikromycety, (Mallátová, 2007).

Tab. 3: Interpretační kritéria standardu CLSI M44 [zóna inhibice v mm] (NCCLS, 2004)

	citlivý (S)	citl. závislá na dávce (SDD)	rezistentní (R)
flukonazol	≥19	15-18	≤14
vorikonazol	≥17	14-16	≤13

Gradientová difúzní metoda – E-test:

Jedná se o test nenáročný na provedení, poskytující reprodukovatelné výsledky se standardem M27-A2. Principem testu je, podobně jako u diskové metody, difúze testovaného antimykotika do agaru (Buchta, 2002). Testovaná látka se však neaplikuje ve formě disků, ale pomocí plastického proužku, který na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobní látky v suchém stavu. Na druhé straně proužku je vyznačen kód látky a kontinuální stupnice ředění. Po inkubaci se kolem proužku E-testu vytváří elipsa inhibovaného růstu (Mallátová, 2007). V místě, kde se zóna inhibice dotýká proužku, se na kalibrované stupnici odečítá hodnota MIC. Test je možné použít i pro vláknité houby. Pomocí E-testu nelze stanovit MFC (Buchta, 2002).



Obr. 17 Diskový difúzní test (web atlas.medmicro)



Obr. 18 E-test (web atlas.medmicro)

2.7.4 Ostatní metody:

Kromě běžně používaných dilučních a agarových difúzních metod byla vyvinuta anebo se nachází ve fázi vývoje řada dalších metod, jejichž cílem je překonání některých technických nedokonalostí. Dosud nejlépe propracovanými jsou **kolorimetrické metody**, jedná se o modifikované diluční bujónové metody, které umožňují jednoznačně stanovit hodnoty MIC pomocí pH indikátoru nebo na základě metabolické přeměny tetrazoliových solí. Jiným testem je např. využití **průtokové cytometrie**, kdy se měří změna membránového potenciálu kvasinky způsobeného antifungální látkou. V důsledku poškození dochází ke změnám metabolické aktivity a ke změnám schopnosti přijímat a vázat speciální DNA barviva, např. propidium jodid. Hodnota fluorescence je nepřímo úměrná míře poškození kvasinkové buňky. Další metodou je **stanovení sterolu v plazmatické membráně**, tento test vychází z měření citlivosti biosyntézy ergosterolu houby v přítomnosti testované antifungální látky (Buchta, 2002).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Pomůcky a přístroje

Sterilní mikrotitrační destičky s víčky, mikropipety, sterilní špičky, 12ti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky, Bürkerovy komůrky s krycími sklíčky.

Laminární box, termostat, lednice, mikroskop, vortex.

3.1.2 Chemikálie a média

Médium RPMI 1640 (5x koncentrované růstové médium), MOPS (3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina), glukóza, DMSO (dimethylsulfoxid), NaOH, sterilní voda, Sabouradův glukózový agar.

Sabouradův glukózový agar

Pro uchovávání a pasážování testovacích kmenů byl používán Sabouradův glukózový agar od firmy HIMEDIA (Indie), jehož dovozcem je Čaderský-Envitek, Brno.

Složení SGA:

- pepton 10,00 g/l
- maltosa 40,00 g/l
- agar 10,00g/l

Základní navážka 65g agaru na 1000 ml destilované vody se rozvařilo ve vodní lázni a autoklávovalo 15minut při teplotě 121°C.

Růstové médium RPMI 1640

Při experimentech bylo používáno růstové médium RPMI 1640, které dodává firma KlinLab – Praha. Vlastní složení média je uvedeno v tabulce (Tab. 4). Před vlastní přípravou růstového média se 34,5 g MOPS rozpustilo v 1000 ml destilované vody a sterilizovalo se autoklárováním 15 min při 121 °C a 0,1 MPa. Ke čtyřem dílům takto upravené MOPS s 1 % glukózy byl přidán jeden díl RPMI 1640. Na závěr bylo upraveno pH přidávkem několika kapek NaOH do rozmezí 6,5 – 7,9. Původně růžový roztok změnil barvu na oranžově-červenou.

Tab. 4 Složení růstového média RPMI 1640

SLOŽENÍ MÉDIA	g/l	SLOŽENÍ MÉDIA	g/l
Dusičnan vápnatý tetrahydrát	0,5	L- prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L- serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný monohdrát	5,015	L- treonin	0,1
Síran hořečnatý heptahdrát	0,5	L- tryptofan	0,025
Chlorid sodný	30,0	L- tyrosin	0,1
L- arginin hydrochlorid	1,21	L- valin	0,1
L- asparagin monohdrát	0,27	Biotin	0,001
L- cystin	0,25	Cyanocobalamin	0,0000 25
L- glutamin	1,5	Cholin chlorid	0,015
Glutathion	0,005	I- inositol	0,175
Glycin	0,05	Kyselina listová	0,005
L- histidin HCl.H ₂ O	0,102	Kyselina para- aminobenzová	0,005
L- hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L- isoleucin	0,25	D- Ca- Pantothenát	0,0012 5
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L- leucin	0,25	Thiamid hydrochlorid	0,005
L- lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L- methionin	0,075	Fenol	0,05
L- phenylalanine	0,075		

3.1.3 Testovací kmeny

Pro experimenty bylo použito 8 kmenů hub patogenních pro člověka. Testovací kmen kvasinky *Candida albicans* ATCC 44859 je referenčním kmenem z České sbírky mikroorganismů, původně pocházející ze sbírky Americké (ATCC – American Type Culture Collection), u ostatních testovacích kmenů kvasinek a vláknitých hub se jednalo o klinický materiál získaný od pacientů s prokázanou nebo suspektní houbovou infekcí.

Testovací kmeny byly uchovávány ve zkumavkách na šikmých SGA zalité sterilním parafinem v tzv. konzervách, pasážovány byly zhruba po půl roce na SGA. Před použitím byly vyočkovány na SGA a kultivovány při 35°C (kvasinky) resp. při 27°C (vláknité houby) po dobu 24 – 48 hod, inkubace *Trichophyton mentagrophytes* 445 probíhala až 5 dnů.

Tab. 5 Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub

KVASINKY	
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	CA
<i>Candida tropicalis</i> 156	CT
<i>Candida krusei</i> E28	CK
<i>Candida glabrata</i> 20/1	CG
<i>Trichosporon beigelii</i> 1188	TB
VLÁKNITÉ HOUBY	
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	AF
<i>Absidia corymbifera</i> 272	AC
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445	TM

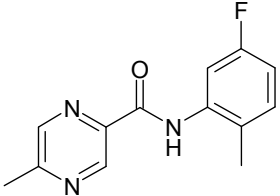
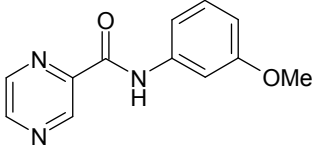
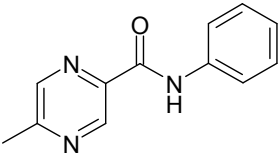
3.1.4 Testované látky

K pokusům byly použity sloučeniny syntetizované na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D., Doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.) a na Katedře anorganické a organické chemie (Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc., Mgr. Eva Petrlíková, Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc., Mgr. Aleš Imramovský) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

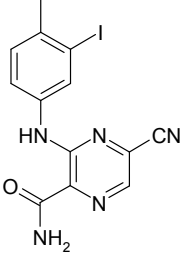
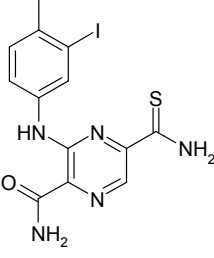
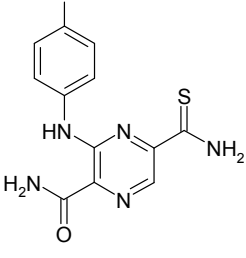
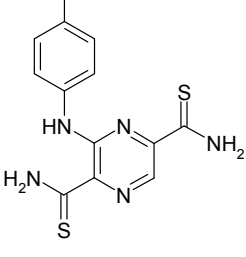
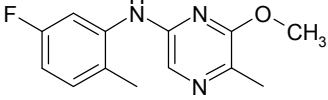
Tab. 2 Seznam skupin testovaných látek

Skupiny testovaných látek	zadavatel
Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny (Tab.6)	Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Arylamino-pyraziny (Tab. 7)	Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Estery pyrazinkarboxylové kyseliny (Tab. 8)	Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Pyrazin-2,3-dinitrily (Tab. 9)	Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Benzoxazepin-diony (Tab.10)	Mgr. Aleš Imramovský Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.
Diamidy (Tab. 11)	Mgr. Aleš Imramovský Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.
Styrylbenzoxazoly (Tab. 12)	Mgr. Aleš Imramovský Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.
Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on (Tab. 13)	Doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.
Deriváty esteru cholesterolu a alkanových kyselin (Tab. 14)	Mgr. Eva Petrlíková Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc.
Deriváty thiosalicylamidů (Tab. 15)	Mgr. Eva Petrlíková Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc.

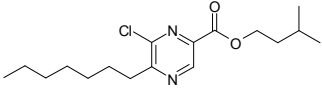
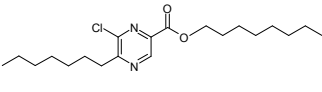
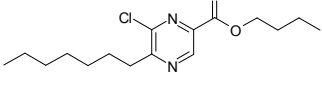
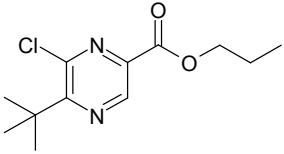
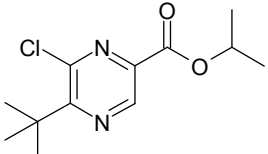
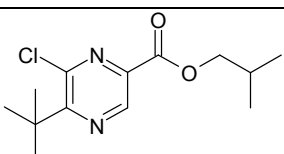
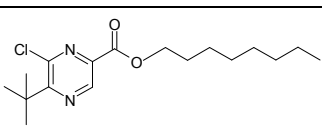
Tab. 6 Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny

ANILIDY PYRAZINKARBOXYLOVÉ KYSELINY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
MD 526/II		<i>N</i> -(5-fluor-2-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid	245,25	13,9
MD 535/II		<i>N</i> -(3-methoxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid	229,23	11,3
MD 554/II		5-methyl- <i>N</i> -fenylpyrazin-2-karboxamid	213,24	8,1

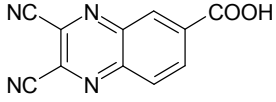
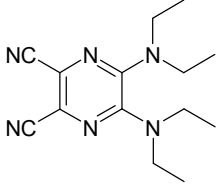
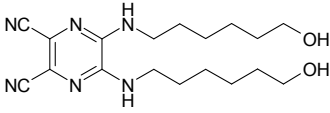
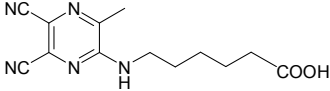
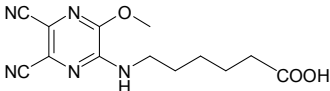
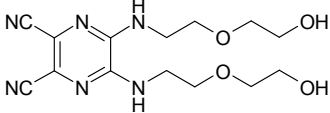
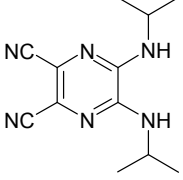
Tab. 7 Arylaminopyraziny

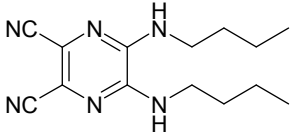
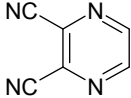
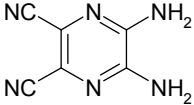
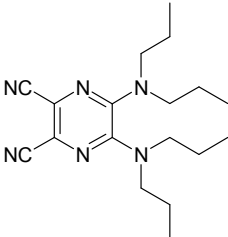
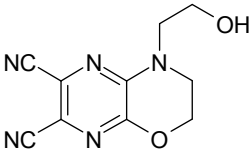
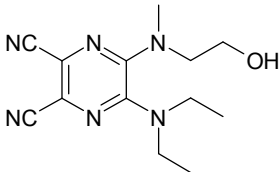
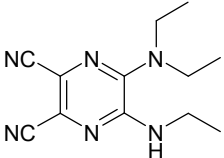
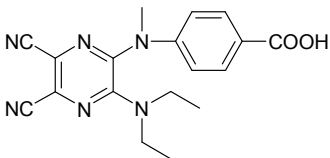
ARYLAMINOPYRAZINY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
MD 439/II		5-kyan-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid	379,16	13,9
MD 440/II		5-karbamothioyl-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid	413,24	14,5
MD 444/II		3-(4-bromfenylamino)-5-karbamothioylpyrazin-2-karboxamid	352,21	14,1
MD 445/II		3-(4-bromfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karbothioamid)	368,28	9,2
MD 577/II		<i>N</i> -(5-fluor-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin	247,27	8,4

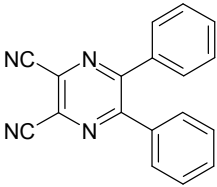
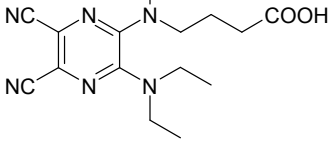
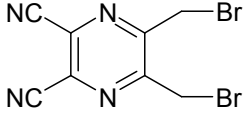
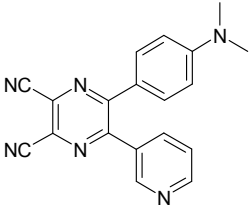
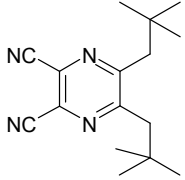
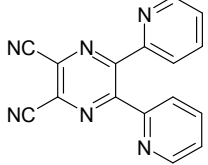
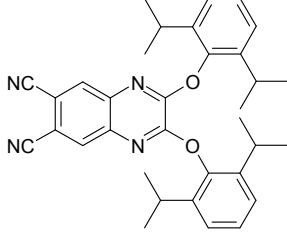
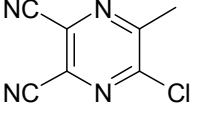
Tab. 8 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

ESTERY PYRAZINKARBOXYLOVÉ KYSELINY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
MD 563/II		isopentyl-6-chlor-5-heptylpyrazin-2-karboxylát	326,86	13,9
MD 564/II		oktyl-6-chlor-5-heptylpyrazin-2-karboxylát	368,94	16,5
MD 561/II		butyl-6-chlor-5-heptylpyrazin-2-karboxylát	312,83	15,5
MD 568/II		propyl-5- <i>terc</i> -butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylát	256,73	12,2
MD 570/II		isopropyl-5- <i>terc</i> -butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylát	256,73	11,1
MD 573/II		isobutyl-5- <i>terc</i> -butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylát	270,76	15,8
MD 572/II		oktyl-5- <i>terc</i> -butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylát	326,86	13,3

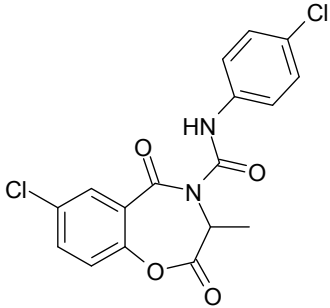
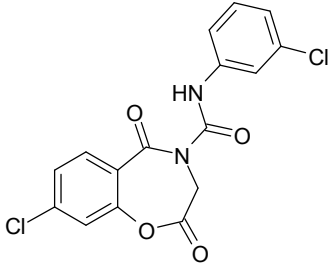
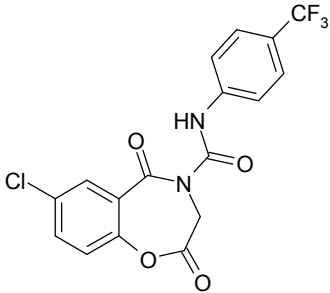
Tab. 9 Pyrazin-2,3-dinitrily

PYRAZIN-2,3-DINITRILY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
ZIP-1		2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina	224,18	9,4
ZIP-14		5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	272,36	11,6
ZIP-18		5,6-bis[(3-hydroxyhexyl)amino]pyrazin-2,3-dikarbonitril	360,46	14,6
ZIP-23		5-[(5,6-dikyan-3-methylpyrazin-2-yl)amino]hexanová kyselina	273,30	11,0
ZIP-24		5-[(5,6-dikyan-3-methoxypyrazin-2-yl)amino]hexanová kyselina	289,30	11,9
ZIP-28		5,6-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	336,35	13,2
ZIP-32		5,6-bis(isopropylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	244,30	10,3

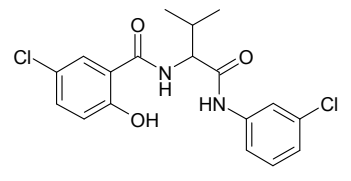
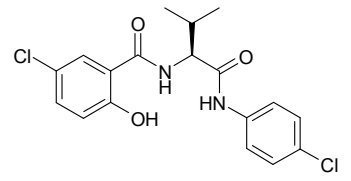
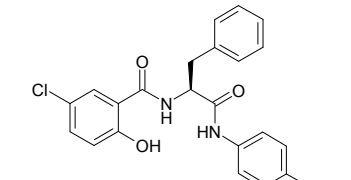
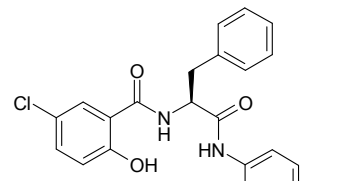
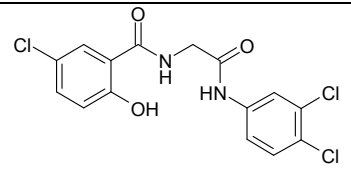
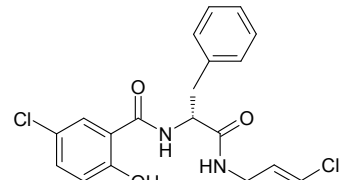
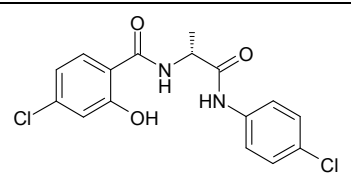
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
ZIP-34		5,6-bis(butylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	272,36	11,3
ZIP-38		pyrazin-2,3-dikarbonitril	130,11	5,3
ZIP-52		5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril	160,14	6,3
ZIP-58		5,6-bis(dipropylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	328,46	13,2
ZIP-60		4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril	231,22	10,5
ZIP-69		5-(diethylamino)-6-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	274,33	11,3
ZIP-72		5-(diethylamino)-6-(ethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	244,30	10,5
ZIP-78		4-((5,6-dikyan-3-(diethylamino)pyrazin-2-yl)(methyl)amino)benzoová kyselina	350,38	13,9

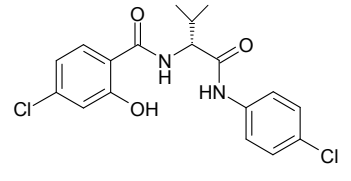
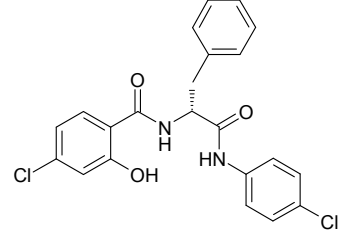
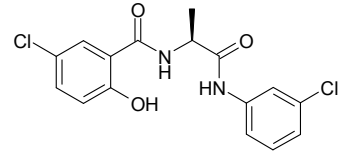
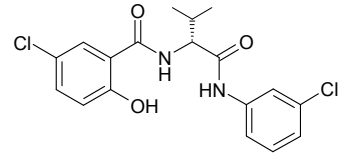
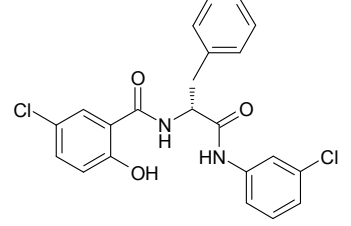
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
ZIP-82		5,6-difenyropyrazin-2,3-dikarbonitril	282,31	11,6
ZIP-90		4-((5,6-dikyan-3-(diethylamino)pyrazin-2-yl)(methyl)amino)butanová kyselina	316,37	13,4
ZIP-100		5,6-bis(bromomethyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril	315,96	12,8
ZIP-104		5-(4-(dimethylamino)fenyl)-6-(pyridin-3-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril	326,36	13,0
ZIP-108		5,6-di(neopentyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril	270,38	10,3
MUZ-5		5,6-di(pyridin-2-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril	284,28	11,8
MUZ-16		2,3-bis(2,6-diisopropylfenoxy)chinoxalin-6,7-dikarbonitril	539,69	21,1
VL1-Cl		5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	178,58	7,6

Tab. 10 Benzoxazepin-diony

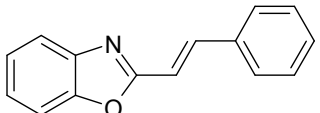
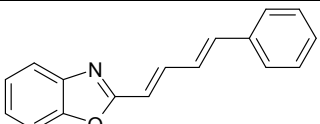
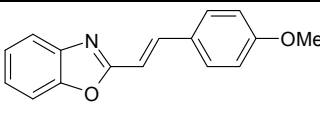
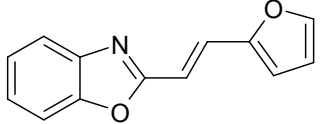
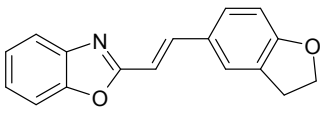
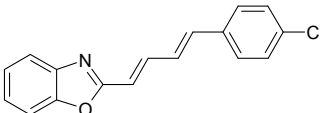
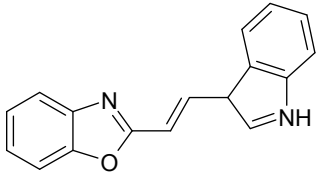
BENZOAZEPIN-DIONY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
AIM-5		7-chlor- <i>N</i> -(4-chlorofenyl)-3-methyl-2,5-dioxo-2,3-dihydrobenzo[<i>f</i>][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i>)-karboxamid	379,19	11,4
AIM-15		8-chlor- <i>N</i> -(3-chlorofenyl)-2,5-dioxo-2,3-dihydrobenzo[<i>f</i>][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i>)-karboxamid	365,17	14,4
AIM-22		7-chlor-2,5-dioxo- <i>N</i> -(4-(trifluormethyl)fenyl)-2,3-dihydrobenzo[<i>f</i>][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i>)-karboxamid	398,72	14,0

Tab. 11 Diamidy

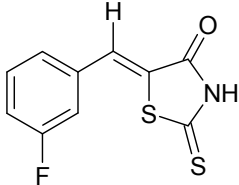
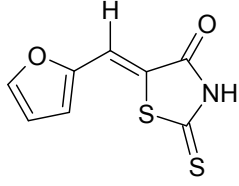
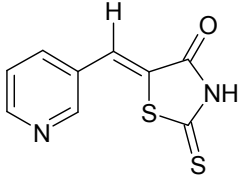
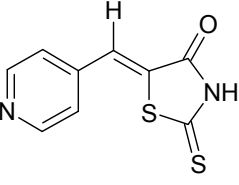
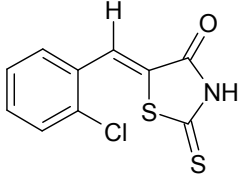
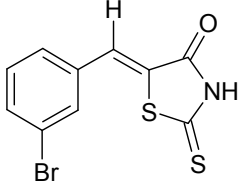
DIAMIDY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
AIM-110		(<i>S</i>)-5-Chlor- <i>N</i> -(1-(3-chlorofenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	381,25	16,0
AIM-61		(<i>S</i>)-5-Chlor- <i>N</i> -(1-(4-chlorofenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	381,2	15,8
AIM-62		(<i>S</i>)-5-Chlor- <i>N</i> -(1-(4-chlorofenylamino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	429,30	17,3
AIM-112		(<i>S</i>)- <i>N</i> -(1-(4-bromofenylamino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	473,75	17,5
AIM-118		5-Chlor- <i>N</i> -(2-(3,4-dichlorofenylamino)-2-oxoethyl)-2-hydroxybenzamid	373,62	10,9
AIM-115		(<i>R</i>)-5-Chlor- <i>N</i> -(1-(3,4-dichlorofenylamino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	463,74	14,8
AIM-114		(<i>R</i>)-4-Chlor- <i>N</i> -(1-(4-chlorofenylamino)-1-oxopropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	353,20	15,1

kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
AIM-102		(R)-4-Chlor-N-(1-(4-chlorofenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	381,25	13,2
AIM-129		(R)-4-Chlor-N-(1-(4-chlorofenylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	429,30	17,3
AIM-128		(S)-5-Chlor-N-(1-(3-chlorofenylamino)-1-oxopropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	353,20	14,2
AIM-97		(R)-5-Chlor-N-(1-(3-chlorofenylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	381,25	9,4
AIM-107		(R)-5-Chlor-N-(1-(3-chlorofenylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-2-hydroxybenzamid	429,30	10,9

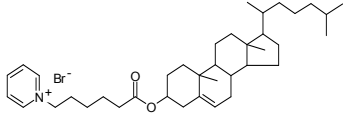
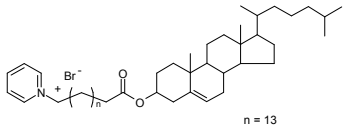
Tab. 12 Styrylbenzoxazoly

STYRYLBENZOAZOLY				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
AIM-150		2-styrylbenzo[d]oxazol	221,25	9,7
AIM-152		2-(4-phenylbuta-1,3-dienyl) benzo[d]oxazol	247,29	11,0
AIM-154		2-(4-methoxystyryl) benzo[d]oxazol	251,28	10,6
AIM-156		2-(2-(furan-2-yl)vinyl) benzo[d]oxazol	211,22	9,9
AIM-160		2-(2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)vinyl)benzo[d]oxazol	263,29	8,8
AIM-162		2-(4-(4-chlorophenyl)buta-1,3-dienyl)benzo[d]oxazol	281,74	8,5
AIM-164		2-(2-(1H-indol-3-yl)vinyl)benzo[d]oxazol	260,29	7,8

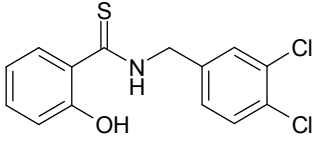
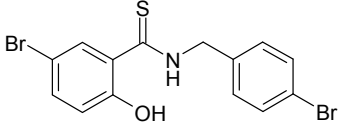
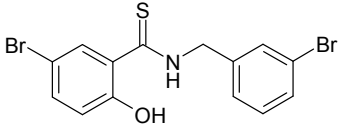
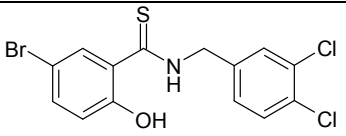
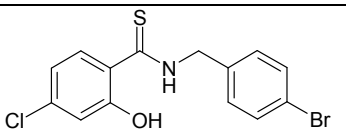
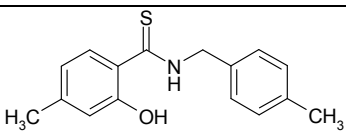
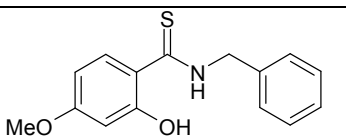
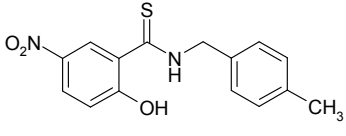
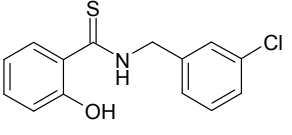
Tab. 13 Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on

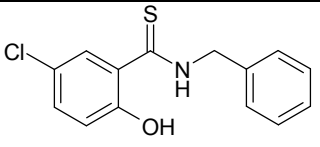
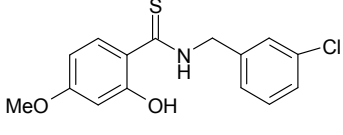
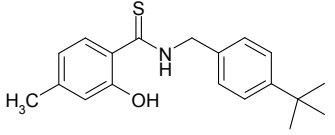
DERIVÁTY (Z)-5-ARYLMETHYLIDEN-2-THIOXOTHIAZOLIDIN-4-ON				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
RHO-bb		(Z)-5-(3-fluorbenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	239,29	9,8
RHO-l		(Z)-5-(furan-2-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	211,26	8,5
RHO-u		(Z)-5-(pyridin-3-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	222,29	8,7
RHO-v		(Z)-5-(pyridin-4-ylmethyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	222,29	9,1
RHO-w		(Z)-5-(2-chlorobenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	255,74	10,2
RHO-z		(Z)-5-(3-bromobenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	300,19	12,3

Tab. 14 Deriváty esteru cholesterolu a alkanových kyselin

DERIVÁTY ESTERU CHOLESTEROLU A ALKANOVÝCH KYSELIN				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
T6056		1-(6-(10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-yloxy)-6-oxohexyl)pyridinium bromid	641,38	10,0
T6170		1-(16-(10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-yloxy)-16-oxohexadecyl)pyridinium bromid	757.04	10,0

Tab. 15 Deriváty thiosalicylamidů

DERIVÁTY THIOSALICYLAMIDŮ				
kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
T5615		<i>N</i> -(3,4-dichlorobenzyl) salicylthioamid	312,22	10,0
T5618		5-brom- <i>N</i> -(4-brombenzyl) salicylthioamid	401,12	10,0
T5620		5-brom- <i>N</i> -(3-brombenzyl) salicylthioamid	401,12	10,0
T5622		5-brom- <i>N</i> -(3,4-dichlorobenzyl) salicylthioamid	391,12	10,0
T5625		<i>N</i> -(4-brombenzyl)-4-chlorosalicylthioamid	356,67	10,0
T5627		4-methyl- <i>N</i> -(4-methylbenzyl) salicylthioamid	271,38	10,0
T5629		<i>N</i> -benzyl-4-methoxy salicylthioamid	273,36	10,0
T5631		<i>N</i> -(4-methylbenzyl)-5-nitrosalicylthioamid	302,35	10,0
T5640		<i>N</i> -(3-chlorobenzyl) salicylthioamid	277,70	10,0

kód	vzorec	chemický název	m. h.	navážka [mg]
T6110		<i>N</i> -benzyl-5-chlorosalicylthioamid	277,7	10,0
T6113		<i>N</i> -(3-chlorobenzyl)-4-methoxysalicylthioamid	307,80	10,0
T6115		<i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)-4-methylsalicylthioamid	313,47	10,0

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava suspenzí testovacích kmenů hub

K přípravě suspenzí byly použity kultury testovacích kvasinek a vláknitých hub. Z kultury kvasinek narostlých na SGA se odebrala část kolonie a resuspendovala do sterilní vody v předem označené zkumavce. Po důkladném promíchání se správná hustota inokula kontrolovala v Bürkerově komůrce. Hustota inokula vhodná pro testování byla $1,0 - 2,5 \times 10^5$ cfu/ml, tj. 25 – 50 cfu/50 čtverců Bürkerovy komůrky.

Při přípravě inokula vláknitých hub se odebrala část konidií a resuspendovala stejným způsobem jako u kvasinek. Hustota suspenze odpovídala cca 100 buněk/50 čtverců Bürkerovy komůrky.

Takto připravené inokula hub bylo možné skladovat v lednici pro další experimenty po dobu cca 14 dní.

3.2.2 Příprava ředící řady testovaných látek

Látky použité při experimentech byly rozpuštěny v takovém objemu DMSO, aby první testovaná koncentrace byla 500 $\mu\text{mol/l}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %.

Výpočet objemu DMSO:

$$V_{\text{DMSO}} [\mu\text{l}] = m \cdot 10^6 / c \cdot M \cdot 100$$

m.....navážka (g)

c.....první testovaná koncentrace = 500 $\mu\text{mol/l}$ = 0,0005 mol/l

M....molární hmotnost

10^6 ...převod na μl

100..zakoncentrování

Testované koncentrace látek [$\mu\text{mol/l}$]:

500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3, 906; 1,953; 0,977; 0,488

Pokud se látka v příslušném objemu DMSO nerozpustila nebo vysrážela, byl přidán 2. příp. 3. ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním rozpouštědla se první testovaná koncentrace posunula o jedno ředění dozadu.

Rozpuštěná látka byla přidána do růstového média RPMI 1640 (1,98 ml RPMI + 20 µl rozpuštěné látky). Jestliže se látka v růstovém médiu vysrážela byl přidán 2. příp. 3. ekvivalent růstového média. Každým přidáním se první testovaná koncentrace posunula o jedno ředění dozadu. Tímto postupem byla získána první testovaná koncentrace látky, která byla následně sterilně přemístěno do první jamky 12ti jamkového rezervoáru.

Dvojkovým ředěním testované látky v DMSO byla získána podle rozpustnosti řada koncentrací do nejnižší koncentrace 0,488 µmol/l.

Do zbylých jamek rezervoáru bylo napipetováno 1,98 ml růstového média a následně postupně přidáno 20 µl naředěné testované látky. Do poslední jamky rezervoáru bylo přidáno 20 µl samotného DMSO (kontrola).

3.2.3 Plnění mikrotitrační destičky

Každá látka byla testována na jedné destičce proti sedmi testovacím kmenům hub. Pro kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 byla vyčleněna samostatná destička, kvůli jeho pomalému růstu a nebezpečí přerůstání a následné kontaminaci ostatních kmenů.

Pomocí 12ti kanálové pipety bylo do jednotlivých řádků destičky (řádek F byl ponechán volný) a do samostatné destičky pro TM napipetováno 200 µl rozředěné testované látky s růstovým médiem. Poslední sloupec testovanou látku neobsahoval a sloužil jako kontrola. Nakonec se do jamek naočkovalo po 10 µl připravené suspenze testovacích kmenů.

Následovala inkubace v termostatu při 35°C.

3.3 Hodnocení výsledků

Po uplynutí inkubační doby byly výsledky vyhodnocovány vizuálně. Doba inkubace pro první destičku s kmeny CA, CT, CK, CG, TB, AF a AC byla 48 hod (odečet po 24 hod a 48 hod), pro destičku s TM 120 hod (odečet po 72 hod a 120 hod).

Jako hodnotící kritérium MIC byla zvolena 80% a vyšší inhibice nárůstu testovacích kmenů proti kontrole v posledním sloupci destičky, tzn., že jako účinná byla ještě považována jamka s 20% nárůstem testovacího kmene v porovnání s kontrolou.

4 VÝSLEDKY

4.1 Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny

Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny neprokázaly antimykotický účinek (Tab. 16), pouze kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 vykazoval slabou citlivost na látku MD535/II po 72 hod ($MIC_{MD535/II} = 500 \mu\text{mol/l}$).

4.2 Arylaminopyraziny

Ze skupiny arylaminopyrazinů byla zjištěna antifungální účinnost na kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 pouze u látky MD440/II ($MIC_{MD440/II} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 72 i 120 hod). U ostatních derivátů nebyla účinnost prokázána, kvůli vysrážení v růstovém médiu musela být testovaná koncentrace snížena (Tab. 17).

4.3 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

U této skupiny látek nebyla zjištěna antifungální účinnost (Tab. 18). Ze sedmi testovaných látek byla zjištěna pouze slabá účinnost u látky MD570/II na kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{MD570/II} = 500 \mu\text{mol/l}$ po 72 i 120 hod).

4.4 Pyrazin-2,3-dinitrily

Skupina zahrnovala 23 látek (Tab. 19, 20), proti všem testovacím kmenům byla prokázána dobrá účinnost pouze u jedné látky. Jednalo se o látku VL1-C1, nejcitlivějšími kmeny byly *Candida krusei* E28 a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (po prvním odečtu odpovídalo $MIC_{VL1-C1} = 3,9 \mu\text{mol/l}$, po druhém $MIC_{VL1-C1} = 7,81 \mu\text{mol/l}$), dobrá účinnost byla také u ostatních kmenů např. *Candida albicans* ATCC 44859, *Aspergillus fumigatus* 231 ($MIC_{VL1-C1} = 7,81 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{VL1-C1} = 15,62 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod).

Druhou nejúčinnější byla látka ZIP-38, na tuto látku byly v obou odečtech citlivé kmeny *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida krusei* E28, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445, pouze po prvním odečtu vykazovaly citlivost kmeny *Trichosporon beigelii* 1188 a *Aspergillus fumigatus* 231.

Na kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 působily látky ZIP-1, ZIP-18, ZIP-34, ZIP-100, ZIP-104.

4.5 Benzoxazepin–diony

U látek AIM-15 a AIM-22 nebyla zjištěna antitmykotická účinnost (Tab. 21). U sloučeniny AIM-5 působil nejcitlivěji kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{AIM-5} = 15,62 \mu\text{mol/l}$ v obou časech), dalšími citlivými kmeny byly *Candida krusei* E28 ($MIC_{AIM-5} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{AIM-5} = 125 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod), *Absidia corymbifera* 272 ($MIC_{AIM-5} = 125 \mu\text{mol/l}$ v obou časech). U všech látek musel být snížena max. testovaná koncentrace kvůli srážení s RPMI.

4.6 Diamidy

Ze skupiny látek diamidů nebyla ani jedna látka, která by působila proti všem kmenům (Tab. 22). U většiny látek musela být kvůli srážení s RPMI max. testovaná koncentrace snížena. Látka AIM-97 byla účinná na polovinu kmenů, zejména na *Candida krusei* E28 ($MIC_{AIM-97} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{AIM-97} = 7,81 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod) a *Candida tropicalis* 156 ($MIC_{AIM-97} = 15,62 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{AIM-97} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod).

U látky AIM-128 byla zjištěna vysoká citlivost kmene *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{AIM-128} = 0,49 \mu\text{mol/l}$ po 72 i 120 hod), na tuto látku byl slabě citlivý také kmen *Candida krusei* E28 ($MIC_{AIM-128} = 125 \mu\text{mol/l}$ po 24 i 48 hod).

Vysoká citlivost kmene *Candida krusei* E28 byla zjištěna na látku AIM-107 ($MIC_{AIM-107} = 1,95 \mu\text{mol/l}$ po 24, $MIC_{AIM-107} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod). Látka AIM-110 působila na kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{AIM-110} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 24, $MIC_{AIM-110} = 125 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod). Slabá citlivost kmene *Candida tropicalis* 156 byla proti látce AIM-114 ($MIC_{AIM-114} = 250 \mu\text{mol/l}$ v obou časech).

4.7 Styrylbenzoxazoly

Skupina látek neprokázala antitmykotické účinky (Tab. 23), ze sedmi testovaných látek byla zjištěna pouze slabá citlivost kmenů *Candida albicans* ATCC 44859 a *Candida krusei* E28 na látku AIM-164 ($MIC_{AIM-164} = 500 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod).

4.8 Deriváty (Z)-5arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on

Antifungální účinnost proti všem testovacím kmenům byla zjištěna u látek RHO-bb, RHO-w (Tab. 24), nejcitlivějšími kmeny byly *Absidia corymbifera* 272 ($MIC_{RHO-bb} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ v obou časech, $MIC_{RHO-w} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{RHO-w} = 125 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{RHO-bb,RHO-w} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ v obou časech).

Látka RHO-l působila na pět kmenů, nejcitlivějšími byly kmeny *Trichophyton mentagrophytes* 445 ($MIC_{RHO-l} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 72 hod, $MIC_{RHO-l} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ po 120 hod) a *Absidia corymbifera* 272 ($MIC_{RHO-l} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{RHO-l} = 125 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod). Kmen *Trichophyton mentagrophytes* 445 byl také citlivý na látku RHO-z ($MIC_{RHO-z} = 15,62 \mu\text{mol/l}$ po 72 hod, $MIC_{RHO-z} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 120 hod). U látek RHO-u a RHO-v nebyla zjištěna žádná antimykotická účinnost.

4.9 Deriváty esteru cholesterolu a alkanových kyselin

V této skupině byly testovány dvě látky (Tab. 25), látka T6056 byla účinná proti všem kmenům. Největší citlivost byla zaznamenána u kmene *Trichosporon beigelii* 1188 ($MIC_{T6056} = 7,81 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{T6056} = 31,25 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod). Druhá látka T6170 nepůsobila na *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272, nejvyšší citlivost byla u kmene *Candida albicans* ATCC 44859 ($MIC_{T6170} = 62,5 \mu\text{mol/l}$ v obou časech).

4.10 Deriváty thiosalicylamidů

Deriváty thiosalicylamidů byly velmi účinnou skupinou látek (Tab. 26), z dvanácti testovaných látek nebyla zjištěna antimykotická účinnost pouze u látky T6115. U kmene *Trichophyton mentagrophytes* 445 byla zjištěna dobrá citlivost na látky T5620 ($MIC_{T5620} = 1,95 \mu\text{mol/l}$ v obou časech), T5622 ($MIC_{T5622} = 0,98 \mu\text{mol/l}$ v obou časech), T5625 ($MIC_{T5625} = 0,98 \mu\text{mol/l}$ po 72 hod, $MIC_{T5625} = 1,95 \mu\text{mol/l}$ po 120 hod) a T6110 ($MIC_{T6110} = 1,95 \mu\text{mol/l}$ po 72 hod, $MIC_{T6110} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 120 hod). Dobrá citlivost byla také u dalších kmenů *Absidia corymbifera* 272 na látky T5625 ($MIC_{T5625} = 0,98 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{T5625} = 1,95 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod), T5618, T5620, T5622 ($MIC_{T5618,T5620,5622} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 24 i 48 hod), *Trichosporon beigelii* 1188 na látky T5618, T5622 ($MIC_{T5618,T5622} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $MIC_{T5618,T5622} =$

7,81 $\mu\text{mol/l}$ po 48 hod) a *Candida krusei* E28 ($\text{MIC}_{\text{T5620}} = 3,9 \mu\text{mol/l}$ po 24 hod, $\text{MIC}_{\text{T5620}} = 7,81 \mu\text{mol/l}$ po 48 hod).

4.11 Tabulkový přehled výsledků

Hodnoty MIC v rámci testovacího rozmezí jsou v tabulkách znázorněny modře.

Tab. 16 Výsledky MIC: Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ [μmol/l]		
		MD526/II	MD535/II	MD554/II
		CA	24h	>250
	48h	>250	>500	>250
CT	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
CK	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
CG	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
TB	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
AF	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
AC	24h	>250	>500	>250
	48h	>250	>500	>250
TM	72h	>250	500	>250
	120h	>250	>500	>250

Tab. 17 Výsledky MIC: Arylamino-pyraziny

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]				
		MD439/II	MD440/II	MD444/II	MD445/II	MD577/II
CA	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
CT	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
CK	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
CG	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
TB	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
AF	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
AC	24h	>125	>125	>125	>125	>250
	48h	>125	>125	>125	>125	>250
TM	72h	>125	31,25	>125	>125	>250
	120h	>125	31,25	>125	>125	>250

Tab. 18 Výsledky MIC: Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]						
		MD563/II	MD564/II	MD561/II	MD568/II	MD570/II	MD573/II	MD572/II
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TB	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500

Tab. 19 Výsledky MIC: Pyrazin-2,3-dinitrily

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]													
		ZIP-1	ZIP-14	ZIP-18	ZIP-23	ZIP-24	ZIP-28	ZIP-32	ZIP-34	ZIP-38	ZIP-52	ZIP-58	ZIP-60	ZIP-69	ZIP-72
CA	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>250
CT	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
CK	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>250
CG	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
TB	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
AF	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>250
AC	24h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>250	>500	>500	>250
	48h	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>250
TM	72h	500	>250	250	>500	>500	>500	>500	125	250	>500	>250	>500	>500	>250
	120h	500	>250	250	>500	>500	>500	>500	500	500	>500	>250	>500	>500	>250

Tab. 20 Výsledky MIC: Pyrazin-2,3-dinitrily

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]								
		ZIP-78	ZIP-82	ZIP-90	ZIP-100	ZIP-104	ZIP-108	MUZ-5	MUZ-16	VL1-C1
CA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	7,81
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	15,62
CT	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	31,25
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	62,5
CK	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	3,9
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	7,81
CG	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	15,62
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	31,25
TB	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	31,25
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	62,5
AF	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	7,81
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	15,62
AC	24h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	31,25
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	>500	>500	>125	125
TM	72h	>500	>125	>500	125	62,5	>500	>500	>125	3,9
	120h	>500	>125	>500	250	>125	>500	>500	>125	7,81

Tab. 21 Výsledky MIC: Benzoxazepin–diony

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ [μmol/l]		
		AIM-5	AIM-15	AIM-22
CA	24h	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125
CT	24h	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125
CK	24h	62,5	>125	>125
	48h	125	>125	>125
CG	24h	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125
TB	24h	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125
AF	24h	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125
AC	24h	125	>125	>125
	48h	125	>125	>125
TM	72h	15,62	>125	>125
	120h	15,62	>125	>125

Tab. 22 Výsledky MIC: Diamidy

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]											
		AIM-110	AIM-61	AIM-62	AIM-112	AIM-118	AIM-115	AIM-114	AIM-102	AIM-129	AIM-128	AIM-97	AIM-107
CA	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
CT	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	250	>125	>125	>125	15,62	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	250	>125	>125	>125	62,5	>125
CK	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	125	3,9	1,95
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	125	7,81	3,9
CG	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	125	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	125	>125
TB	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
AF	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
AC	24h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
	48h	>125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>125	>125
TM	72h	31,25	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	0,49	125	>125
	120h	125	>125	>125	>500	>125	>125	>250	>125	>125	0,49	125	>125

Tab. 23 Výsledky MIC: Styrylbenzoxazoly

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]						
		AIM-150	AIM-152	AIM-154	AIM-156	AIM-160	AIM-162	AIM-164
CA	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
CT	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
CK	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
CG	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
TB	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
AF	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
AC	24h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
TM	72h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500
	120h	>500	>500	>250	>500	>250	>125	>500

Tab. 24 Výsledky MIC: Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on **Tab. 25** Výsledky MIC: Deriváty esteru cholesterolu a alkanových kys.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]					
		RHO-bb	RHO-l	RHO-u	RHO-v	RHO-w	RHO-z
CA	24h	125	500	>125	>125	125	>250
	48h	250	500	>125	>125	125	>250
CT	24h	250	>500	>125	>125	250	>250
	48h	250	>500	>125	>125	250	>250
CK	24h	250	>500	>125	>125	250	>250
	48h	250	>500	>125	>125	500	>250
CG	24h	250	>500	>125	>125	250	>250
	48h	250	>500	>125	>125	250	>250
TB	24h	250	500	>125	>125	125	>250
	48h	250	500	>125	>125	250	>250
AF	24h	125	250	>125	>125	125	>250
	48h	125	250	>125	>125	250	>250
AC	24h	62,5	62,5	>125	>125	31,25	125
	48h	62,5	125	>125	>125	125	>250
TM	72h	31,25	31,25	>125	>125	31,25	15,62
	120h	31,25	62,5	>125	>125	31,25	31,25

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]	
		T6056	T6170
CA	24h	15,62	62,5
	48h	62,5	62,5
CT	24h	31,25	125
	48h	62,5	125
CK	24h	15,62	62,5
	48h	62,5	125
CG	24h	15,62	125
	48h	31,25	125
TB	24h	7,81	125
	48h	31,25	125
AF	24h	62,5	>125
	48h	125	>125
AC	24h	125	>125
	48h	>125	>125
TM	72h	7,81	125
	120h	62,5	125

Tab. 26 Výsledky MIC: Deriváty thiosalicylamidů

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ [μmol/l]											
		T5615	T5618	T5620	T5622	T5625	T5627	T5629	T5631	T5640	T6110	T6113	T6115
CA	24h	15,62	15,62	15,62	15,62	15,62	125	62,5	500	125	62,5	125	>500
	48h	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	250	250	>500	125	125	250	>500
CT	24h	31,25	31,25	15,62	31,25	31,25	125	250	>500	125	62,5	125	>500
	48h	31,25	31,25	62,5	31,25	31,25	500	250	>500	125	125	250	>500
CK	24h	15,62	3,9	3,9	7,81	3,9	62,5	250	>500	62,5	15,62	125	>500
	48h	31,25	15,62	7,81	15,62	15,62	125	250	>500	125	31,25	125	>500
CG	24h	31,25	31,25	7,81	31,25	31,25	125	500	>500	125	15,62	250	>500
	48h	31,25	125	31,25	62,5	31,25	500	500	>500	250	62,5	500	>500
TB	24h	15,62	3,9	15,62	3,9	7,81	31,25	250	500	31,25	31,25	31,25	>500
	48h	15,62	7,81	31,25	7,81	7,81	62,5	250	500	31,25	31,25	62,5	>500
AF	24h	15,62	15,62	7,81	7,81	7,81	125	250	500	62,5	31,25	62,5	>500
	48h	31,25	15,62	15,62	7,81	7,81	500	500	500	62,5	31,25	125	>500
AC	24h	7,81	3,9	3,9	3,9	0,98	7,81	62,5	500	31,25	15,62	7,81	>500
	48h	15,62	3,9	3,9	3,9	1,95	31,25	250	500	31,25	15,62	7,81	>500
TM	72h	7,81	15,62	1,95	0,98	0,98	15,62	62,5	62,5	7,81	1,95	15,62	>500
	120h	31,25	31,25	1,95	0,98	1,95	15,62	62,5	62,5	15,62	3,9	15,62	>500

5 DISKUZE

V posledních desetiletích je jedním z dominantních problémů zvyšující se počet mykotických infekcí a vzrůstající rezistence mikroorganismů k účinkům antimykotik, a to zejména u imunoalterovaných pacientů. Příčinou tohoto vzrůstu je paradoxně zvyšující se úroveň a pokroky v medicíně, tj. zavádění moderních chemoterapeutik pro nádorová onemocnění, katetrizace pacientů, rozvoj transplantačních programů, dále rozsáhlé používání širokospektrých antibiotik. Dalším přítěžujícím faktorem je zvyšující se počet imunoalterovaných pacientů začátkem 80. let s pandemií AIDS, zvláště u těchto pacientů způsobují houbové infekce komplikovaná a systémová onemocnění, často končící fatálně (Doležel a Buchta, 2006). Z tohoto důvodu je intenzivně zaměřen výzkum na vývoj nových a účinnějších antifungálních látek. Důležitou součástí výzkumu je testování účinnosti v podmínkách *in vitro*.

Do začátku 90. let neexistovala žádná standardizovaná metodika pro testování antifungální citlivosti. Do té doby používané metody prakticky výhradně vycházely z bakteriologie, nerespektovaly odlišnosti hub, nebyla stanovena jednotná pravidla a výsledky byly jen velmi těžko porovnatelné (Rex, et al., 1993; Galgiani, 1993).

Závažnost zhoršující se situace vedly v roce 1983 skupinu amerických vědců při subkomisi NCCLS (nyní CLSI) k zahájení práce na vypracování standardu pro testování patogenních hub (Galgiani, 1993). V roce 1997 schválila CLSI dokument M27-A, který standardizuje způsob provádění testů citlivosti kvasinek k ATM (nyní je v platnosti verze M27-A2 z roku 2002) a později dokument M38-A pro vláknité mikromycety. Jedná se o metodu kvantitativní, která poskytuje možnost stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) a umožňuje dle hodnoty MIC zařadit testovaný izolát do kategorie citlivý (S), citlivý v závislosti na dávce (SDD–Susceptible-Dose Dependent), rezistentní (R) (Maláttová, 2007).

Vedle tohoto standardu bylo vypracováno několik testů s nimi kompatibilních, které jsou vhodné pro rutinní testování patogenních hub v mikrobiologických laboratořích. V případě kvantitativního stanovení citlivosti na antimykotika se zejména jedná o gradientovou difúzní metodu E-test a mikrodiluční bujónou metodu, která představuje zmenšený formát standardu M27-A2 pro testování kvasinek (Buchta, 2002).

Standard CLSI M27-A2 z roku 2002 popisuje metodiku při testování citlivosti kvasinek *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*. Jedná se o mikrodiluční metodu s

použitím media RPMI –1640 s glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené 0,2 % glukózy, hustota inokula $0,5 - 2,5 \times 10^5$ cfu/ml, inkubace při 35°C 24 hodin pro *Candida* spp. a 48-72 hodin pro *Cryptococcus neoformans*. Hodnotí se stupeň zánalu dle daných kritérií (Maláttová, 2007).

Standard CLSI M38-A určuje postup pro stanovení citlivosti vláknitých mikromycet včetně *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pseudoallescheria (Scedosporium)* spp., i zygomycet. Je použito obdobné medium jako pro testování kvasinek, důraz je kladen na přípravu inokula s kontrolou density pomocí spektrofotometru. Doba inkubace se liší v závislosti na druhu (např. *Rhizopus* 24 hodin, *Aspergillus* a *Fusarium* 48 hodin) (Maláttová, 2007).

Úkolem této diplomové práce bylo vyhodnotit aktivitu potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody. K pokusům byly použity nově syntetizované sloučeniny na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv a na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Testování jsme prováděli na pěti kmenech kvasinek a třech kmenech vláknitých hub patogenních pro člověka. Kvasinky zastupovaly kmeny *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/1, *Trichosporon beigeli* 1188 a z vláknitých hub se jednalo o kmeny *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Celkem jsme vyhodnotily 10 skupin potenciálně antifungálních látek (80 látek). Jako nejvíce účinná se jeví skupina derivátů thiosalicylamidů, z dvanácti testovaných derivátů nebyla zjištěna antimykotická účinnost pouze u látky T6115, částečná účinnost pak u látky T5631. Všechny ostatní látky vykazovaly dobrou antimykotickou účinnost proti všem testovacím kmenům. Rozpustnost všech látek v DMSO i RPMI byla bez problémů s dosažením max. možných koncentrací tj. 500 $\mu\text{mol/l}$.

U většiny látek byly jako substituenty použity atomy chloru a brómu v různých polohách. U látky T5627 byla dosazena na pozici 4 methylová skupina a stejně tak i na amidovém jádře, v porovnání účinností došlo oproti ostatním derivátům s atomy chloru či brómu k mírnému poklesu, kromě kmenů TB, AC a TM u kterých byla účinnost zachována. U látky T5631 byla nahrazena methylová skupina na pozici 4 za nitroskupinu do pozice 5 za zachování methylu na amidovém jádře, s touto záměnou došlo k významnému poklesu účinností. Na kmeny CT, CK a CG látka neúčinkovala vůbec, na kmen CA pouze slabě při prvním měření. Stejně tak došlo i u látky T5629 k částečnému poklesu účinnosti, tento derivát měl na pozici 4 methoxyskupinu. Při

zachování methoxyskupiny na pozici 4 a substituci chloru do pozice 3 na amidovém jádře u látky T6113 se v porovnání s látkou T5629 účinnost zvýšila u všech kmenů, kromě CA u které došlo k nepatrnému pohoršení.

Proti všem testovacím kmenům byla neúčinná látka T6115, která obsahovala na pozici 4 methylovou skupinu a na amidovém jádře v poloze 4 *terc*-butyl. Naopak nejlepších citlivostí u všech kmenů bylo dosaženo u látek T5615, T5618, T5620, T5622, T5625, T5640 a T6110, u těchto látek byly jako substituenty atomy chloru a brómu na různých pozicích. Z toho vyplývá, že substituce chlorem a brómem se u těchto látek jeví pro antifungální účinek jako velmi výhodná. Podobnou skupinou látek jsou thiosalicylanilidy, které byly testovány již v dřívějších pracích (Bajerová, 2001) a stejně jako u thiosalicylamidů u nich byla zjištěna významná antifungální účinnost.

Skupina derivátů esteru cholesterolu a alkanových kyselin substituovaných dusíkatými bázemi obsahovala pouze dvě látky T6056 a T6170, dusíkatou bází u obou látek byl pyridin. Kvůli špatné rozpustnosti v DMSO byla max. testovaná koncentrace látek 125 $\mu\text{mol/l}$. Látka T6056 s 6-oxohexylovým řetězcem byla podstatně účinnější než při použití delšího 16-oxohexadecylového řetězce u látky T6170. U látky T6056 bylo dosaženo vysokých citlivostí u všech testovaných kmenů, pouze u kmene AC byl účinek slabší. U látky T6170 nebyla citlivost prokázána u kmenů AF a AC, příčinou mohla být špatná rozpustnost v DMSO a tím snížená výchozí. testovaná koncentrace.

Další skupinou látek jsou deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on. V této skupině bylo testováno šest látek, u tří bylo na pozici 5 dosazeno benzenové jádro s různými substituenty, u dvou byl použit pyridin a jednou furan. Substitucí atomu fluoru na benzenové jádro na pozici 3 vznikla látka RHO-bb, při rozpouštění v RPMI se sloučenina srážela, proto její max. testovaná koncentrace byla 250 $\mu\text{mol/l}$. Antimykotický účinek se projevil u všech testovacích kmenů, nejvyšší citlivosti bylo dosaženo u kmenů AC a TM. Záměnou substituentu atomu fluoru za bróm ve stejné poloze vznikla sloučenina RHO-z, srážlivost s RPMI se touto záměnou nezlepšila a max. testovaná koncentrace zůstala na 250 $\mu\text{mol/l}$. U kmene TM došlo ke zlepšení citlivosti po prvním měření, u kmene AC byla citlivost slabá pouze v prvním odečtu a u ostatních kmenů nebyl zjištěn antifungální efekt žádný. Látka RHO-w měla na benzenovém jádře na pozici 2 substituovaný atom chlóru, její rozpustnost v DMSO i RPMI byla dobrá, antimykotický účinek byl u všech kmenů, nejvíce citlivé byly kmene AC a TM.

Substitucí pyridinu na pozici 5 vznikly látky RHO-u a RHO-v, obě látky byly velmi špatně rozpustné v DMSO, max. testovaná koncentrace byla 125 $\mu\text{mol/l}$. Obě

látky neprojevily antimykotický účinek, příčinou mohla být nízká testovaná koncentrace. U poslední látky byl na pozici pět substituován furan, největší citlivost byla u kmenů AC a TM. Podobná skupina látek byla testovaná již v dřívějších pracích, kdy základ sloučenin tvořil 5-benziliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on-3-octová kyselina. Silný inhibiční účinek se projevil záměnou benzilidenu za (pyrid-2-yl)methyliden u kmenů CT, CK, CG a TB (Nitraiiová, 2009).

Ve skupině derivátů odvozených od styrylbenzoxazolu bylo testováno celkem 7 látek. Substitucí 2-(1H-indol-3-yl)vinyly do polohy 2 benzoxazolu, vznikla látka AIM-164, u které byla zjištěna slabá citlivost kmenů CA a CK pouze po prvním odečtu. U žádné z ostatních nebyl prokázán antimykotický účinek. U látky s 4-(4-chlorophenyl)buta-1,3-dienylem na benzoxazolu byl problém s rozpouštěním v DMSO a následně v RPMI docházelo k opakovanému vysrážení, proto byla testovaná max. koncentrace pouze 125 $\mu\text{mol/l}$, při této koncentraci nebyl zaznamenán žádný antifungální efekt.

Další testovanou skupinou byly deriváty diamidu. U této dvanáctičlenné skupiny byly problémy s opakovaným vysrážením v RPMI, u většiny látek proto max. testovaná koncentrace dosahovala pouze hodnoty 125 $\mu\text{mol/l}$. Základ tvořil Hydroxy-*N*-(fenylamino)-oxo-alkyl benzamid, na hydroxybenzamidovém jádře byl u všech látek substituován atom chlóru v poloze 4 nebo 5, na fenyl byl rovněž navázán atom chlóru a to do pozice 3 nebo 4 (u látky AIM-112 byl použit bróm v poloze 4), za alkyl byly dosazeny řetězce 3-methyl-1-oxobutan-2-yl, 1-oxo-3-fenylpropan-2-yl a 1-oxopropan-2-yl. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při substitucích chlóru do poloh 5 a 3.

Největší citlivosti bylo dosaženo u kmene TM na látku AIM-128, u které byl použit 1-oxopropan-2-yl a atomy chlóru byl substituovány na pozici 5 na hydroxybenzamidovém jádře a 3 na fenylu. Zachování poloh chlóru a záměnou propanu za butan u látky AIM-110 se citlivost TM snížila. Dalším citlivým kmenem byla CK na látky AIM-107, AIM-97 a AIM-128, ve všech případech byl atom chlóru na pozici 5 na hydroxybenzamidovém jádře a 3 na fenylu, citlivost u jednotlivých alkylů klesala: 1-oxo-3-fenylpropan-2-yl (AIM-107) > 3-methyl-1-oxobutan-2-yl (AIM-97) > 1-oxopropan-2-yl (AIM-128). U látky AIM-97 byla také dobrá citlivost kmene CT, slabě pak působila na kmene CG a TM. Ostatní látky se jevily jako neúčinné.

Ze tří látek skupiny benzoxazepin-dionů byla účinná pouze sloučenina AIM-5 na kmene CK, AC a TM. U všech látek byla max. testovaná koncentrace 125 $\mu\text{mol/l}$ kvůli srážení s RPMI.

Zbývající čtyři skupiny látek lze zahrnout mezi deriváty pyrazinu, tyto látky jsou syntetizovány a testovány na Farmaceutické fakultě již několik let. V této diplomové práci byla zjišťována účinnost anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny, arylaminopyrazinů, pyrazin-2,3-dinitrilů a esterů pyrazinkarboxylové kyseliny.

Prakticky neúčinné byly při testování anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny, u derivátů MD526/II a MD554/II byla výchozí koncentrace snížena kvůli špatné rozpustnosti v DMSO a RPMI. Již v dřívějších pracích byly anilidy testovány, v některých případech se podařilo účinnost prokázat u části testovaných kmenů, jen výjimečně u všech (Vyštejnová, 1999; Bajarová, 2001; Nitraiová, 2009).

Další skupinou, u které nebyl zjištěn prakticky žádný účinek byly estery pyrazinkarboxylové kyseliny. Pouze u látky isopropyl-5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylátu (MD570/II) byl slabě citlivý kmen TM.

Nejpočetnější testovanou skupinou látek byly pyrazin-2,3-dinitrily. Celkem bylo testováno 23 látek, u 16 nebyla zjištěna žádná účinnost. U pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP-38) byla zjištěna slabší citlivost kmenů CA, CK, AC a TM v obou měřených časech a u kmenů TB a AF pouze po prvním měření. Substitucí atomu chlóru a methylové skupiny vznikla nejúčinnější látka z celé skupiny, 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril (VL1-C1), u které byla prokázána dobrá účinnost proti všem testovaným kmenům, nejvyšší citlivosti bylo dosaženo u kmenů CK a TM. U ostatním derivátu (tj. ZIP-1, ZIP-18, ZIP-34, ZIP-100, ZIP-104) byl citlivý pouze kmen TM.

Posledními testovanými deriváty byly arylaminopyraziny, u všech látek byl problém s opakovaným srážením v RPMI, proto musela být jejich max. testovaná koncentrace snížena. Citlivost byla zjištěna pouze u kmene TM na 5-karbamothioyl-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid (MD 440/II). Podobné látky byly testovány již dříve, stejně jako v našem případě nastal problém s vysrážením v růstovém médiu a nebyla zjištěna významná antimykotická účinnost (Nitraiová, 2009).

Testování potenciálně antifungálních látek probíhá na naší fakultě již řadu let. Z dosavadních zkušeností je dobře známo, že výsledky testování *in vitro* jsou ovlivňovány mnoha faktory. V této diplomové práci byla pro testování použita standardní mikrodiluční bujónová metoda, která vychází z mezinárodního standardu M-27A2 z roku 2002.

Jedním z faktorů ovlivňujících výsledek je velikost inokula, v našem případě byla velikost 1,0 – 2,5 x 10⁵ cfu/ml. Jako růstové médium bylo použito RPMI s glutaminem obohaceno o 1 % glukózy, pomocí NaOH bylo pH upraveno do rozmezí 6,5 – 7,9.

Velmi důležitým faktorem je také teplota a délka inkubace. Všechny kmeny byly inkubovány při 35°C a odečítány po 24 a 48 hod. Abychom předešli falešně pozitivním výsledkům u kmene TM, byly hodnoty MIC odečítány po 72 a 120 hod, protože jeho růstové optimum je při pokojové teplotě a zvýšením teploty na 35°C by mohlo dojít ke snižování hodnot MIC.

Jako hodnotící kritérium MIC byla zvolena 80% a vyšší inhibice nárůstu testovacích kmenů proti kontrole v posledním sloupci destičky, tzn., že jako účinná byla ještě považována jamka s 20% nárůstem testovacího kmene v porovnání s kontrolou.

U řady látek docházelo ke špatnému rozpouštění v DMSO nebo se některé látky srážely s růstovým médiem RPMI. U takových derivátů musela být výchozí koncentrace snížena, což mohlo být hlavní příčinou toho, že se nám u řady látek nepodařilo zaznamenat hodnoty MIC v daných koncentracích.

Z našich dosažených výsledků není možné vyvozovat konečné závěry, pro potvrzení účinků *in vitro* by bylo nutné provést další testy na širší škále druhového spektra.

6 ZÁVĚR

1. Pomocí mikrodiluční bujónové metody byl vyhodnocen antimykotický účinek *in vitro* u 80 potenciálně antifungálních látek rozdělených do 10 skupin.
2. Pro testování bylo použito pět testovacích kmenů kvasinek a tři kmeny vláknitých hub.
3. Nejvýraznější antifungální aktivitu vykazovaly deriváty thiosalicylamidů, jako výhodná se u těchto látek jeví substituce chlórem a brómem.
4. Nejméně účinnými skupinami látek byly anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny, arylaminopyraziny, estery pyrazinkarboxylové kyseliny a styrylbenzoxazoly.
5. Ze všech testovacích kmenů byl nejcitlivějším a nejčastěji inhibovaným kmenem *Trichophyton mentagrophytes* 445.
6. Nejúčinnějšími látkami byly z derivátů thiosalicylamidů T5622, T5625, T5620; z derivátů esteru cholesterolu a alkanových kyselin látka T6056 a z pyrazin-2,3.dinitrilů látka VL1-C1.
7. Z dosažených výsledků nelze vyvozovat konečné závěry, pro potvrzení účinku *in vitro* by bylo třeba provést rozsáhlejší testování.

7 SEZNAM LITERATURY

BAJEROVÁ, K. Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodilční bujónové metody VII. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2001.

BARCHIESI, F., ARZENI, D., CASELLI, F., SCALISE, G. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida spp.* *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 45: 408 – 409.

BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* Ed Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. Praha: Marvil, 1996. 558 s. Fungi, s. 344 – 360.

BORGERS, M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev Infect Dis.* 1980; 2: 520 – 534.

BUCHTA, V. Současné možnosti testování citlivosti hub k antifungálním látkám v podmínkách *in vitro.* *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2002; 8(3): 110 – 120.

BUCHTA, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty.* Ed Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V. Praha: Karolinum, 1998. 192 s. ISBN 80-7184-565-5. Mykologie, s. 143 - 156.

CARRILLO-MUNOZ, A. J., QUINDOS, G., LOPEZ-RIBOT, J. L. Current developments in anti-fungal agents. *Curr. Med. Chem. – Anti-Infect. Agents.* 2004; 3: 297 – 323.

CLOUGHLEY, R., KELEHAN, J., CORBETT-FEENEY, G., et al. Soft tissue infection with *Absidia corymbifera* in a patient with idiopathic aplastic anemia. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:725 - 7.

CONSTANTINIDES, J., MISRA, A., NASSAB, R., WILSON, Y. *Absidia corymbifera* fungal infection in burns: a case report and review of the literature. *J Burn Care Res.* 2008; 29: 416 – 9.

DASTGHAIB, L., AZIZADEH, M., JAFARI, P. Therapeutic options for the treatment of tinea capitis: griseofulvin versus fluconazole. *J Dermatolog Treat.* 2005; 16: 43 – 46.

DESNOS-OLLIVIER, M., BRETAGNE, S., BERNÉDE, C. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14: 557 - 65.

DIAMANTOVÁ, D. Léčba mykóz. *Interní medicína pro praxi.* 2003; 10: 8 - 10.

DOLEŽAL, M. Pokroky ve vývoji antifungálních léčiv. *Česk. a Slov. Farm.* 2002; 51: 226 – 235.

DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství.* 2006; 1: 25 – 29.

DORKO, E., PILIPCINEC, E., TKÁCIKOVÁ, L. *Candida* species isolated from cerebrospinal fluid. *Folia Microbiol.* 2002; 47: 179 - 81.

ERER, B., GALIMBERTI, M., LUCARELLI, G. et al. *Trichosporon beigeli*: a life-threatening pathogen in immunocompromised hosts. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25: 745 - 9.

FRAGNER, P. *Malá lékařská mykologie.* Praha: Avicenum, 1984. 192 s. Laboratorní metody, s 171 – 183.

FRANC, B., HEJZLAR, M. *Základy lékařské mikrobiologie, Základy lékařské mykologie a laboratorní diagnostika původců mykotických onemocnění.* Univerzita Karlova v Praze, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1984. s 15 – 18.

FROMTLING, R. A., ABRUZZO, G., K., GILTINAN, D. M. *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1416 – 1420.

GALGIANI, J. N. Susceptibility testing of fungi: current status of the standardization process. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37; 2517 – 2521.

GELFAND, M. S. *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1989; 10: 280 - 3.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. *Biocycle.* 1995; 6: 32 – 35.

HASHIMOTO, T., BLUMENTHAL, H. T. Factors affecting germination of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospore. *Infect Immun.* 1997; 18: 479 - 486.

HASSELWANDTER, K., EBNER, M. R. Microorganisms surviving for 5300 years. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 116: 189 - 94.

HAUTALA, T. A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. *BMC Infectious Diseases.* 2007, 22: 7 - 97.

HYNIE, S. *Speciální farmakologie – Díl VII/B Protiinfekční léčiva.* Praha: Karolinum, 2003. 239 s. ISBN 80-246-0657-7. Antimykotika, s. 152 – 162.

KOĐOUSEK, R. *Mykózy, Lékařsky významná mykotická onemocnění člověka.* Univerzita Palackého v Olomouci, 2003. 189 s. ISBN 80-244-0649-7. Mykózy s převažujícím výskytem hyf ve tkáních, s. 42.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 310 - 50.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 382 - 9.

LI, L., REDDING, S., DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an Emerging Oral Opportunistic Pathogen. *J Dent Res.* 2007; 86(3): 204 – 215.

LÜLLMANN, H. *Farmakologie a toxikologie*. Ed Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. Praha: Grada, 2004. 738 s. ISBN 80-247-0836-1. Antimykotika, s. 527 – 534.

MALLÁTOVÁ, N. Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům a interpretace výsledků. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 2007; 13(4): 151 - 155.

MAREK, J. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Ed Marek, J., et al. Praha: Grada, 2005. 776 s. ISBN 80-247-0839-6. Antimykotika pro systémové použití, s. 519 – 521.

MATHEWS, M. S., PRABHAKAR, S. Chronic meningitis caused by *Trichosporon beigelii* in India. *Mycoses.* 1995; 38: 125 – 126.

NITRAIOVÁ, J. Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodilční bujónové metody I. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2009.

NOVÁK, A., VÁGVÖLGYI, C., PESTI, M. Characterization of *Candida albicans* colony-morphology mutants and their hybrids. *Folia Microbiol.* 2003; 48: 203 - 9.

ONDROVČÍK, P. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Ed Votava, M., et al. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5. Obecná a speciální mykologie, s. 211 - 232.

OYEKA, C. A. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. *Rev Iberoamerican de Micol.* 2000; 8: 60 - 64.

PFALLER, M. A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 515 - 21.

REX, J. H., PFALLER, M. A., RINALDI, M. G., POLAK, A., GALGANI, J. N. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6; 367 – 381.

RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. A., BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 236 - 301.

SEDLÁŘOVÁ, M., VAŠUTOVÁ, M. *Atlas houbových organismů* [online]. Publikováno 2007 [cit. 2009-12-01]. Dostupné z: <http://botany.upol.cz/atlas/system/index.php>

SOUTHERN, P., HORBUL, J., MAHER, D., DAVIS, D. A. *C. albicans* colonization of human mucosal surfaces. *PLoS One.* 2008; 30: 3 - 2067.

STENDERUP, A., PEDERSON, G.T. Yeasts of human origin. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1962; 54: 462 - 472.

STUHLÍK, D. Dermatomykózy. *Medicína pro praxi.* 2007; 7: 320 – 324.

SUCHOPÁR, J. *Remedia compendium.* Ed Suchopár, J., et al. Praha: Panax, 1996. 614 s. ISBN 80-902126-1-1 Antimykotická léčiva, s. 248 – 257.

THAMI, G. P., KAUR, S., BAWA, A. S., et al. Post-surgical zygomycotic necrotizing subcutaneous infection caused by *Absidia corymbifera*. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28: 251 - 3.

TOMŠÍKOVÁ, A. *Nové poznatky v diagnostice mykóz.* A. Praha: Karolinum, 2006. 283 s. ISBN 80-246-1051-5. s. 18, 52 – 60, 158 – 160, 202- 205.

VYŠTEJNOVÁ, S. Hodnocení látek s potenciální antifungální aktivitou *in vitro* V. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 1999.

web atlas.medmicro – *Diskový difúzní test* [online]. [cit. 2010-02-10]. Dostupné z: <http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=cs&sekce=1&podsekce=8>

web atlas.medmicro – *E-test* [online]. [cit. 2010-02-10]. Dostupné z: <http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=cs&sekce=1&podsekce=12>