

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí
mikrodiluční bujónové metody

diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Radek Navrátil

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of biological and medical sciences

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

diploma thesis

Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Radek Navrátil

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Taktéž nebyla tato práce využita k získání jiného nebo stejného titulu“

30.4.2011

Radek Navrátil

Rád bych poděkoval vedoucí svojí diplomové práce Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za odbornou pomoc, připomínky a ochotu při jejím zpracování. Velký dík patří také paní laborantce Idě Dufkové za technickou pomoc a vstřícnost při laboratorní práci a paní Doc. RNDr. Veronice Opletalové, PhD. za připomínky k chemické nomenklatuře.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svojí rodině a přítelkyni za podporu a motivaci do další práce.

Obsah

1. Souhrn	7
2. Abstract.....	8
3. Seznam zkratek	9
4. Úvod.....	10
4.1. Zadání – cíl práce.....	10
5. Teoretická část.....	11
5.1. Charakteristika testovaných druhů	11
5.1.1. <i>Candida albicans</i>	11
5.1.2. <i>Candida tropicalis</i>	12
5.1.3. <i>Candida krusei</i>	12
5.1.4. <i>Candida glabrata</i>	12
5.1.5. <i>Trichosporon beigeli</i>	13
5.1.6. <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
5.1.7. <i>Absidia corymbifera</i>	14
5.1.8. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14
5.2. Onemocnění vyvolávaná houbami	15
5.2.1. Mycetismy	15
5.2.2. Mykotoxikózy.....	16
5.2.2.1. Námelové alkaloidy	16
5.2.2.2. Aflatoxiny	16
5.2.2.3. Ochratoxiny	17
5.2.3. Mykoalergie.....	17
5.2.4. Mykózy	17
5.2.4.1. Povrchové mykózy	18
5.2.4.2. Kožní mykózy	19
5.2.4.3. Podkožní mykózy	20
5.2.4.4. Systémové mykózy.....	20
5.3. Laboratorní diagnostika a identifikace hub	24
5.3.1. Metody přímé mikroskopie	25
5.3.2. Kultivační metody.....	25
5.3.3. Biochemické metody	26
5.3.4. Sérologické metody.....	27
5.3.5. Molekulárně biologické metody.....	29
5.4. Testování antifungální aktivity <i>in vitro</i>	29
5.4.1. Agarová difúzní metoda	31
5.4.2. Agarová diluční metoda	32
5.4.3. Diluční bujónové testy	32
5.5. Farmakoterapie mykotických infekcí	34

5.5.1. Polyenová antibiotika	34
5.5.2. Azolová antimykotika	35
5.5.2.1. Deriváty imidazolu	35
5.5.2.2. Deriváty triazolu.....	36
5.5.3. Aylaminy.....	38
5.5.4. Morfoliny.....	39
5.5.5. Echinokandiny.....	39
5.5.6. Antimetabolity.....	39
6. Experimentální část.....	40
6.1. Materiál.....	40
6.2. Testované kmeny kvasinek a hub	41
6.3. Testované látky	41
6.4. Metodika	42
6.4.1. Příprava suspenzí testovaných kmenů	42
6.4.2. Příprava růstového média	42
6.4.3. Příprava ředící řady testované látky.....	42
6.4.4. Vzorec pro výpočet objemu DMSO	43
6.4.5. Příprava mikrotitrační destičky	43
6.4.6. Vyhodnocení	44
6.5. Výsledky	45
6.5.1. Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny	45
6.5.2. Deriváty 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny	47
6.5.3. Deriváty 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu	49
6.5.4. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu	51
6.5.5. Deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu.....	52
6.5.6. Deriváty 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu.....	54
6.5.7. Deriváty 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu	55
6.5.8. Der. 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu.....	57
6.5.9. Deriváty 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu	59
7. Diskuze	61
8. Závěr.....	66
9. Seznam obrázků a tabulek.....	67
10. Literatura	69

1. Souhrn

Radek Navrátil

Vyhodnocení potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cílem této práce bylo stanovení antifungální aktivity látek připravených na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Látky byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou na osmi kmenech patogenních hub: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus fumigatus* a *Trichophyton mentagrophytes*. Podle společných strukturních znaků byly látky rozděleny do devíti skupin.

Nejvíce účinné byly deriváty 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu, které dosáhly nejnižších hodnot MIC. Žádnou účinnost neukázaly deriváty 5,6-diazin-2,3-dikarbonitrilu.

Byla vyhodnocena míra citlivosti jednotlivých testovaných kmenů. Nejcitlivější byly *Candida albicans* a *Trichophyton mentagrophytes*. Jako nejvíce rezistentní kmeny se ukázaly *Aspergillus fumigatus* a *Candida tropicalis*. Substituce chlorem na pyrazinovém jádře ukázala mírné zvýšení antimykotické aktivity.

Pro získání jednoznačných výsledků je třeba provést další testy.

2. Abstract

Radek Navrátil

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

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

The aim of this thesis was to assess the antifungal activity of substances prepared at the Department of pharmaceutical chemistry and drug control, Faculty of Pharmacy of Charles University in Hradec Králové.

Substances were tested through use of microdilution broth method at eight strains of pathogenic fungi: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigelii*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton mentagrophytes*. Substances were divided into nine groups according to their common structural characteristics.

The most effective were the derivatives of 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazon]-1,3-thiazolidin-4-one with the lowest values of MIC. Derivates of 5,6-diazine-2,3-dicarbonitrile presented no activity.

The rate of susceptibility for each tested strain was evaluated. The most susceptible were the *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* strains. On the contrary, *Aspergillus fumigatus* and *Candida tropicalis* were presented as the most resistant. Chlorine substitution of pyrazine presented a slight increase of antifungal activity.

It is necessary to carry out more tests to acquire definite results.

3. Seznam zkratek

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFST	Antifungal Susceptibility Testing
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome syndrom získaného selhání imunity
ATB	Antibiotikum
ATM	Antimykotikum
BHI	Brain – Heart Infusion, mozkosrdcový výluh
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming units, kolonie formující jednotky
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CNS	centrální nervový systém
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GIT	gastrointestinální trakt
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
RPMI	Roswel Park Memorial Institute
SGA	Sabouraudův glukózový agar
TB	<i>Trichosporon beigelii</i>
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>

4. Úvod

Problematice mykotických infekcí je v posledních letech věnována stále větší pozornost. Jejich incidence a závažnost se zvýšila paradoxně ke zvyšování úrovně lékařské péče, která umožňuje používání nových, dříve technicky neproveditelných metod a postupů. Orgánové transplantace, operace srdce a mozku, užívání imunosupresiv a širokospektrých antibiotik, protinádorová terapie a rozsáhlé chirurgické zákroky mají za následek stále větší počet imunokompromitovaných pacientů. Ti jsou, spolu s pacienty se syndromem získaného selhání imunity (AIDS), mnohem náchylnější k oportunním infekcím se závažným průběhem. Rovněž postupné prodlužování délky života, spolu se zlepšováním cestovních možností a zdokonalováním diagnostických metod přispívá k širokému využívání antimykotické terapie.

V důsledku výše uvedených faktorů se celosvětově zvyšuje spotřeba antimykotik, což vede nevyhnutelně k rozvoji rezistence a snižování účinnosti dosud používaných látek. Ačkoliv tento problém zatím není tak markantní jako v případě antibiotik, dá se předpokládat jeho zhoršování do budoucna.

Výzkum a vývoj nových látek by mohl přinést více možností v terapii mykotických onemocnění, zvyšování její účinnosti a nižší zatížení pacienta její toxicitou. Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové se touto problematikou dlouhodobě zabývá a jejich vzorky byly v této práci zkoumány pro možnou antifungální aktivitu.

4.1. Zadání – cíl práce

- rešerše literatury
- zvládnutí základních mikrobiologických technik v mykologické laboratoři
- vypracování postupu vyhodnocení antifungální aktivity *in vitro* pomocí mikrodiluční bujónové metody
- vlastní experimenty
- zpracování výsledků
- vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky

5. Teoretická část

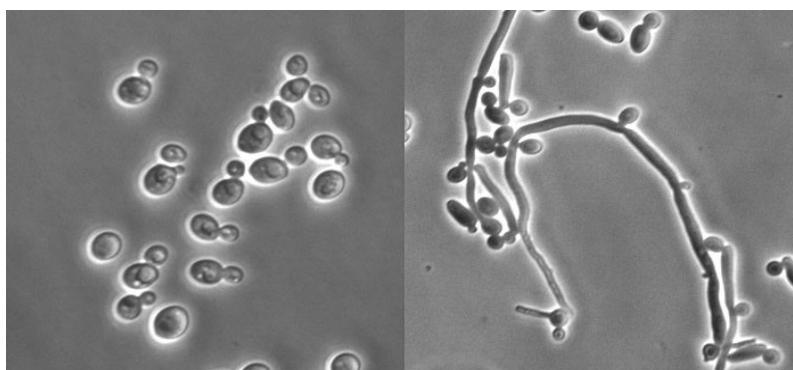
5.1. Charakteristika testovaných druhů

V rámci této práce jsme testovali citlivost osmi druhů kvasinek a vláknitých hub, které bývají nejčastějšími původci mykotických onemocnění u člověka.

5.1.1. Candida albicans

Obecně vzato je rod *Candida* považován za nejvýznamnější skupinu oportunních mykotických patogenů. V roce 2004 se *Candida albicans* nacházela na 4. místě mezi původci všech nozokomiálních infekcí v amerických nemocnicích. Lze ji nalézt v 90-100% vzorků odebraných ze sliznic a v 50-70% vzorků krevních (Murray et al., 2009).

Mikroskopicky se jedná o Gram-pozitivní oválné buňky s průměrem 3-5 μm , které se rozmnožují pučením. Mohou tvořit pseudohyfy, vzácně i článkovaná mycelia. Jednotlivé druhy rodu *Candida* se od sebe navzájem liší morfologickými a zejména biochemickými vlastnostmi, díky rozdílné schopnosti utilizace uhlíku a dusíku z různých zdrojů (Kayser et al., 2005).



Obrázek 1: *Candida albicans* na mikroskopickém snímku
vlevo pučící buňky, vpravo pseudohyfy

(zdroj:<http://www.candida5daydetox.com/wpcontent/uploads/2010/07/Candida13.jpg>)

Candida albicans se v přírodě vyskytuje ojediněle, naproti tomu je její výskyt na lidské i zvířecí sliznici značný (Fragner, 1992). Primárním místem osídlení je gastrointestinální trakt v celé jeho délce a minoritně se vyskytuje i v pochvě, děloze a na kůži (Murray et al., 2009). Po 7 dnech kultivace při 24°C na Sabouraudově glukózovém agaru (u níže uvedených druhů se uvažují stejné

podmínky, není-li řečeno jinak) nejčastěji tvoří porcelánově bílé, mírně vyklenuté kolonie s lesklým, hladkým povrchem a nevláknitým okrajem.

U druhu *Candida albicans* byla zpozorována schopnost velmi rychlé změny fenotypu, tzv. „switching“, kdy jsou všechny buňky v populaci schopné změnit svoje uspořádání i antigenní povrch pouzdra na základě podnětů z vnějšího prostředí. Tímto se vysvětluje schopnost kvasinky adaptovat se na život v různých prostředích a unikat fagocytóze (Tomšíková, 2006).

Z patogenních projevů jsou nejčastější kožní kandidózy, onychomykózy, slizniční kandidózy (soor v dutině ústní, vaginální sliznice). Méně často potom peritonitidy, sepse, endokarditidy a oční keratomykózy (Fragner, 1992).

5.1.2. Candida tropicalis

Tuto kvasinku lze nalézt v hniјícím dřevě, kyselém zelí, kefiru, vodě a půdě. U člověka je součástí mikroflóry zejména horní části gastrointestinálního traktu. Na agaru tvoří nejčastěji bílé, téměř polokulovitě vyklenuté, lesklé kolonie s krátce vláknitým okrajem. Patogenita pro člověka je poměrně vysoká, kromě otomykóz a onychomykóz může způsobovat endokarditidu a systémová onemocnění s celkovou sepsí organismu končící smrtí (Fragner, 1992).

5.1.3. Candida krusei

Nejčastěji se nachází ve vzduchu, jogurtu, nepasterovaném pivu a ovocných šťávách. U piva a vína způsobuje tzv. „křís“. Průměr kolonií se pohybuje mezi 3-8 mm, nejčastěji mají šedavě krémovou barvu s výrazně zdviženým středem. Od středu k okraji se mohou vyskytovat nepravidelné radiální zářezy. Okraj je nízký, laločnatý, vroubkovaný nebo vláknitý. U člověka způsobuje peritonitidy, kolpitidy a vředy rohovky (Fragner, 1992).

5.1.4. Candida glabrata

V přírodě se vyskytuje v pomerančové šťávě a pekařském droždí. U člověka tvoří součást přirozené mikroflóry v ústech a pochvě. Kolonie tvoří bělavě krémové, nízké s hladkým a velmi lesklým povrchem. Z onemocnění způsobuje kolpitidy, endokarditidy, u imunokompromitovaných pacientů i závažné

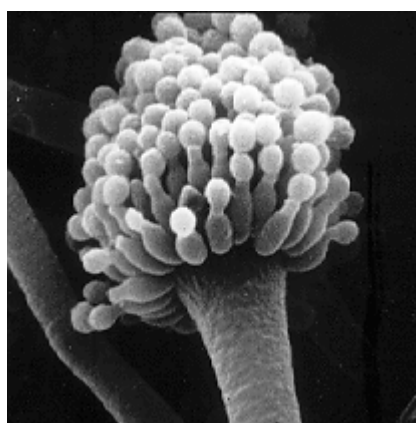
mozkové abscesy [(Fragner, 1992) uváděno pod synonymem *Torulopsis glabrata*].

5.1.5. Trichosporon beigeli

U člověka tvoří součást přirozené mikroflóry v plicích, játrech, dutině ústní a zvukovodu. V přírodě ji lze nalézt v půdě a dřevovině při výrobě papíru. Kolonie tvoří nízké, bělavé, s výraznějším středem a bělavými svazečky vláken směřujícími k okraji. Ten bývá zpravidla dlouze vláknitý. Způsobuje onemocnění tzv. „bílá piedra“, postoperativní endoftalmitidu, sepse a otomykózy. Spoluúčastní se na interdigitálních erozích rukou. Byla popsána i alergie s plicními projevy na *T. beigeli*. [(Fragner, 1992), uváděno pod synonymem *Trichosporon cutaneum*].

5.1.6. Aspergillus fumigatus

Příslušníky rodu *Aspergillus* lze nalézt v půdě, na staveništích a v rozkládající se vegetaci (Murray et al., 2009). Tvoří vzdušná mycelia s dlouhými konidiofory zakončenými trsem konidií. Hyfy jsou vláknité, článkované, široké přibližně 3 – 4 μm a větvené do tvaru písmene Y. Lze je pěstovat na většině běžně užívaných médií, pro selektivní kultivaci je nejvhodnější Sabouraudův agar (Kayser et al., 2005).



Obrázek 2: *Aspergillus fumigatus*
mikrofotografie konidioforu

(zdroj:http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/miller_melo/Aspergillus%20wikimedia%20commons,%20nih%20govmt.gif)

Nejčastějším způsobem infekce je vdechnutí konidií, ale mohou pronikat i skrze narušenou kůži a sliznice (zranění, operace). Po vniknutí do organismu

se vážou k fibrinogenu a lamininu na bazální membráně alveolů (Murray et al., 2009). Při vyklíčení v preexistující dutince v plicní tkáni (např. po prodělané tuberkulóze) vzniká tzv. aspergilom, což může vést k chronické nekrotizující pneumonii. U imunokompromitovaných pacientů, trpících zejména slabou aktivitou neutrofilů, může dojít k rozšíření krevní cestou do trávicího traktu, ledvin a CNS (Schindler, 2010).

5.1.7. Absidia corymbifera

V největší míře se vyskytuje v rozkládajícím se rostlinném materiálu. Vytváří vysoká vzdušná mycelia šedohnědé barvy. Ta jsou tvořena nepravidelně tvarovanými, nečlánkovanými hyfami, které mívají průměr přes 10 µm a větví se v pravých úhlech (Murray et al., 2009).

Jedná se o typické oportunní patogeny, postihující mimo jiné i pacienty s metabolickými poruchami, obzvláště diabetem a rozsáhlejšími popáleninami. Onemocnění se označují jako zygomycózy (podle třídy Zygomycetes) a postihují zejména mozek a nosní dutiny (tzv. rhinocerebrální forma), méně často kůži, plíce a GIT (Kayser et al., 2005).

5.1.8. Trichophyton mentagrophytes

Rod *Trichophyton* se řadí mezi tzv. dermatofyty, houby mající schopnost napadat kůži, vlasy a nehty díky produkci enzymů rozkládajících keratin. *T. mentagrophytes* se vyskytuje celosvětově a spolu s *T. rubrum* tvoří 80-90% populace všech dermatofytů. Poměrně běžně jej lze nalézt na kůži hlodavců. Jednotlivé druhy rodu *Trichophyton* lze rozlišit podle charakteristických znaků jejich spor. *T. mentagrophytes* tvoří hroznovité shluky kulovitých mikrokonidií nebo, méně často, osamocené doutníkovité makrokonidie s tenkou stěnou. Charakteristickým morfologickým znakem jsou tzv. spirální vlákna.

Ve většině případů probíhá infekce pouze na povrchu epidermis a jen vzácně proniká do hlubších vrstev. Bývá označována jako „tinea“ (Murray et al., 2009).

5.2. Onemocnění vyvolávaná houbami

V následující kapitole je věnována pozornost zejména nejvýznamnějším onemocněním, popř. těm, která mají souvislost s testovanými kmeny. Podle etiologie lze patologické působení hub na lidský organismus rozdělit do 4 základních skupin (Buchta et al., 2002):

- Mycetismy
- Mykotoxikózy
- Mykoalergie
- Mykózy

5.2.1. Mycetismy

Toto označení se používá pro alimentární otravy způsobené požitím plodnic vyšších hub, které jsou schopné produkovat toxiny. V našich zeměpisných šířkách se jedná zejména o zástupce stopkovýtrusných hub (*Basidiomycetes*): *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *A. muscaria*, *Entoloma lividum*, *Inocybe patouillardii* a *Boletus satanas*. Tyto toxiny lze rozdělit podle místa účinku do dvou skupin (Buchta et al., 2002):

- Cytotoxiny

Inhibují proteosyntézu somatických buněk interferencí s polymerázou II a tím způsobují jejich ireverzibilní poškození, které může vést k poškození jater a ledvin. Do této skupiny patří např. amanitin, phalloidin. Jejich účinky se zpravidla projevují se zpožděním 6-24 hodin. Jako antidotum bývá používán penicilin v extrémně vysokých dávkách a silibinin.

- Neurotoxiny

Nejlépe prozkoumanou látkou této skupiny je muskarin. Jeho účinky plynou z jeho parasymptomimetické aktivity, tzn. slzení, slinění, poruchy vidění, zvracení. Dostavují se obvykle již po několika minutách, ale otrava obvykle nevede ke smrti. Antidotem jsou parasymptolytika, např. atropin.

5.2.2. Mykotoxikózy

Narozdíl od mycetismů dochází při mykotoxikózách k otravě zprostředkovaně, pozřením kontaminované potravy, inhalací nebo přímým kontaktem s pokožkou. Někdy bývají v zahraniční literatuře označovány jako tzv. "toxic mold syndrome" (Nordness et al., 2003). Hlavními původci a producenty toxinů jsou vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky, produkty sekundárního metabolismu hub (Buchta et al., 2002). Bývají poměrně běžně k nalezení v lidské a zvířecí potravě, významným zdrojem intoxikace jsou i spory rozptýlené ve vzduchu, zejména při masivním zamoření nebo dlouhodobé expozici (Burge, 2001).

Spektrum patogenity houbových toxinů je široké, mají účinky neurotoxické, hepatotoxické, karcinogenní i teratogenní. Nejvýznamější skupiny jsou aflatoxiny, ochratoxiny, trichoteceny a námelové alkaloidy (Buchta et al., 2002).

5.2.2.1. Námelové alkaloidy

Jsou to látky produkované kmeny *Claviceps purpurea* a *C. paspali*. Klinický obraz otravy tvoří α -adrenergní blokáda: vazokonstrikce cév vedoucí k nekróze a gangréně tkání (Buchta et al., 2002). Dalším častým projevem jsou křeče, záchvaty a halucinace. Tyto neurologické příznaky vyvolává zejména intoxikace substrátem kontaminovaným *C. fusiformis* (Pettigrew et al., 2009). Ve středověku proběhly poměrně rozsáhlé epidemie způsobené konzumací potravin připravených z kontaminovaného obilí (Richard, 2007).

V dnešní době našly využití ve farmacii jako prekurzory pro uterotonika.

5.2.2.2. Aflatoxiny

Typickými producenty jsou kmeny *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. Na základě fluorescence se rozlišují aflatoxiny B a G. Díky vazbě na DNA mají silné mutagenní, imunosupresivní a zejména karcinogenní účinky (Buchta et al., 2002). Nejvýznamnější je aflatoxin B₁, který i v malém množství způsobuje karcinom jater a je jedním z nejsilnějších známých karcinogenů (Vopršalová a Žáčková, 2000). Mechanismus kancerogeneze spočívá v aktivaci proto-onkogenů (*C-myc*, *C-Ha-ras*, *Ki-ras* a *N-ras*) a může způsobovat mutaci tumor supresorového genu *p53*. Díky epidemiologickým studiím v Číně a Africe byla zjištěna transverze nukleotidu G za T v kodonu 249 v genu *p53*. Až 10x vyšší

výskyt karcinomu jater byl pozorován v rozvojových zemích, kde lidé trpí nedostatkem potravy a normy pro obsah aflatoxinů v potravě nejsou dodržovány. Předpokládá se také, že kwashiorkor a Reyův syndrom mohou být projevy intoxikace aflatoxiny v dětském věku (Murray et al., 2009).

Zdrojem bývá dlouhodobě skladovaný substrát jako obilniny, olejnin, krmiva a kompoty, zejména je-li skladován ve vlhkém prostředí se zvýšenou teplotou (Buchta et al., 2002).

5.2.2.3. Ochratoxiny

Patří mezi sekundární metabolity rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Nejtoxičtější látkou této skupiny je ochratoxin A, který má nefrotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky. Díky svému cholinergnímu působení způsobuje vasodilataci, křeče hladkého svalstva a bronchospasmy.

K intoxikaci může dojít konzumací kontaminované kávy, obilnin a vepřového masa. Ochratoxiny se mohou šířit i v rámci potravního řetězce (Murray et al., 2009).

5.2.3. Mykoalergie

Jedná se o hypersenzitivní reakce imunitního systému na antigeny, které se nacházejí na alergenních sporách některých rodů hub. Nejčastěji jde o vláknité houby rodu *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* a některé kvasinky a basidiomycety (Buchta et al., 2002). Rozdělují se do několika skupin, podle lokalizace reakce a závažnosti projevů (Pettigrew et al., 2009):

- Alergická rhinosinusitis
- Hypersenzitivní pneumonitis (známá též jako „farmářská plíce“)
- Alergická bronchopulmonární aspergilóza
- Astma
- Atopická dermatitida

5.2.4. Mykózy

Jako mykózy se označují onemocnění způsobená kolonizací tkání nebo tělních tekutin hostitele a která vedou k proliferaci, sporulaci popř. diferenciaci

houby, což napadené tkáně přímo nebo nepřímo poškozuje (Buchta et al., 2002).

Imunitní systém zdravého člověka je vůči infekcím způsobeným houbami poměrně rezistentní. Část potenciálně patogenních organismů je běžnou součástí endogenní mikroflóry nebo s nimi přichází neustále do styku při jakémkoliv kontaktu s vnějším prostředím. Z tohoto pohledu lze původce mykóz rozdělit na primární, schopné infikovat i zcela zdravého jedince a oportunní, jež se projeví v případě narušení imunity hostitele (Murray et al., 2009).

Rozlišují se 3 základní způsoby přenosu houbových infekcí (Buchta et al., 2002):

- 1) inhalací – konidíí nebo spor rozptýlených ve vzduchu
- 2) kontaktem
 - přímým – s infikovaným jedincem, popř. zdravým přenašečem
 - nepřímým – pomocí předmětů, které přišly do styku s nemocným
- 3) traumatem – narušením integrity kůže nebo sliznice

V následujících kapitolách byla onemocnění rozdělena podle anatomické lokalizace a rozsahu postižení.

5.2.4.1. Povrchové mykózy

Jejich původci jsou houby, které kolonizují svrchní keratinizované vrstvy kůže (stratum corneum), nehty a vlasy. Infekce probíhá s minimální imunitní odpovědí a nedochází k trvalému poškození tkáně. Jejich patogenita je zanedbatelná a snadno je lze diagnostikovat a léčit (Murray et al., 2009).

- Pityriasis versicolor

V některých zdrojích uváděná pod synonymem *tinea versicolor*. Běžné onemocnění, které se vyskytuje celosvětově, v tropických oblastech zasahuje až 60% populace. Způsobuje jej kvasinka *Malassezia furfur*, která se v přírodě běžně nevyskytuje, zato tvoří součást běžné lidské mikroflóry (Murray et al., 2009).

Klinický obraz tvoří žluto-bílá až hnědavá ložiska nepravidelného tvaru, dobře ohraničená. Vyskytují se nejčastěji na horní části trupu, krku a pažích a jsou pokrytá šupinkami, které se snadno olupují (Buchta et al.,

2002). *M. furfur* zasahuje do produkce melaninu, proto mají ložiska výrazně sníženou pigmentaci. Jiné symptomy se vyskytují zřídka, např. mírně svědění, velmi vzácná je infekce vlasového folikulu (Murray et al., 2009).

- Bílá píedra

Původci bývají zástupci rodu *Trichosporon*: *T. beigelii*, *T. inkin*, *T. mucoides*, kteří napadají ochlupení v podpaží a tříslech. Tvoří bílé až hnědé nánosy na chlupech, měkké, těstovité konzistence, které lze snadno odstranit pouhým seškrábnutím nehtem. Místem výskytu jsou tropické a subtropické oblasti s nízkým hygienickým standardem (Murray et al., 2009).

5.2.4.2. Kožní mykózy

Nejčastějšími původci jsou dermatofytní houby, zejména rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum*, onemocnění se označují jako dermatofytózy (Murray et al., 2009). Teoreticky by bylo možné do této skupiny zařadit i dermatomykózy způsobené rody *Candida*, *Cryptococcus* a *Aspergillus* (Buchta et al., 2002). Vzhledem k převažujícímu významu bude pozornost věnována dermatofytózám.

Díky schopnosti některých rodů rozkládat a využívat keratin jsou primárním místem infekce horní vrstvy kůže, vlasy, nehty, popř. rohy. Přesný mechanismus získávání živin z keratinizovaných tkání zatím není objasněn (Vermout et al., 2008). Z ekologického hlediska lze dermatofyty rozdělit do 3 skupin (Buchta et al., 2002):

- geofilní – *Microsporum gypseum*

Vyskytují se běžně v půdě a vzácně infikují lidi nebo zvířata.

- zoofilní – *M. canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*

Parazitují převážně na zvířatech, ale mohou být přeneseny i na člověka. Stejně jako v případě geofilních druhů má infekce silný zánětlivý charakter, ale zpravidla dobře reaguje na léčbu.

- antropofilní – *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum*

Primárně vázané na člověka, způsobují převážně chronické, slabě zánětlivé infekce, které se obtížně léčí.

Dermatofyty se vyskytují celosvětově, *T. mentagrophytes* a *T. rubrum* jsou zodpovědné za 80% až 90% všech případů dermatofytóz. Infekce vzniká prostřednictvím arthrospor, které mohou např. v šupinkách kůže nebo vlasech přežívat velmi dlouhou dobu (Murray et al., 2009).

Soubor symptomů se označuje jako tzv. tinea a je specifikován podle zasažené části těla. Často bývají postižena místa, kde dochází k zapářce a maceraci pokožky, např. vlivem nošení uzavřené, nevětrané obuvi nebo nevhodného prádla. Typickým příkladem je tinea pedis, známá také jako "atletická noha", dále t. cruris postihující třísla a t. corporis na hladké kůži těla. Specificky je rozlišeno napadení vlasu podle lokalizace houbových elementů: endothrix, kdy hyfy prorůstají vnitřkem vlasu a ektothrix, kdy se nacházejí vně (Buchta et al., 2002). U prepubescentních dětí je zvýšená prevalence výskytu tinea capitis, způsobovaná hlavně *Microsporum canis*, která zasahuje kštici, obočí i řasy (Degreef, 2008).

Klinický obraz se liší podle původce a místa infekce. Nejčastěji se vyskytují ložiska se zánětlivou reakcí, která se zesiluje směrem k okrajům a od středu se spontánně vyhojuje. Na ochlupených částech pokožky je častá alopecie s výrazným šupinatěním. U tinea corporis lze pozorovat erytém s nepravidelnými okraji. Infekce rukou a nohou se může přenést i na nehty (t. ungiunum, onychomykóza), které ztrácejí pevnost, deformují se a může dojít až k jejich úplnému odumření (Murray et al., 2009).

5.2.4.3. Podkožní mykózy

Vznikají většinou jako důsledek traumatu, při kterém jsou patogenem infikovány hlubší vrstvy kůže, podkožní vazivo a kost. Ačkoliv se mohou projevat i na povrchu kůže, zřídka napadají ostatní orgány. Původci mají malý patogenní potenciál a nachází se obvykle v půdě, dřevě a hnijící vegetaci. K rozvoji klinických příznaků dochází i u pacientů s funkční imunitou. Průběh onemocnění bývá zpravidla chronický, špatně reaguje na farmakologickou léčbu a je třeba chirurgického zásahu k úplnému vyléčení (Murray et al., 2009).

5.2.4.4. Systémové mykózy

Postihují jeden nebo více orgánů a mohou diseminovat v organismu, což může mít za následek septický stav, zejména u pacientů s alterovanou

imunitou. Podle prevalence ve vztahu k imunitě se dělí na primární a sekundární (Buchta et al., 2002).

Primární mykózy

Vyskytují se i u imunokompetentních jedinců po kontaktu s patogenem. Mezi nejčastější původce patří dimorfní houby a kvasinka *Cryptococcus neoformans*. Jejich přirozeným prostředím je půda, odkud může dojít k inhalaci spor spolu s prachem. Z plic se šíří krví nebo lymfou do ostatních orgánů kde tvoří granulomatózní zánětlivá ložiska (Kayser et al., 2005).

- Infekce vyvolané dimorfními houbami

V přirozeném prostředí a *in vitro* při 30°C se tyto houby vyskytují ve formě vláken, ve tkáních a živných půdách při 37°C rostou jako kvasinky (Murray et al., 2009). Patogenní pro člověka jsou rody *Blastomyces*, *Coccidiomyces*, *Histoplasma* a *Paracoccidiomyces*. V Evropě se tyto houby přirozeně nevyskytují, endemický výskyt je vázán na sušší oblasti Severní a Jižní Ameriky s teplejším klimatem.

U zdravých jedinců je průběh onemocnění mírný a často bez symptomů, které se mohou objevit až po opuštění oblasti endemického výskytu. V případě silného poškození imunity dochází primárně k postižení plic a dále kůže, sliznic, lymfoidních orgánů, kostí a CNS (Buchta et al., 2002).

- Kryptokokóza

Kvasinka *Cryptococcus neoformans* se vyskytuje celosvětově, v půdě a zejména v holubím trusu. Z plic, kam vstupují buňky spolu s prachem, velmi často diseminuje do CNS. U imunokompromitovaných jedinců se může rozvinout až meningitida. Velmi ohroženi jsou pacienti s AIDS, incidence diseminované kryptokokózy v USA byla nejvyšší na počátku 90. let, před rozšířením flukonazolu a moderních antiretrovirotik v klinické praxi. U zdravých jedinců probíhá většinou asymptomaticky a proto je některými autory *C. neoformans* řazen mezi oportunní patogeny (Murray et al., 2009).

Sekundární mykózy

Bývají někdy označovány jako oportunní mykózy, protože předpokladem pro jejich rozvoj je imunitní deficit. Mezi rizikové skupiny patří pacienti po

transplantacích a velkých chirurgických zákrocích (obzvláště v oblasti GIT), s AIDS, nádorovým onemocněním a imunosupresivní terapií. V posledních dvou desetiletích se výrazně zvýšila incidence oportunních mykóz a s tím související úmrtnost v důsledku nárůstu pacientů spadajících do rizikových skupin. Častým případem jsou nozokomiální nákazy, které představují velkou zátěž pro zdravotnický systém (Murray et al., 2009).

Kromě známých původců z rodů *Candida* a *Aspergillus* se v posledních letech zaměřuje pozornost i na rody *Trichosporon*, *Malassezia*, *Rhodotula*, *Rhizopus*, *Absidia* a další, z nichž některé byly považovány za nepatogenní pro člověka. Diagnostika těchto infekcí je obtížná a pacienti často neadekvátně reagují na standardní farmakoterapii (Murray et al., 2009).

- Kandidóza

Ačkoliv je známých přes 100 druhů rodu *Candida*, za drtivou většinu infekcí je zodpovědných zejména několik druhů: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (Murray et al., 2009), *C. krusei*, *C. guilliermondii* (Kayser et al., 2005) a *C. lusitaniae* (Tomšíková, 2006). Jelikož se jedná o běžnou součást lidské mikroflóry, je většina infekcí endogenního původu. V případě nozokomiální nákazy je možný i přenos kontaktem se zdravotnickým personálem, zejména na jednotkách intenzivní péče. Kromě výše uvedeného se k rizikovým faktorům řadí i méně závažné narušení imunity: diabetes, dlouhodobé užívání širokospektrých antibiotik, katetrizace, novorozenecký věk. Nejčastější původ systémové infekce je endogenní z GIT nebo urogenitálního traktu, exogenní potom infikovaným katétrem (Murray et al., 2009).

Kandidóza se může manifestovat téměř ve všech orgánech. Nejčastěji se vyskytují slizniční formy: orofaryngeální ("soor") a vulvovaginální. Vytváří bílé, zvrásněné povlaky na sliznici, které mohou mít i charakter pseudomembrán. Kožní léze se vyznačují výrazným erytémem a svěděním, bývají příznakem hematogenní diseminace patogenu. Pro diagnostiku mají velký význam, neboť z nich může být přímo odebrán vzorek a zjištěn původce. Specifickým projevem alterace T-lymfocytů je chronická mukokutánní kandidóza s rozsáhlými granulomatózními lézemi, které zanechávají trvalé jizvy. Zasažení urinárního traktu je

nebezpečné v případě, že z krve přejdou patogeny do ledvin, kde tvoří abscesy a nekrózy papil. Nejčastěji ovšem dochází ke kolonizaci močového měchýře doprovázené kandidurii bez výraznějších symptomů. Oko je častým místem infekce při systémové kandióze a následná endoftalmitida důležitým indikátorem diseminace. S odstupem až několika měsíců po úspěšném залéčení se může vyskytnout osteomyelitida jako následek předcházející infekce (Murray et al., 2009).

- Aspergilóza

Mezi nejčastější původce patří vláknité houby rodu *Aspergillus*: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* a *A. terreus*. Infekce je důsledkem inhalace spor nebo jejich proniknutí pokožkou vlivem traumatu. Rizikovým faktorem pro rozvoj aspergilózy je pobyt v prostředí kontaminovaném sporama (stavební práce) a imunoalterace (dlouhodobé systémové terapie kortikosteroidy, polytraumata, endoprotézy) (Buchta et al., 2002).

Převážná většina infekcí má zdroj v dýchacím ústrojí. Imunokompetentní jedinci zpravidla trpí alergickými projevy, časté je astma a zvýšené hladiny imunoglobulinu E. Při kolonizaci paranasálních dutin a dolních cest dýchacích se může vyskytnout chronická obstrukční aspergilóza, predisponovaní jsou pacienti trpící cystickou fibrózou, popř. chronickou bronchitidou, tato onemocnění zpravidla maskují symptomy probíhající aspergilózy. Vlivem předchozího poškození plicní tkáně (např. tuberkulóza) vznikají dutinky, které mohou být též osídleny a tvořit základ tzv. aspergilomu. Na rentgenovém vyšetření jsou tyto útvary patrné a zpravidla asymptomatické (Murray et al., 2009). RTG nález zpravidla není charakteristický, infiltráty jsou často lokalizovány na periférii, dostatečně průkazné bývá až vyšetření CT (Tomšíková, 2006).

U imunoalterovaných pacientů dochází nejčastěji k invazivní pulmonární aspergilóze s následnou destrukcí a nekrotizací plicní tkáně. Projevuje se horečkou, bolestí na hrudi a hemoptýzou. Úmrtnost je velmi vysoká, i přes specifickou terapii antimykotiky přesahuje 70%. Z plicních ložisek navíc často diseminuje do mozku, srdce, GIT a jater (Murray et al., 2009).

- Zygomycóza

Soubor onemocnění, které získaly název podle původců z třídy Zygomycetes. Mezi nejvýznamnější patří řády *Rhizopus*, *Mucor* a *Absidia*. Tyto houby se vyskytují celosvětově, k infekci dochází kontaminací otevřených ran nebo inhalací spor. V případě nozokomiálních nákaz se šíří pravděpodobně ventilací a kontaminovaným zdravotnickým materiálem. Ohroženi jsou především pacienti s krevními malignitami a dlouhodobě nekompensovaným diabetem.

Onemocnění zygomycetami jsou poměrně vzácná a jejich prognóza je špatná. Úmrtnost se pohybuje od 70 do 100%. Plicní forma bývá zaměňována za aspergilózu. Zasažená tkáň rychle odumírá jako důsledek trombózy. Nejzávažnější je rhinocerebrální forma v důsledku infekce paranasálních dutin, rychle se šíří do očnice a CNS, kde způsobuje meningitidu (Murray et al., 2009).

Obvykle špatně reagují na chemoterapii a léčbu je nutno doplnit radikálním chirurgickým zákrokem (Buchta et al., 2002).

5.3. Laboratorní diagnostika a identifikace hub

Kvalitní diagnostika je jedním ze základů pro úspěšnou terapii onemocnění způsobených houbami. Spektrum původců se neustále rozšiřuje a pro správné stanovení je třeba, aby použité metody byly dostatečně průkazné, specifické a výsledek byl k dispozici v co nejkratší možné době.

Základem pro diagnostiku je získání vzorků v dostatečném množství a kvalitě. Měly by být odebírány asepticky, kvůli zabránění možné kontaminace, a v co nejkratší době zpracovány. Místo odběru se liší v závislosti na indikaci a použité metodě. Nejčastěji se používají seškraby z kůže a nehtů, vlasy, chlupy a nehty při podezření na dermatofyty, exsudáty, hnis a stěry ze sliznic u oportunních infekcí. V případě podezření na systémová onemocnění je vhodné odebrat vzorky z co největšího počtu míst, zejména z biopsií tkání, krve a moči (Jílek et al., 2002).

5.3.1. Metody přímé mikroskopie

Vyšetření vzorků mikroskopem je považováno za nejrychlejší a nejlevnější metodu, ačkoliv je málo citlivé a průkazné informace vždy poskytuje až kultivační vyšetření. Zkušený pozorovatel ovšem může určit směr, kterým by se další diagnostika měla ubírat, popř. stanovit alespoň rámcově možnosti terapie.

Sledují se morfologické znaky: tvar a velikost buněk, šířka a větvení vláken, způsob pučení a tvorba konidií. Některé druhy, např. *Pneumocystis jirovecii* nebo *Histoplasma capsulatum* mají natolik specifické znaky, že je lze mikroskopem přímo identifikovat (Pettigrew et al., 2009).

Vzorky lze různým způsobem upravovat, pro eliminaci zbytků tkání a buněk se užívá 10-30% roztok hydroxidu draselného. U vzorků sputa nebo bronchiálních výplachů lze použít Lugolův roztok (Jílek et al., 2002). Dále lze použít různé metody barvení preparátů, nečastější je dle Grama (výhodné u *Candida* a *Cryptococcus*) nebo Giemsy (*Histoplasma capsulatum*). Náročnější na vybavení je barvení calcofluorem, které dává houbám specifickou flouorescenci (Murray et al., 2009). U histologických preparátů se užívá barvení PAS (periodic acid – Schiff) nebo Gomoriho methenaminové stříbření, které zbarví houbové buňky tmavě hnědě až černě, což je výhodné zejména při detekci malého počtu organismů a zvýraznění charakteristických morfologických vlastností (Murray et al., 2009).

5.3.2. Kultivační metody

Zatím stále považovány za nejcitlivější a při správném provedení i nejprůkaznější metodiku. Jsou kladeny velké nároky na odběr materiálu, aby se předešlo jakékoliv sekundární kontaminaci. Základním růstovým médiem pro mykologickou kultivaci je, s určitými obměnami, Sabouraudův glukózový agar (SGA), pro urychlení růstu může být použit agar obohacený mozkosrdcovým výluhem, tzv. brain-heart infusion (BHI) agar. Některé dimorfní houby jako *Histoplasma capsulatum* nebo *Blastomyces dermatitidis* vyžadují pro optimální růst přídavek 5-10 % krve v BHI (Murray et al., 2009).

Při možnosti kontaminace bakteriemi je výhodné použít specifická média (SGA, BHI) s přidavkem antibiotik (chloramfenikol, kombinace penicilin + streptomycin).

Výsledek by mohl být zkreslen přítomností rychle rostoucích kvasinek a plísní, proto se do médií přidává cykloheximid, který ovšem může inhibovat růst i některých oportunních patogenů (*Candida*, *Aspergillus*). Vždy je proto nutné provádět kultivaci na dvou půdách současně, přičemž jedna je bez přidavku cykloheximidu (Murray et al., 2009).

Většina potenciálně patogenních hub roste při teplotě 25-28°C. Výjimku tvoří kultivace krevních kultur, indukce kvasinkové fáze u dimorfních hub a testování citlivosti na antimykotika (ATM), kdy je přípustné rozmezí teplot 35-37°C. Při podezření na původce systémové mykózy se vždy provádí paralelní kultivace při 37°C. V termostatu je třeba zajistit dostatečnou vlhkost, aby se zabránilo vysychání kultur. Doba kultivace je různá, podle testovaných druhů se liší od 2 dnů až ke 3 týdnům (Jílek et al., 2002).

Kolonie se hodnotí makroskopicky: velikost, tvar, barva, profil, povrch, ohraničení krajů a okolní půdy. Nezbytné je rovněž podrobné mikroskopické vyšetření.

Na pomezí kultivace a mikroskopie je test indukce tvorby klíčnicích hyf, tzv. germ-tube test. Po 2 až 3 hodinách kultivace při 35°C v séru nebo definovaném syntetickém médiu lze pozorovat růst klíčnicích hyf přímo z kvasinkové buňky. Často se používá pro předběžné vyloučení možnosti infekce *Cryptococcus neoformans* nebo pro potvrzení *C. albicans* v nálezu (www.doctorfungus.org).

5.3.3. Biochemické metody

Obměnou klasické kultivace je sledování zdrojů živin, které je kultura schopná využít. K tomuto účelu byla vyvinuta metodika tzv. auxanogramů. Výsledky jsou vyhodnoceny podle klíče, kde jsou zaznamenány charakteristiky jednotlivých kmenů (Fragner, 1992).

- Dusíkové auxanogramy

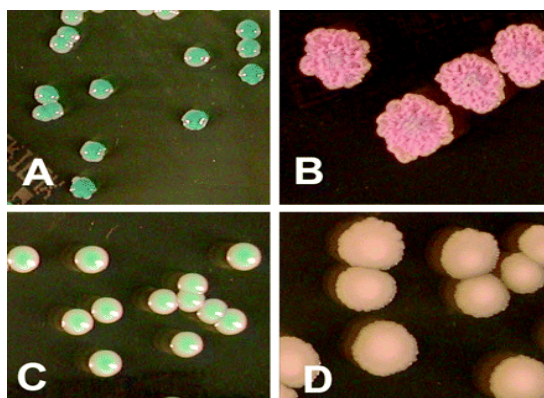
Ukazují, jaký zdroj dusíku kultura asimiluje, standardně se používají půdy s obsahem dusičnanu draselného nebo síranu amonného.

- Cukerné auxanogramy

Po masivním naočkování půdy se na několik míst umístí vzorky cukrů a po inkubaci je hodnocen nárůst v jednotlivých místech, který svědčí o schopnosti asimilace.

Kultivace auxanogramů na agarech je v dnešní době nahrazena komerčně vyráběnými soupravami, které umožňují v jednom cyklu otestovat celou sérii asimilovatelných látek pro daný kmen. Po inkubaci se hodnotí změna barvy v jednotlivých jamkách (např. systém AUXACOLOR[®]) nebo zákal (systém ID32C[®]) (Costa et al., 2009).

Jelikož je stále více druhů kvasinek zahrnováno mezi běžné patogeny, je jejich diagnostice v posledních letech věnována velká pozornost. Identifikace tradičními metodami vyžaduje několik dní a specifická média. Pro rychlé orientační rozlišení byla vyvinuta tzv. chromogenní média, která poskytují kolonie různých barev pro různé testované druhy. To je způsobeno různými, druhově specifickými, enzymy využívajícími chromogenní složky z půdy (Yucesoy a Marol, 2003). Pro ilustraci uvedeny soupravy jako např. CHROMagar Candida[®] (bioMérieux, Francie), CandiSelect[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francie), BiGGY[®] (Oxoid Company, Anglie).



Obrázek 3: Kolonie *Candida albicans* na chromogenním agaru CAID2[®]
A) *C. albicans*; B) *C. tropicalis*; C) *C. dublinensis*; D) *C. krusei*

(zdroj :<http://jcm.asm.org/content/vol44/issue9/images/medium/zjm0090666880001.tif>)

5.3.4. Sérologické metody

Využití nalézají u systémových mykóz vyvolaných dimorfními houbami nebo oportunními patogeny (Jílek et al., 2002). Pokud se provádějí periodicky, dávají

dobrou informaci o progresi onemocnění nebo reakci na terapii. Princip spočívá v detekci specifického antigenu, protilátky nebo metabolitu, jedná se tedy o metody nepřímé. S výjimkou histoplazmózy a kokcidioidózy nemají testy na protilátky dostatečnou citlivost a specifitu (Pettigrew et al., 2009).

Detekce houbových antigenů je poměrně rozšířená a neustále se rozvíjí. Povrch buněčné stěny přichází do styku s hostitelem jako první, proto je detekci jejích komponent věnována pozornost (Tomšíková, 2006).

Nejčastěji vyhledávané struktury buněčné stěny jsou (Kędziarska et al., 2007):

- galaktomannan

Velký význam má v diagnostice infekcí rodem *Aspergillus*, protože je uvolňován během růstu houby ve tkáních. Problémem při diagnostice je jeho velmi variabilní molekulová hmotnost, která se pohybuje od 30 do 100 kDa. Širší zavedení do praxe umožnily metody imunoanalýzy (ELISA) a latex aglutinace (Kędziarska et al., 2007).

- mannan

Jeho sledování se užívá u invazivních infekcí rodem *Candida*, lze jej detekovat 6-7 dní před pozitivní kultivací krevních vzorků (Yera et al., 2001). Používají se jak imunoenzymatické metody (test Platelia *Candida* Ag[®]) tak protilátky proti mannanu. Nevýhodou je snížená citlivost při kandidózách způsobených *C. krusei* a *C. parapsilosis* (Yera et al., 2001).

- (1,3)- β -D-glukan

Patrně nejpoužívanější marker užívaný při diagnostice. Lze jej nalézt u všech druhů patogenních hub vyjma řádu Zygomycetes a rodu *Cryptococcus*. Většina dostupných testů je založena na enzymech z lyzátu amebocytů ostrorepa (*Limulus polyphemus*). Ty obsahují tzv. faktor G (serinová proteáza), který se v přítomnosti (1,3)- β -D-glukanu aktivuje (Obayashi et al., 1995). V Evropě nejpoužívanější souprave Fungitell[®] (Associates of Cape Cod, USA) dochází k odštěpení *p*-nitroanilinu z peptidového substrátu. Změna zbarvení je odečítána kolorimetricky (www.acciusa.com).

Detekce metabolitů nepřináší potřebnou přesnost, ačkoliv byla nalezena spojitost mezi zvýšenými hladinami D-arabinitolu v séru a hematogenní diseminací kandidózy (Murray et al., 2009).

5.3.5. Molekulárně biologické metody

V současnosti se dostávají do popředí diagnostiky, zejména u těch druhů hub, kde je použití kultivačních metod obtížné a sérologické metody poskytují zkřížené imunologické reakce (Tomšíková, 2006).

Využívají detekce nukleových kyselin pomocí sond komplementárních ke specifickým úsekům (hybridizace). Bývají zpravidla značené radionuklidem, enzymem, chemiluminoforem nebo antigenem. Nejvýhodnější jsou oligonukleotidové sondy o délce kratší než 50 nukleotidů. Citlivost neradioaktivních systémů je srovnatelná s radioizotopovými a je výhodnější z hlediska bezpečnosti práce (Tomšíková, 2006).

Pro zvýšení citlivosti se uplatňují metody polymerázové řetězové reakce, která umožňuje namnožit specifickou DNA, která je komplementární k hybridizační sondě a tím zvýšit šanci detekce signálu (Tomšíková, 2006).

Ačkoliv probíhá intenzivní výzkum v oblasti využití molekulárně biologických metod a na trhu se objevuje stále více produktů, pro úspěšné zavedení do klinické praxe chybí standardizace metod a postupů (White et al., 2009).

5.4. Testování antifungální aktivity *in vitro*

V klinické i experimentální praxi má testování aktivity antimykotik svoji nezastupitelnou úlohu a je jisté, že v budoucnu bude na toto odvětví kladen stále větší důraz. Nově objevené mykotické infekce, zvyšující se počet predisponovaných pacientů, vzrůstající rezistence ke stávajícím ATM a zavádění nových látek do klinické praxe, kombinace uvedených faktorů vede k vytvoření jednotných a porovnatelných postupů při metodice. Pro lékaře je výsledek testování, v kombinaci s kvalitní diagnostikou, důležitý pro výběr nejvhodnější látky k terapii, odhadu dávkování a stanovování hladin ATM v tělních tekutinách. Výzkumní pracovníci uvedené metody využívají při vývoji

nových, potencionálně účinných látek, směřování dalšího výzkumu, sledování vývoje rezistence v populaci a stanovení mechanismu jejího vzniku. Požadavky kladené při vývoji na metody jsou: reprodukovatelnost, přesnost a možnost použití v klinických laboratořích (Murray et al., 2009).

Postupy spojené s testováním je nutno co možná nejvíce standardizovat, aby bylo dosaženo srovnatelnosti výsledků mezi jednotlivými laboratořemi, proto byla vytvořena roku 1977 v USA Národní komise pro klinické laboratorní standardy (NCCLS), roku 2005 byla přejmenována na Institut pro klinické a laboratorní standardy (CLSI).

Faktory, které mohou ovlivnit výsledné hodnoty (Jílek et al., 2002):

1) Metoda

- výběr metody, parametr hodnocení, způsob odečtu

Některé látky (např. amfotericin B) poskytují přesně ohraničené hodnoty MIC, jiné (např. azolové deriváty) mají konečné hodnoty rozptýlené a mírný nárůst je pozorovatelný ve všech testovaných koncentracích (Rex et al., 1993). Pro upřesnění hodnocení se užívá stanovení MIC₈₀ a spektrofotometrického odečítání.

2) Testovací systém

- složení média a jeho pH, teplota, doba inkubace, pufr, rozpouštědlo

Jelikož živné médium může interagovat s testovanou látkou, je žádoucí užívat standardní syntetická média (např. RPMI-1640 použité v této práci). V souvislosti s pH média bylo zjištěno, že při nižších hodnotách pH dosahuje většina látek vyšší MIC.

Delší doba inkubace obecně zvyšuje hodnoty MIC a vliv teploty je obtížně předvídatelný (Rex et al., 1993).

3) Testovaný organismus

- velikost inokula, růstová fáze, morfologická forma

Velikost inokula podstatně ovlivňuje hodnoty MIC a obecně je dosahováno konzistentnějších výsledků při použití menších množství (Rex et al., 1993).

Některé druhy vláknitých hub vyžadují, oproti kvasinkám, jinou délku inkubace pro dosažení srovnatelných výsledků. Standardem je testování

dilučními bujonovými metodami, které při dodržení specifik poskytují dobrou korelaci s ostatními metodami (např. E-testem) (Espinel-Ingroff, 2001).

4) Antimykotikum

- rozpustnost, protonizace, stabilita, mechanismus účinku, “eagle efekt“

Jako eagle efekt je označována paradoxní situace, kdy při vyšší koncentraci látky dochází k menší inhibici růstu (Eagle a Musselman, 1948). U antimykotik byl pozorován například u kaspofunginu na *Candida dubliniensis* (Fleischhacker et al., 2008).

Metody lze rozdělit podle typu výsledků (Jílek et al., 2002):

1) Kvalitativní

- rozlišují testované kmeny podle růstu v přítomnosti ATM na citlivé, intermediální a rezistentní

2) Kvantitativní

- výstupem je konkrétní hodnota vyjádřená nejčastěji minimální inhibiční koncentrací (MIC) – nejnižší koncentrace látky, která zastavuje růst testovaného kmene

5.4.1. Agarová difúzní metoda

Využívá difúze látky skrze živné médium.

- Diskový test

Na povrch naočkované agarové půdy se položí disky impregnované ATM. Dochází k jeho difúzi do okolí a vytváří se koncentrační gradient, který brání růstu mikroba. Průměr inhibiční zóny je přímo úměrný citlivosti testovaného kmene, porovnává se s hodnotami referenčních kmenů a podle tabelovaných hodnot se vyhodnocuje. Jedná se o kvalitativní metodu, nedá se z ní tedy zjistit přesná hodnota popisující citlivost kmene. Provedení je jednoduché a lze otestovat citlivost na několik ATM najednou (Jílek et al., 2002).

- E-test

Kvantitativní test na principu gradientové difúze. Na agar se pokládá testovací proužek, na kterém je nanesena účinná látka v postupně se snižující koncentraci po celé délce stupnice. Inhibiční zóna má obvykle oválný tvar a v místě MIC se dotýká proužku. Výhodou je jednoduché a nenáročné provedení, nevýhodou naopak poměrně vysoká cena popř. náročná příprava testovacího proužku (Jílek et al., 2002).

5.4.2. Agarová diluční metoda

Rozpuštěná látka je rozpuštěna přímo v agaru. Petriho misky se naplní agarem s různou koncentrací a na povrch se naočkují testované kmeny. Po inkubaci se odečte nárůst a plotna s nejnižší koncentrací, na které nebyl pozorován růst, odpovídá MIC. U řady látek je tato metoda považována za referenční, protože je přesnější a inhibice růstu se lépe stanovuje. Nevýhodou je její časová a materiálová náročnost (Jílek et al., 2002). V současnosti je její využití omezené na experimentální účely.

5.4.3. Diluční bujónové testy

Patří mezi nepoužívanější metody kvantitativního stanovování citlivosti. Testované látky se naředí do určitých koncentrací ve vhodném médiu (u ATM se nejčastěji používá RPMI) a poté se rozplňují, podle typu metody, do zkumavek nebo jamek v mikrotitrační destičce. Médium se poté inokuluje suspenzemi testovaných kmenů a dá se inkubovat. První jamka nebo zkumavka, ve které po inkubaci není pozorovaný růst, udává MIC.

- zkumavková (makrodiluční) metoda

Větší objem zkumavek dává vyšší stupeň přesnosti a reprodukovatelnosti. Lze ji i využít pro testování kombinací látek. Je možné kontinuálně hodnotit zákal nebo optickou denzitu a tak získat informace o kinetice antimikrobního působení. Na druhou stranu je u této metody vyšší spotřeba materiálu, tzn. vyšší náklady a také je obtížné rutinně testovat větší počet kmenů (Jílek et al., 2002).

- destičková (mikrodiluční) metoda

Malé rozměry snižují náklady na materiál a přípravu destiček díky možnosti využití vícekanálových pipet. Lze ji použít pro testování rozsáhlejších souborů kmenů a při dodržení postupu je zaručena vysoká standardnost provedení. Destičky lze připravit předem a až 4 týdny uchovávat ve zmraženém stavu. Testování ve větších souborech na destičkách má nevýhodu v případě chyby při přípravě ředící řady nebo testovací půdy, kdy je znehodnocen celý soubor (Jílek et al., 2002). Přesný postup provedení metody, včetně přípravy ředící řady testovaných látek, je popsán v praktické části.

Mikrodiluční bujónová metoda je jednou ze standardních metod ustanovených CLSI pro testování aktivity ATM. Ten od roku 1996 vydává doporučení, která mají sjednotit metodiku provádění zkoušek a umožnit porovnatelnost výsledků mezi jednotlivými pracovišti. Zahrnut je i používaný materiál a živné půdy. Z hlediska provedení je nejdůležitější a nejobtížnější částí příprava inokula a vyhodnocování výsledků. V současnosti používaná metodika je platná od roku 2008. Pro kvasinky (označení metody M27-A3) a vláknité houby (M38-A2) existují rozdílná kritéria pro interpretaci. Problémem při testování plísní je obtížné získávání standardního inokula, pomalý růst a nezřetelná hranice účinku ATM.

Nárůst v jamkách se porovnává s kontrolou, ve které není přítomné ATM. Každé jamce je přiřazeno skóre od 1 do 4, podle míry zákalu, což usnadňuje odečítání v případě málo zřetelné hranice, což je problém zejména u azolových derivátů a 5-fluorocytosinu, kdy je mírný nárůst pozorovatelný téměř ve všech koncentracích. V komerčních soupravách jsou použity kolorimetrické indikátory, které změnou barvy označují jamky s nárůstem kmenů. Nejnižší koncentrace, ve které již nebyl pozorován růst, je označena jako MIC (www.mycology.adelaide.edu.au).

5.5. Farmakoterapie mykotických infekcí

V posledních letech zaznamenala antifungální terapie velký pokrok. Do praxe byly zavedeny nové, systémově účinné látky a nové formulace stávajících, které přinášejí srovnatelnou účinnost s významně nižší toxicitou (Murray et al., 2009).

K léčení kožních a slizničních mykóz často postačuje lokální aplikace. Nové látky mají poměrně dobrou snášenlivost a umožňují i systémové podávání. Při mykotické sepsi nebo napadení vnitřních orgánů je nezbytná celková, systémová terapie (Lüllmann et al., 2004).

Rozdělení antimykotik podle mechanismu účinku (Lüllmann et al., 2004):

- polyenová antibiotika
Vytvářejí hydrofilní póry v plazmatické membráně.
- azolová antimykotika, alylaminy, morfoliny
Inhibují na různých stupních syntézu ergosterolu.
- echinokandiny
Inhibují syntézu (1,3)- β -D-glukanu buněčné stěny hub.
- flucytosin, griseofulvin
Zasahují do funkcí buněčného jádra.

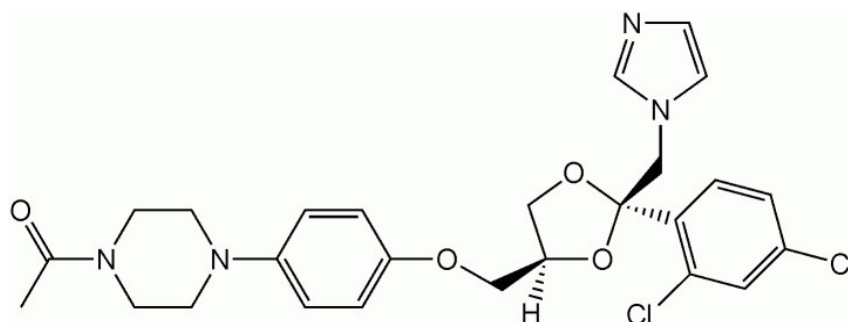
5.5.1. Polyenová antibiotika

Společně s ergosterolem se zabudují do plazmatické membrány tak, že vzniká hydrofilní pór. Ten vede k narušení osmotické integrity buňky, úniku intracelulární tekutiny a jejímu zániku (Murray et al., 2009).

- Amfotericin B
Izolován ze *Streptomyces nodosus*. Podává se nejčastěji systémově. Je špatně rozpustný ve vodě a perorálně se nevstřebává, proto je nutné jej podávat intravenózně ve formě deoxycholátu. Bývá poměrně dobře distribuován do většiny tkání a orgánů, včetně jater, sleziny, ledvin a plic (Murray et al., 2009). Při terapii infekcí CNS se používají injekce přímo do cerebrospinálního prostoru (Lüllmann et al., 2004).

- ketokonazol

Původně byl zamýšlen pro perorální užití. Díky svojí lipofilitě dobře proniká do tkání a hnisavých exsudátů. Silně se váže na plazmatické proteiny, takže špatně proniká do CNS. Spektrum účinku zahrnuje dimorfní houby, kandidy, *C. neoformans* a rod *Malassezia* (Murray et al., 2009).



Obrázek 5: Ketokonazol

Při delším užívání se u některých pacientů vyskytly těžké poruchy jater. Vysoké dávky snižují syntézu steroidních hormonů. Má velký potenciál pro interakci s léčivy, neboť inhibuje cytochrom P450 dependentní monooxygenázu, což vede ke změnám biotransformace např. midazolamu, triazolamu nebo cyklosporinu A. S nástupem lépe snášených triazolových derivátů bylo jeho hlavní použití změněno na lokální terapii dermatitid (Lüllmann et al., 2004).

- klotrimazol, mikonazol, oxikonazol, ekonazol

Systémové užití je obsolentní, v současnosti se užívají pouze topicky.

5.5.2.2. Deriváty triazolu

Díky jejich dobré snášenlivosti, širokému spektru a dostatečné resorpci jsou vhodné pro perorální systémovou terapii.

- flukonazol

Ve struktuře má obsaženou hydroxyskupinu, což zlepšuje jeho rozpustnost ve vodě a umožňuje i intravenózní podání. Dobrá biologická dostupnost zaručuje rovnoměrné rozdělení do všech kompartmentů organismu včetně CNS (Lüllmann et al., 2004).

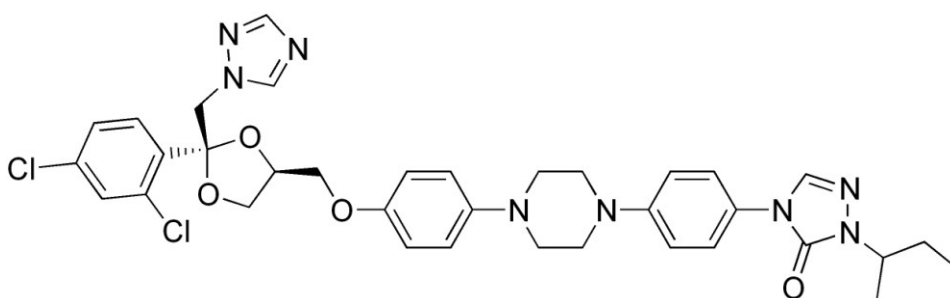
Účinek je fungistatický na většinu zástupců rodů *Candida* (vyjma rezistentní *C. krusei*), *Trichosporon*, dermatofyty, *Coccidioides immitis* a

Paracoccidioides brasiliensis. U *C. glabrata* je pozorována variabilní citlivost, která bývá často snižena. Dávkování je třeba, po předchozím ověření testem, výrazně zvýšit (Pfaller a Diekema, 2004). Flukonazol není vhodný proti oportunním plísním rodů *Aspergillus*, *Fusarium* a zygomycetám.

Díky svým vlastnostem je látkou první volby při lokálních i systémových kandidózách a při profylaxi u pacientů s vysokým rizikem mykotické infekce (Murray et al., 2009). Právě u *C. glabrata* však může tento přístup vést k rozvoji rezistence (Mann et al., 2009).

- itraconazol

Vyšší lipofilita způsobuje větší kumulaci v tkáních a delší poločas (cca 30 hodin). Perorální absorpce je proměnlivá a závisí na příjmu potravy (Lüllmann et al., 2004).



Obrázek 6: Itraconazol

Spektrum účinnosti zahrnuje kandidy (včetně flukonazol rezistentních), aspergily, *Sporothrix schenckii* a endemické dimorfní houby. Rezistentní je rod *Fusarium* a zygomycety. Vzácně bývá zachycen itraconazol rezistentní *Aspergillus fumigatus*. Je lékem volby u invazivních aspergilóz, lymfokutánní sporotrichózy a život neohrožujících primárních mykózách (Murray et al., 2009).

Účastní se lékových interakcí inhibicí cytochromu-P450 3A. Při déletrvajících terapii se zvyšuje četnost gastrointestinálních poruch (Lüllmann et al., 2004).

- vorikonazol

Novější triazolový derivát s širokým spektrem, který lze podávat perorálně i intravenózně. Velmi dobře proniká do CNS a ostatních tkání.

Fungistaticky působí na kvasinky, včetně kmenů málo citlivých k flukonazolu a fungicidně na aspergily. Ačkoliv proti zygomycetám nevykazuje žádnou aktivitu, je efektivní proti kmenům rezistentním k amfotericinu B.

Primární indikací vorikonazolu je invazivní aspergilóza, ale účinný je i proti infekcím způsobeným *Pseudallescheria boydii* a různým formám kandidózy.

Bývá dobře tolerován, ačkoliv u jedné třetiny pacientů se vyskytují poruchy vizu, méně často zmatenost a halucinace (Murray et al., 2009).

- posakonazol

Podobně jako vorikonazol patří mezi novější triazoly. Spektrum účinku je velmi podobné, nicméně spolu s ravukonazolem vykazuje *in vitro* větší aktivitu proti rodu *Rhizopus*. I posakonazol má zachovanou výbornou účinnost na aspergily (Diekema et al., 2003).

- ravukonazol

Podobně jako vorikonazol vykazuje dobrou účinnost proti *C. glabrata* a dalším flukonazol rezistentním kandidám (Pfaller et al., 2002).

5.5.3. Alylaminy

Inhibují enzym skvalenepoxidázu, která je jedním z prvních kroků syntézy ergosterolu (Lüllmann et al., 2004).

- terbinafin

Svojí lipofilitou dosahuje vysokých koncentrací ve vlasech, nehtech a kůži. Používá se k terapii dermatofytóz včetně onychomykózy a to jak topicky, tak i perorálně. V kombinaci s flukonazolem je možné jej použít i u flukonazol-rezistentních kandid (Murray et al., 2009).

- naftifin

Topicky používaný derivát alylaminu s širokým antimykotickým spektrem a antiflogistickými účinky (Lüllmann et al., 2004).

5.5.4. Morfoliny

Inhibují demetyl-lanosterol reduktázu, která je v kaskádě systézy ergosterolu na dalším stupni za místem účinku azolů.

V současnosti je jediným používaným derivátem amorolfin, užívaný ve formě laku na nehty při onychomykózách (Lüllmann et al., 2004).

5.5.5. Echinokandiny

Mechanismus účinku je inhibice enzymu (1,3)- β -D-glukan syntázy. Ten je důležitou součástí buněčné stěny a význam má i pro buněčný růst a dělení. Protože buňky savců jej neobsahují, je účinek echinokandinů vysoce selektivní, což zároveň omezuje jeho spektrum na ty druhy, u kterých tvoří hlavní složku buněčné stěny (tj. rody *Candida* a *Aspergillus*).

- kaspofungin, anidulafungin, mikafungin

Všechny tři se podávají intravenózně a dobře se distribuují do všech hlavních orgánů, vyjma CNS. Jsou velmi dobře tolerovány bez významných lékových interakcí. Využití našly v terapii invazivních forem kandidózy a aspergilózy (kaspofungin) u kterých není tolerována jiná léčba nebo došlo k jejímu selhání (Murray et al., 2009).

5.5.6. Antimetabolity

Nejvýznamnější zástupce, flucytosin, je pomocí enzymu cytosindeaminázy přeměňován na aktivní metabolit 5-fluorouracil, který kompeticí s tymidinem inhibuje syntézu RNA. Tato transformace probíhá především u kvasinek.

Po perorálním užití se dobře resorbuje a distribuuje do tkání. U akutních infekcí lze podat i intravenózní infuzi. V terapii těžkých infekcí, vyvolaných *C. neoformans* a kandidami, se osvědčilo použití nižších dávek v kombinaci s amfotericinem B, který pravděpodobně zvyšuje permeabilitu plazmatické membrány a usnadňuje průnik flucytosinu (Lüllmann et al., 2004).

6. Experimentální část

6.1. Materiál

1) Pomůcky

- automatické pipety, mikrotitrační destičky, 12ti jamkové rezervoáry na média, Bürkerovy komůrky, očkovací klíčky, pipetovací špičky, zkumavky

2) Přístroje

- laminární box, vortex, denzitometr, termostat, mikroskop

3) Chemikálie

- 3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina (MOPS), dimethylsulfoxid (DMSO), glukóza, NaOH, sterilní voda

4) Růstová média

- RPMI 1640 (úplné složení viz Tabulka 1), Sabouraudův agar

Tabulka 1: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného
(obsah v gramech na 1000ml média)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L- prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L-serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný dihydrát	5,015	L- treonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L- tyrosin	0,1
Chlorid sodný	30,0	L - tryptofan	
L- arginin hydrochlorid	1,21	L- valin	0,1
L- asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L- cystin	0,25	Kyanokobalamin	0,000025
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	K. p-aminobenzoová	0,005
L- hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L- isoleucin	0,25	D – Ca- Pantothenát	0,00235
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L- leucin	0,25	Thiamin hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L- methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L- phenylalanin	0,075		

6.2. Testované kmeny kvasinek a hub

- *Candida albicans* (CA) ATCC 44859
- *Candida tropicalis* (CT) 156
- *Candida krusei* (CK) E28
- *Candida glabrata* (CK) 20/I
- *Trichosporon beigeli* (TB) 1188
- *Aspergillus fumigatus* (AF) 231
- *Absidia corymbifera* (AC) 272
- *Trichophyton mentagrophytes* (TM) 445

6.3. Testované látky

Použité vzorky byly předem nasyntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Testováno bylo celkem 43 látek, které jsou rozděleny na základě společných strukturních znaků do devíti skupin.

Deriváty:

1. pyrazin-2-karboxylové kyseliny
2. 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny
3. 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu
4. pyrazin-2-karboxamidu
5. pyrazin-2,5-dikarbonitrilu
6. 6-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu
7. 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu
8. 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu
9. 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu

6.4. Metodika

K testování byla použita metodika vycházející z doporučených postupů CLSI pro *in vitro* testování citlivosti na antimykotika.

6.4.1. Příprava suspenzí testovaných kmenů

1. Do každé z 8 sterilních zkumavek jsme napipetovali 3 ml sterilní vody. Z kultur narostlých na Sabouraudově glukózovém agaru jsme odebrali část kolonie a pomocí vortexu resuspendovali v příslušné zkumavce, přesně označené typem kmenu.
2. Z každé zkumavky jsme odebrali 12 μ ml pro stanovení hustoty suspenze Bürkerovou komůrkou. Optimální hustota je v rozmezí $1,0-2,5 \times 10^5$ CFU/ml.
3. Při dodržení postupu přípravy je možné inokula použít po dobu 14 dní, jsou-li uchovávána při teplotě 2-8°C.

6.4.2. Příprava růstového média

1. Ke 4 dílům MOPS s 1 % glukózy jsme přidali 1 díl RPMI 1640, konečný objem a přesná množství se odvíjí od předpokládané spotřeby.
2. Úpravy pH na hodnotu 6,5 - 7,9 bylo dosaženo přidáním několika kapek NaOH. Roztok změnil barvu ze žluté na červeno oranžovou.

6.4.3. Příprava ředící řady testované látky

1. Navážku látky jsme rozpustili v příslušném objemu DMSO (vzorec pro výpočet viz níže) tak, aby první testovaná koncentrace byla $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1%. Údaje o navážce a molekulové hmotnosti byly dodány spolu s testovanou látkou.
2. V případě, že se látka nerozpustila nebo nevznikla homogenní suspenze, přidali jsme 2.ekvivalent rozpouštědla. Ředící řada se tímto posunula o jedno místo dozadu. Pokud nedošlo k rozpuštění ani po přidání 3. ekvivalentu, byla látka z testování vyřazena.
3. Pro zjištění rozpustnosti zkoušené látky v růstovém médiu jsme do sterilní zkumavky č.1 napipetovali 1,98 ml RPMI a 20 μ ml roztoku této

látky. V případě, že nedošlo k vytvoření sraženiny nebo vznikla homogenní suspenze, jsme pracovní roztok sterilně přemístili do jamky č.1 12ti kanálového rezervoáru. Pokud došlo k vytvoření sraženiny, byl přidán 2. případně 3. ekvivalent růstového média. Opět došlo k posunutí první testované koncentrace dozadu.

4. Do sterilních zkumavek 2-12 jsme připravili dvojkovou ředící řadu: do každé zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml DMSO, do zkumavky č.2 jsme přenesli 0,5 ml roztoku testované látky, po dostatečném promíchání jsme odebrali 0,5 ml tohoto roztoku a přenesli do zkumavky č.3, takto se pokračovalo až do zkumavky č.11.
5. Do každé z jamek 12ti jamkového rezervoáru jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a 20 µl naředěného roztoku zkoušené látky z příslušné zkumavky. Do jamky č.12, která slouží jako kontrola, jsme přidali pouze 20 µl DMSO.

6.4.4. Vzorec pro výpočet objemu DMSO

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \cdot 10\,000\,000 \text{ (převod na } \mu\text{l)}}{c \cdot M \cdot 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \mu\text{l DMSO}$$

m...navážka (g)

c...první testovaná koncentrace = 500 µmol.l⁻¹

M...molární hmotnost

6.4.5. Příprava mikrotitrační destičky

1. Pomocí 12ti kanálové pipety jsme přenesli z rezervoáru 200 µl zásobního roztoku do 7 řádků na první destičce a do tolika řádků na druhé destičce, kolik jsme měli testovaných látek.
2. Do příslušných řádků první destičky jsme napipetovali 10 µl připravených suspenzí jednotlivých kmenů. Do všech jamek druhé destičky jsme pipetovali pouze kmen TM.
3. Destičky jsme přiklopili víčkem a inkubovali v termostatu při 35 °C: první destičku 48 hodin (odečet MIC po 24 a 48 hodinách), druhou destičku s TM 120 hodin (odečet MIC po 72 a 120 hodinách).

6.4.6. Vyhodnocení

1. Po uplynutí předepsané doby jsme porovnali narůst kolonií v jamkách s kontrolou. Minimální koncentrace, inhibující růst kvasinek, odpovídala alespoň 80% potlačení růstu kolonií oproti kontrole (MIC = IC₈₀). Pro vláknité houby byla hodnota MIC stanovena jako 50% potlačení růstu (MIC = IC₅₀).

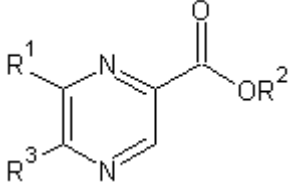
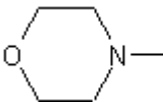
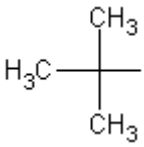
6.5. Výsledky

Zkoušené látky byly naředěny do koncentrací 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Odečtené hodnoty MIC jsou vyznačeny tučně.

Pro kvantifikaci účinku každé testované látky na příslušný kmen bylo pro každou hodnotu MIC přiřazeno bodové hodnocení podle klíče: 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ = 1 bod, 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ = 2 body, atd. až po 0,488 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ = 11 bodů. Tím je brán v potaz jak počet aktivních látek, tak i dosažené hodnoty MIC. Bodové hodnocení pro každou testovanou skupinu látek je ve sloupci "Součet" v každé výsledkové tabulce.

6.5.1. Deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 2: Strukturní vzorce derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

				
Kód látky	R ¹	R ²	R ³	m. h.
MD 611	Cl	C ₄ H ₉	H	214,65
MD615		H		265,31

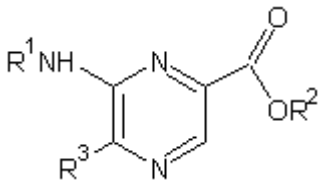
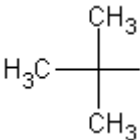
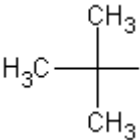
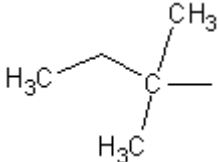
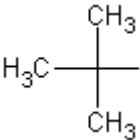
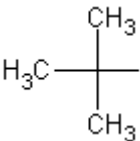
Tabulka 3: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										Součet	
	MD611	MD615										
CA	24h	250	>500									2
	48h	>500	>500									
CT	24h	>500	>500									
	48h	>500	>500									
CK	24h	>500	>500									
	48h	>500	>500									
CG	24h	>500	>500									
	48h	>500	>500									
TB	24h	500	250									3
	48h	>500	500									1
AF	24h	>500	>500									
	48h	>500	>500									
AC	24h	>500	>500									
	48h	>500	>500									
TM	72h	500	>500									1
	120h	500	>500									1

Obě testované látky měly jen slabý účinek. MD611 inhibovala růst TM po 120 hodinách a MD615 se ukázala být slabě účinnou u TB.

6.5.2. Deriváty 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 4: Strukturní vzorce derivátů 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny

				
Kód látky	R ¹	R ²	R ³	m. h.
MD 609	C ₄ H ₉	H	H	195,22
MD 610	C ₄ H ₉	H		251,32
MD 612	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	H	251,32
MD 613	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	H	279,38
MD 614	C ₄ H ₉	C ₇ H ₁₅	H	293,40
MD 616	C ₈ H ₁₇	H		307,43
MD 617		H		265,35
MD 618	C ₅ H ₁₁	H		256,35

Tabulka 5: Výsledky testování derivátů 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)									Součet
		MD609	MD610	MD612	MD613	MD614	MD616	MD617	MD618		
CA	24h	>500	>500	250	62,5	500	500	>500	>500		8
	48h	>500	>500	>500	125	500	>500	>500	>500		4
CT	24h	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500		2
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
CK	24h	>500	500	>500	>500	500	>500	>500	>500		2
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
TB	24h	500	500	500	500	500	500	>500	>500		6
	48h	500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500		3
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
AC	24h	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500		1
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500		
TM	72h	>500	250	>500	>500	500	>500	>500	>500		3
	120h	>500	250	>500	>500	500	>500	>500	>500		3

Z testované skupiny vybočuje pouze látka MD613, která u CA po 24 hodinách dosáhla MIC 62,5 μmol.l⁻¹ a po 48 hodinách 125 μmol.l⁻¹. MD610 dosáhla u TM 250 μmol.l⁻¹ i po 120 hodinách. Jako nejméně citlivé se ukázaly kmeny CG a AF na které nepůsobila ani jedna látka z testované skupiny.

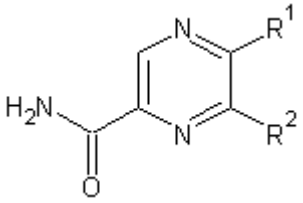
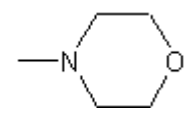
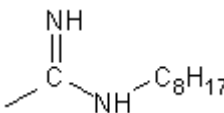
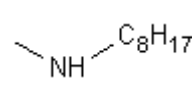
Tabulka 7: Výsledky testování derivátů 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										
		JZ-13	JZ-20	JZ-21	JZ-22	JZ-23	JZ-16				Součet
CA	24h	>125	250	>125	>500	>250	>125				2
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
CT	24h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
CK	24h	>125	62,5	>125	>500	>250	>125				4
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
CG	24h	>125	250	>125	>500	>250	>125				2
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
TB	24h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
AF	24h	>125	250	>125	>500	>250	>125				2
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
AC	24h	>125	125	>125	>500	>250	>125				3
	48h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
TM	72h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				
	120h	>125	>250	>125	>500	>250	>125				

Látky JZ-21 a JZ-16 se vysrážely v RPMI a byly tedy testovány jen v menším počtu koncentrací: 125 μmol.l⁻¹ a pět následujících. Pouze JZ-20 vykázala po 24 hodinách aktivitu na všechny kmeny vyjma CT a TM, kterou se po 48 hodinové inkubaci nepodařilo udržet.

6.5.4. Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

Tabulka 8: Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

			
Kód látky	R ¹	R ²	m. h.
JZ-0	CN	Cl	182,57
JZ-24	CN		233,23
JZ-27			404,59

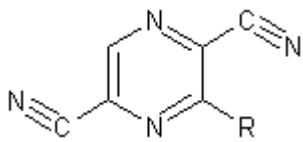
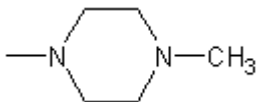
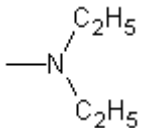
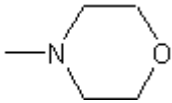
Tabulka 9: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										Součet
	JZ-0	JZ-24	JZ-27								
CA	24h	125	>500	>125							3
	48h	125	>500	>125							3
CT	24h	>500	>500	>125							
	48h	>500	>500	>125							
CK	24h	>500	>500	>125							
	48h	>500	>500	>125							
CG	24h	>500	>500	>125							
	48h	>500	>500	>125							
TB	24h	>500	>500	>125							
	48h	>500	>500	>125							
AF	24h	>500	>500	>125							
	48h	>500	>500	>125							
AC	24h	250	>500	>125							2
	48h	250	>500	>125							2
TM	72h	62,5	>500	>125							4
	120h	62,5	>500	>125							4

Aktivitu ukázala pouze látka JZ-0, která měla u TM po 120 hodinách MIC 62,5 μmol.l⁻¹ a u CA po 24 hodinách 125 μmol.l⁻¹. Zbytek skupiny byl neúčinný.

6.5.5. Deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 10: Strukturní vzorce derivátů pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

		
Kód látky	R	m. h.
JZ-19	Cl	164,55
JZ-L7		228,28
JZ-L12		201,23
JZ-L13		215,21

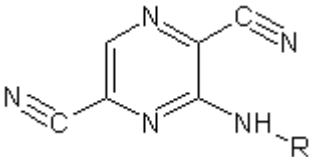
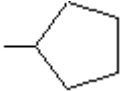
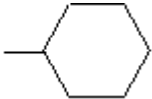
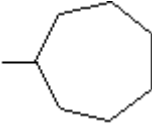
Tabulka 11: Výsledky testování derivátů pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										
	JZ-19	JZ-L7	JZ-L12	JZ-L13							Součet
CA	24h	7,81	>500	250	>500						9
	48h	31,25	>500	500	>500						6
CT	24h	31,25	>500	125	>500						8
	48h	125	>500	500	>500						4
CK	24h	7,81	>500	250	>500						9
	48h	31,25	>500	250	>500						7
CG	24h	15,62	>500	62,5	>500						10
	48h	31,25	>500	500	>500						6
TB	24h	15,62	>500	125	>500						9
	48h	31,25	>500	500	>500						6
AF	24h	15,62	>500	250	>500						8
	48h	31,25	>500	500	>500						6
AC	24h	31,25	>500	250	>500						7
	48h	125	>500	500	>500						4
TM	72h	31,25	>500	125	>500						8
	120h	31,25	>500	125	>500						8

Látky JZ-19 a JZ-L12 byly účinné na všechny testované kmeny. JZ-19 dosáhla po 48, resp. 120 hodinách, hodnot 31,25 μmol.l⁻¹, kromě CT a AC, u kterých MIC činila 125 μmol.l⁻¹. U JZ-L12 se MIC pohybovala v rozmezí 500 až 125 μmol.l⁻¹.

6.5.6. Deriváty 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 12: Strukturní vzorce derivátů 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu

		
Kód látky	R	m. h.
JZ-L14	CH ₃	159,15
JZ-L11	C ₂ H ₅	173,17
JZ-L8	C ₃ H ₇	187,20
JZ-L9	C ₄ H ₉	201,23
JZ-10	C ₅ H ₁₁	215,25
JZ-L6		213,24
JZ-L1	C ₆ H ₁₃	229,28
JZ-L2		227,27
JZ-L3	C ₇ H ₁₅	243,31
JZ-L4		241,29
JZ-L5	C ₈ H ₁₇	257,33

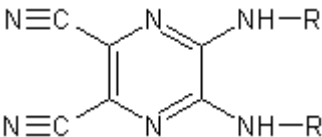
Tabulka 13: Výsledky testování derivátů 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)												
	JZ-L14	JZ-L11	JZ-L8	JZ-L9	JZ-L10	JZ-L6	JZ-L1	JZ-L2	JZ-L3	JZ-L4	JZ-L5	S	
CA	24h	>500	>500	>500	500	500	>500	125	>250	>500	>500	>500	5
	48h	>500	>500	>500	500	500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	2
CT	24h	>500	>500	>500	250	500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	3
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
CK	24h	>500	>500	>500	500	500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	2
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
CG	24h	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	1
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
TB	24h	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	1
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>500	
TM	72h	>500	250	250	500	>500	>500	>500	>250	3,9	>500	>500	13
	120h	>500	250	250	500	>500	>500	>500	>250	7,81	>500	>500	12

V této skupině lze sledovat postupné prodlužování řetězce substituovaného na aminoskupině v poloze 3 pyrazinového jádra. Látky JZ-L11, L8 a L9 ukázaly slabý účinek na TM. JZ-L9 navíc, spolu s JZ-L10, na CA. Zajímavá je aktivita látky JZ-L3 substituované heptylem, která dosáhla MIC 7,81 μmol.l⁻¹ u kmene TM.

6.5.7. Deriváty 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Tabulka 14: Deriváty 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu

		
Kód látky	R	m. h.
ZIP-128	C ₇ H ₁₅	356,52
ZIP-136	C ₅ H ₁₁	300,41

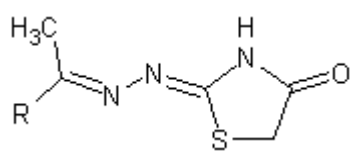
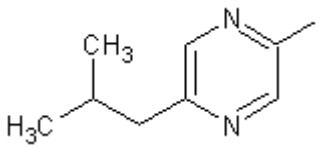
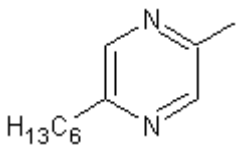
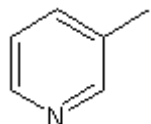
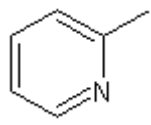
Tabulka 15: Výsledky testování derivátů 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										
	ZIP-128	ZIP-136									Součet
CA	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
CT	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
CK	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
CG	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
TB	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
AF	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
AC	24h	>500	>125								
	48h	>500	>125								
TM	72h	>500	>125								
	120h	>500	>125								

Z této skupiny látek neukázala ani jedna pozorovatelný účinek.

6.5.8. Der. 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 16: *Strukturní vzorce derivátů 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu*

		
Kód látky	R	m. h.
KTM-2		291,37
KTM-14		319,43
KTM3AP		234,28
KTM2AP		234,28

Tabulka 17: Výsledky testování derivátů 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu

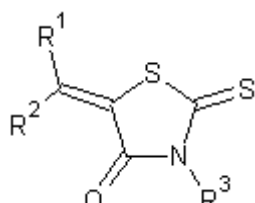
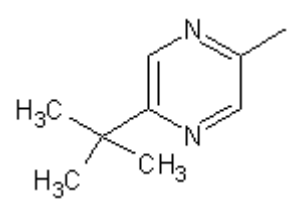
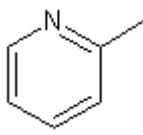
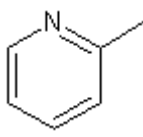
KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)								Součet
		KTM-2	KTM-14	KTM3AP	KTM2AP					
CA	24h	15,62	31,25	>500	7,81					18
	48h	31,25	31,25	>500	7,81					17
CT	24h	>125	>125	>500	7,81					7
	48h	>125	>125	>500	15,62					6
CK	24h	>125	>125	>500	1,95					9
	48h	>125	>125	>500	15,62					6
CG	24h	7,81	3,9	>500	0,98					25
	48h	7,81	3,9	>500	0,98					25
TB	24h	7,81	7,81	>500	3,9					22
	48h	7,81	7,81	>500	7,81					21
AF	24h	>125	125	>500	31,25					8
	48h	>125	>125	>500	31,25					5
AC	24h	31,25	125	>500	15,62					14
	48h	31,25	125	>500	31,25					13
TM	72h	31,25	>125	>500	7,81					12
	120h	31,25	>125	>500	7,81					12

Ze všech testovaných skupin, obsahuje nejvíce aktivních látek. Látky KTM-2 a 14 se vysrážely v RPMI a byly tak zkoušeny pouze ve zkráceném rozsahu koncentrací. Obě mají podobné spektrum a účinnost. Nejnižší naměřená MIC činila 3,9 μmol.l⁻¹ KTM-14 je účinnější proti CG a KTM-2 proti AC a TM.

Nejúspěšnější látkou z celého testovaného souboru je KTM2AP která u všech testovaných kmenů dosahovala velmi nízké MIC v rozmezí od 0,98 μmol.l⁻¹ pro CG až po 31,25 μmol.l⁻¹ pro AF a AC.

6.5.9. Deriváty 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 18: Strukturní vzorce derivátů 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu

				
Kód látky	R ¹	R ²	R ³	m. h.
HP-1A	CH ₃		NH ₂	308,42
HP2APA	CH ₃		NH ₂	251,33
EDGA3	H		-CH ₂ -COOH	280,32

Tabulka 19: Výsledky testování derivátů 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₈₀ /IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)										
		HP-1A	HP2APA	EDGAR3							Součet
CA	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
CT	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
CK	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
CG	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
TB	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
AF	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
AC	24h	>125	>125	>500							
	48h	>125	>125	>500							
TM	72h	>125	125	>500							3
	120h	>125	125	>500							3

Z této skupiny nebyla u žádné z látek pozorována aktivita s výjimkou HP2APA, která zastavila růst TM při koncentraci 125 μmol.l⁻¹.

7. Diskuze

Problémem testování citlivosti k antimykotikům je velké množství faktorů, které mohou ovlivnit výsledek. Jedná se o růstová média, hustotu a množství inokula, použité kmeny mikromycet, fyzikální vlastnosti testované látky podmínky inkubace (Buchta et al., 1998). Při vývoji metodiky je tedy nutné eliminovat co možná největší počet proměnných vytvořením standardních postupů a podmínek.

Předpokladem každé používané metody je její opakovatelnost a porovnatelnost výsledků mezi jednotlivými pracovišti. V případě testování citlivosti mikromycet k antimykotikům lze použít několik metod, kterým byla celosvětově věnována dostatečná pozornost a existují mezinárodně uznávané standardní postupy jejich provádění a interpretace výsledků. Jednou z nich je i mikrodiluční bujónová metoda, která byla použita v této práci. Právě vysoká míra reprodukovatelnosti a relativně nízká materiálová náročnost byly důvodem pro její zvolení.

CLSI (dříve NCCLS) v roce 1997 schválila způsob testování citlivosti kvasinek k ATM v dokumentu M27-A (od roku 2008 platí verze M27-A3) a později i dokument M38-A (od 2008 M38-A2) pro vláknité houby. V Evropě se návrhy metodiky zabývá společnost EUCAST AFST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti, Podkomise pro antifungální látky), která v roce 2002 vypracovala vlastní postupy pro testování kvasinek a vláknitých hub, které se liší přípravou média, inokula, dobou inkubace a způsobem interpretace (Mallátová, 2007).

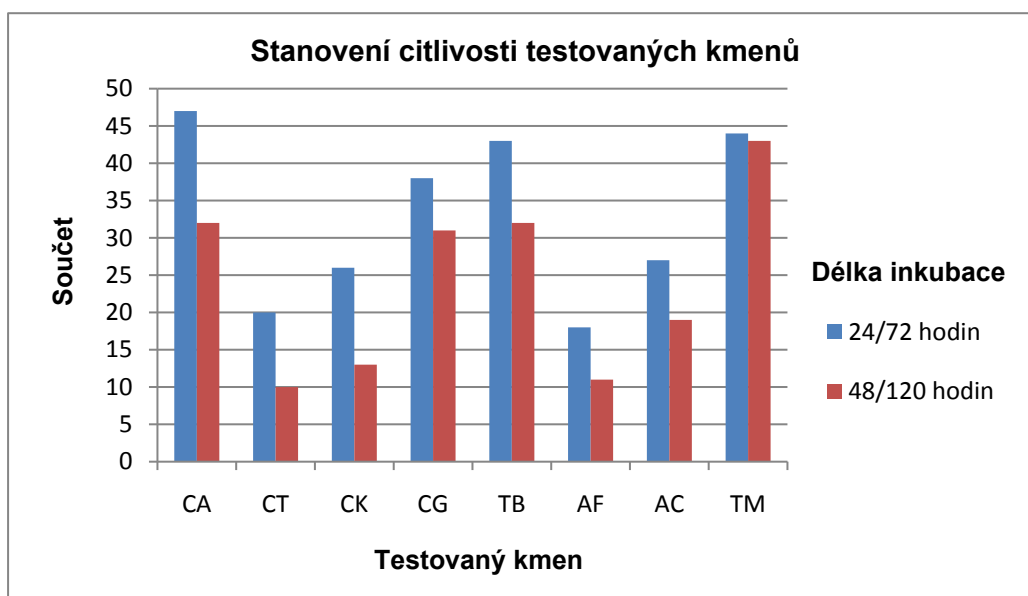
Metodika použitá v této práci se blíží spíše postupu stanovenému EUCAST (dokument Edef 7.1). Jako růstové médium je použito RPMI 1640 s glutaminem obohacené o 1 % glukózy. Hustota inokula je v rozmezí $1,0-2,5 \times 10^5$ CFU/ml, očkuje se do mikrotitračních destiček s plochým dnem a výsledky jsou odečítány vizuálně.

Tabulka 20: Rozdělení zjištěných hodnot MIC do skupin a přiřazení bodového hodnocení

MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	500	250	125	62, 5	31,25	15,625	7,813	3,906	1,953	0,977	0,488
Body	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Slabě účinné			Středně účinné				Silně účinné			

Celkem byla testována aktivita 43 látek na 8 kmenů kvasinek a vláknitých hub. Při zpracovávání výsledků bylo, pro větší přehlednost, každé dosažené hodnotě MIC přiřazeno bodové hodnocení. Při stanovení citlivosti jednotlivých kmenů k testovaným látkám tak mohl být zohledněn jak počet účinných látek, tak i skutečně dosažené hodnoty MIC. Body byly zvlášť sečteny pro každý kmen a dobu inkubace. Jako nejcitlivější kmen se ukázal, po 24 (resp. 72 pro TM) hodinách inkubace, *Candida albicans*. Nicméně díky poklesu aktivity látek s rostoucí dobou kultivace byl ve výsledku, po 120 hodinách, nejcitlivější kmen *Trichophyton mentagrophytes*. Jako nejvíce rezistentní po 24 hodinách se ukázal *Aspergillus fumigatus*, ale po 48 byla aktivita nejnižší u *Candida tropicalis*.

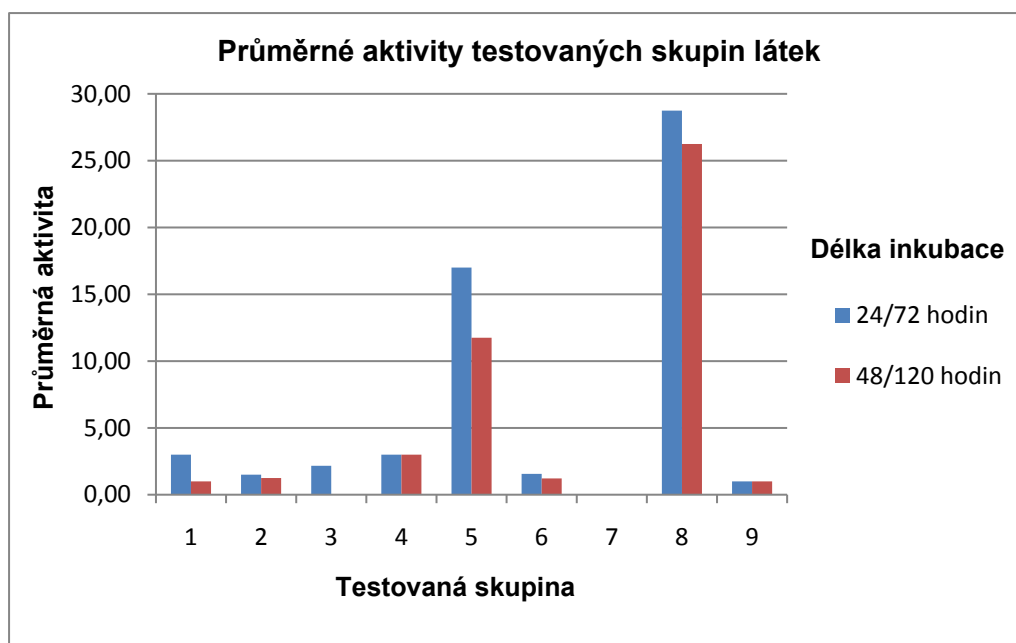
Obecně je pokles aktivity s prodlužováním délky inkubace výraznější u kandid, např. u *C. tropicalis* došlo k 50% snížení, naopak u *T. mentagrophytes* poklesla aktivita minimálně.



Obrázek 7: Stanovení citlivosti testovaných kmenů

Bodového hodnocení bylo využito i při hodnocení aktivity jednotlivých skupin testovaných látek. Součet bodů pro každou skupinu byl vydělen počtem látek. Výsledná "průměrná aktivita" byla potom porovnávána.

Největší účinnost na testované kmény ukázala skupina **8**, tzn. deriváty 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu.



Obrázek 8: Průměrné aktivity testovaných skupin látek

Skupina **1** měla pouze slabý účinek na testované kmeny. Látka MD611 substituovaná chlorem v poloze 6 pyrazinového jádra dosáhla MIC $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ u TM. Látka MD615 s dusíkem zapojeným do morfolinového kruhu v poloze 6 a *tert*-butylem v poloze 5 byla slabě účinná na TB.

Ve skupině **2** dosáhla pouze látka MD613 střední účinnosti po 24 hodinách u CA. Zdá se, že skupina látek MD612, MD613 a MD614, s butylem na 6-aminoskupině pyrazinového jádra a řetězcem o délce C4 až C7 na kyslíku karboxylové skupiny, dosáhly mírně lepších výsledků v porovnání s ostatními látkami skupiny.

Ve skupině **3** vykazovala slabou aktivitu, po 24 hodinové inkubaci, pouze látka JZ-20, která měla 6-aminoskupinu substituovanou řetězcem o délce 5C. Účinek se ztratil po dalších 24 hodinách.

Ve skupině **4** byla aktivní pouze látka JZ-0, která měla pyrazinové jádro substituované v poloze 5 karbonitrilovou skupinou a v poloze 6 chlorem. Na kmeny CA a AC byla jen slabě účinná, ale na kmen TM se podařilo zachovat středně silný účinek i po 120 hodinové inkubaci. Látka JZ-27 substituovaná řetězcem o délce 8C byla obtížně rozpustná v RPMI. Skupiny **3** a **4** byly připraveny primárně za účelem získání antimykobakteriálně působících látek a antimykotická aktivita měla v tomto případě jen okrajový význam (Zitko et al.,

2011). V minulosti se příliš neosvědčila ani substituce na NH_2 skupině karboxamidu arylem. Několik látek s navázanou trifluormethylovou skupinou na benzenovém jádře sice vykazalo slabou aktivitu proti TM, ale nebyly vyvozeny žádné závěry o vztahu mezi strukturou a účinkem (Doležal et al., 2008).

Ve skupině **5** byly aktivní pouze 2 látky. JZ-L12 s diethylaminovou skupinou v poloze 3 na pyrazinovém jádru vykazala slabou aktivitu na všechny testované kmeny. JZ-19, která byla středně účinná na všechny testované kmeny vyjma CT a AC, měla v poloze 3 substituovaný chlor.

Skupina **6** byla v našem testování nejrozsáhlejší, nicméně všechny látky byly aktivní jen velmi slabě nebo vůbec. V postupném prodlužování řetězce na aminoskupině v poloze 3 lze vysledovat mírné snižování aktivity proti TM (od délky C2 do C4) a naopak zvyšování aktivity proti CA a ostatním kvasinkám. Náhlý účinek látky JZ-L3, substituované řetězcem délky C7, která proti TM dosáhla MIC $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po 120 hodinové inkubaci se jeví jako nepravděpodobný a bylo by zajímavé jej podrobit dalšímu testování, např. po přečištění.

(Palek et al., 2008) v rámci hledání antimykobakteriálních látek našel několik účinných látek mezi 3-(arylamino) deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu. Jistou aktivitu zaznamenal u fenylů substituovaných halogenem. Jednou z výchozích látek byla i námi později znovu testovaná JZ-19, která ukázala podobnou, střední, účinnost na všechny kmeny.

Bylo by zajímavé zjistit, zda by substituce halogenem zvýšila aktivitu u derivátů s cyklickým nebo alifatickým řetězcem na 3-aminoskupině pyrazinového jádra.

Skupina **7** nevykazala žádnou aktivitu a látka ZIP-136 substituovaná pentylem na aminoskupinách v poloze 5,6 se jen obtížně rozpouštěla v RPMI.

Ve skupině **8** se nacházejí nejučinnější látky celého testovaného souboru. Látky KTM-2 a KTM-14 dosáhly, vyjma CT a CK, v celém spektru středního účinku. KTM-2 byla účinnější na kmeny AC a TM. KTM-14 naopak na CG. Obě látky se od zbytku skupiny liší přítomností pyrazinového jádra s navázaným uhlovodíkovým řetězcem, isobutylem u KTM-2 a hexylem u KTM-14. Oba vzorky se srážely v RPMI a byly testovány pouze ve zkráceném rozsahu koncentrací ($125-3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$), výsledné hodnoty mohly tedy být ještě nižší.

Nejúčinnější byla látka KTM2AP, která v celém spektru dosáhla nejnižších hodnot MIC. Byla substituována 2-pyridylem.

Skupina **9** neobsahovala ani jednu aktivní látku. EDGAR-3 byl již jednou testován a byl velmi silně účinný proti všem kvasinkám vyjma CA (Doležel et al., 2009). Námi testovaná látka byla přečištěna, což by mohlo být důvodem pro ztrátu aktivity.

Pyrazinamid (pyrazin-2-karboxamid) je specifické antituberkulotikum s baktericidním účinkem na *Mycobacterium tuberculosis*, které lze použít při postižení CNS (Buchta et al., 2002). Jeho použití je limitováno jeho hepatotoxicitou a pro předcházení vzniku rezistence je užíván v kombinacích (Lüllmann et al., 2004). K terapii latentní tuberkulózy se používá nejčastěji v kombinaci s rifampicinem ve dvouměsíčním cyklu (McNeill et al., 2003). Je snaha vyvíjet nové látky s vyšším účinkem a menší toxicitou a jedním ze způsobů je obměna stávajících struktur.

Pyrazin-2-karboxylová kyselina (skupiny **1**, **2**) a její deriváty se používají jako výchozí látky při syntéze pyrazin-2-karboxamidů (skupiny **3**, **4**), které mohou být dále využity např. při syntéze pyrazin-dikarbonitrilů (skupiny **5**, **6**). Téměř 80% látek testovaných v této práci bylo připraveno při hledání nových antimykobakteriálně působících substancí. Zastoupeny jsou tři etapy v syntéze.

Celý testovaný soubor je příliš heterogenní na to, aby mohly být formulovány jednoznačné závěry o vztahu struktury a účinku. Přesto lze pozorovat, že nejúčinnější látky ve skupinách **1**, **4** a **5** měly pyrazinové jádro substituované atomem chloru. Do dalšího testování by tedy mohl být zařazen větší počet látek s touto substitucí, aby mohla být tato hypotéza potvrzena.

Látky skupiny **8** sice dosáhly zajímavých výsledků, ale celá skupina je příliš malá na to, aby mohly být zjištěny vztahy mezi strukturou a účinkem. Bylo by vhodné aktivní látky podrobit dalšímu testování, např. v tripletu, aby byla jejich aktivita potvrzena.

8. Závěr

- Pomocí mikrodiluční bujónové metody jsme otestovali antimykotickou aktivitu u celkem 43 látek, rozdělených podle chemické struktury do 9 skupin. Měření jsme prováděli na 8 kmenech kvasinek a vláknitých hub.
- Nejrezistentnější byly kmeny *A. fumigatus* a *Candida tropicalis*. Jako nejcitlivější se ukázaly *C. albicans* a *T. mentagrophytes*.
- Z testovaných látek neměly žádnou účinnost deriváty 5,6-diazin-2,3-dikarbonitrilu. Jen velmi slabě aktivní byly deriváty 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu a 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu.
- Nejúčinnější skupinou se ukázaly deriváty 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu
- U derivátů pyrazinu byly nejúčinnější látky s navázaným chlorem na pyrazinovém jádře.

9. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: *Candida albicans* na mikroskopickém snímku

Obrázek 2: *Aspergillus fumigatus*

Obrázek 3: Kolonie *Candida albicans* na chromogenním agaru CAID2®

Obrázek 4: Amfotericin B

Obrázek 5: Ketokonazol

Obrázek 6: Itrakonazol

Obrázek 7: Stanovení citlivosti testovaných kmenů

Obrázek 8: Průměrné aktivity testovaných skupin látek

Tabulka 1: Složení média RPMI-1640 SEVAC 5x koncentrovaného

Tabulka 2: Strukturní vzorce derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 3: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 4: Strukturní vzorce derivátů 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 5: Výsledky testování derivátů 6-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny

Tabulka 6 : Strukturní vzorce derivátů 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu

Tabulka 7: Výsledky testování derivátů 6-amino-5-kyanopyrazin-2-karboxamidu

Tabulka 8: Deriváty pyrazin-2-karboxamidu

Tabulka 9: Výsledky testování derivátů pyrazin-2-karboxamidu

Tabulka 10: Strukturní vzorce derivátů pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 11: Výsledky testování derivátů pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 12: Strukturní vzorce derivátů 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 13: Výsledky testování derivátů 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tabulka 14: Deriváty 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Tabulka 15: Výsledky testování derivátů 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Tabulka 16: Strukturní vzorce derivátů 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 17: Výsledky testování derivátů 2-[(1-heteroarylethyliden)hydrazono]-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 18: Strukturní vzorce derivátů 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thio-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 19: Výsledky testování derivátů 5-(1-heteroarylalkyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-onu

Tabulka 20: Rozdělení zjištěných hodnot MIC do skupin a přiřazení bodového hodnocení

10. Literatura

1. BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Dotisk 1.vydání. Praha: Karolinum, 2002. 192 s. 80-7184-565-5
2. BURGE, H. A. Fungi: toxic killers or unavoidable nuisances? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001, vol. 87, no.6 Suppl 3, p. 52-6. 1081-1206
3. COSTA, A., SILVA, F., HENRIQUES, M., et al. Candida clinical species identification: molecular and biochemical methods *Annals of Microbiology* 2009, vol. 60, no.1, p. 105-112. 1590-4261
4. DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection) *Mycopathologia* 2008, vol. 166, no.5-6, p. 257-65. 0301-486X
5. DIEKEMA, D. J., MESSER, S. A., HOLLIS, R. J., JONES, R. N., PFALLER, M. A. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi *J Clin Microbiol* 2003, vol. 41, no.8, p. 3623-6. 0095-1137
6. DOLEŽAL, M., CMEDLOVÁ, P., PALEK, L., et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides *Eur J Med Chem* 2008, vol. 43, no.5, p. 1105-13. 0223-5234
7. DOLEŽEL, J., HIRSOVÁ, P., OPLETALOVÁ, V., et al. Rhodanineacetic acid derivatives as potential drugs: preparation, hydrophobic properties and antifungal activity of (5-arylalkylidene-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)acetic acids *Molecules* 2009, vol. 14, no.10, p. 4197-212. 1420-3049
8. EAGLE, H., MUSSELMAN, A. D. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms *J Exp Med* 1948, vol. 88, no.1, p. 99-131. 0022-1007
9. ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi *J Clin Microbiol* 2001, vol. 39, no.4, p. 1360-7. 0095-1137
10. FLEISCHHACKER, M., RADECKE, C., SCHULZ, B., RUHNKE, M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2008, vol. 27, no.2, p. 127-131. 0934-9723
11. FRAGNER, P. *Určování kvasinek z lidského organismu*. 1. vydání. Praha: Academia, 1992. 84 s. 80-200-001-9

12. JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., FÖRSTL, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002. 104 s. 80-246-0459-0
13. KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R. M. *Medical Microbiology*. 10th German Edition. Stuttgart: Thieme, 2005. 698 s. 3-13-131991-7
14. KĘDZIERSKA, A., KOCHAN, P., PIETRZYK, A., KĘDZIERSKA, J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1→3)-β-D-glucan antigens *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2007, vol. 26, no.11, p. 755-766. 0934-9723
15. LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. 728 s. 80-247-0836-1
16. MALLÁTOVÁ, N. Determining the susceptibility of microfungi to antifungals and interpreting the results *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2007, vol. 13, no.4, p. 150-5. 1211-264X
17. MANN, P. A., MCNICHOLAS, P. M., CHAU, A. S., et al. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species *Antimicrob Agents Chemother* 2009, vol. 53, no.12, p. 5026-34. 0066-4804
18. MCNEILL, L., ALLEN, M., ESTRADA, C., COOK, P. Pyrazinamide and rifampin vs isoniazid for the treatment of latent tuberculosis: improved completion rates but more hepatotoxicity *Chest* 2003, vol. 123, no.1, p. 102-6. 0012-3692
19. MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. *Medical microbiology: 6th edition*. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009. 947 s. 978-0-323-05470-6
20. NORDNESS, M., ZACHARISEN, M., FINK, J. Toxic and other non-IgE-mediated effects of fungal exposures *Current Allergy and Asthma Reports* 2003, vol. 3, no.5, p. 438-446. 1529-7322
21. OBAYASHI, T., YOSHIDA, M., MORI, T., et al. Plasma (1→3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes *Lancet* 1995, vol. 345, no.8941, p. 17-20. 0140-6736
22. PALEK, L., DVOŘÁK, J., SVOBODOVÁ, M., et al. Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of 3-arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles *Arch Pharm (Weinheim)* 2008, vol. 341, no.1, p. 61-5. 0365-6233

23. PETTIGREW, H., SELMI, C., TEUBER, S., GERSHWIN, M. Mold and Human Health: Separating the Wheat from the Chaff *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2009, vol. 38, no.2, p. 148-155. 1080-0549
24. PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* *Clin Microbiol Infect* 2004, vol. 10 Suppl 1, p. 11-23. 1198-743X
25. PFALLER, M. A., MESSER, S. A., HOLLIS, R. J., JONES, R. N., DIEKEMA, D. J. In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of *Candida* spp *Antimicrob Agents Chemother* 2002, vol. 46, no.6, p. 1723-7. 0066-4804
26. REX, J. H., PFALLER, M. A., RINALDI, M. G., POLAK, A., GALGANI, J. N. Antifungal susceptibility testing *Clin Microbiol Rev* 1993, vol. 6, no.4, p. 367-81. 0893-8512
27. RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview *Int J Food Microbiol* 2007, vol. 119, no.1-2, p. 3-10. 0168-1605
28. SCHINDLER, J. *Mirobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1.vydání. Praha: Grada, 2010. 223 s. 978-80-247-3170-4
29. TOMŠÍKOVÁ, A. *Nové poznatky v diagnostice mykóz*. První vydání. Praha: Karolinum, 2006. 283 s. 80-246-1051-5
30. VERMOUT, S., TABART, J., BALDO, A., et al. Pathogenesis of Dermatophytosis *Mycopathologia* 2008, vol. 166, no.5, p. 267-275. 0301-486X
31. VOPRŠALOVÁ, M., ŽÁČKOVÁ, P. *Základy toxikologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2000. 231 s.
32. WHITE, L., PERRY, M., BARNES, R. Polymerase chain reaction diagnosis of fungal disease: Finally coming of age *Current Fungal Infection Reports* 2009, vol. 3, no.4, p. 207-215. 1936-3761
33. WWW.ACCIUSA.COM, dostupné z:
www.acciusa.com/pdfs/fungitell/Fungitell%20datasht_PN001269r005.pdf
posl. úprava 18.4.2009, citováno 5.3.2011
34. WWW.DOCTORFUNGUS.ORG, dostupné z:
www.doctorfungus.org/thelabor/sec12.pdf posl. úprava 13.10.2010,
citováno 4.3.2011
35. WWW.MYCOLOGY.ADELAIDE.EDU.AU, dostupné z:
www.mycology.adelaide.edu.au/Laboratory_Methods/Antifungal_Susceptibility_Testing/overview.html posl. úprava 11.3.2011, citováno 13.3.2011

36. YERA, H., SENDID, B., FRANCOIS, N., CAMUS, D.,POULAIN, D.
Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001, vol. 20, no.12, p. 864-70. 0934-9723
37. YUCESOY, M.,MAROL, S. Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003, vol. 2, p. 8. 1476-0711
38. ZITKO, J., DOLEŽAL, M., SVOBODOVÁ, M., et al. Synthesis and antimycobacterial properties of N-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides *Bioorg Med Chem* 2011, vol. 19, no.4, p. 1471-6. 1464-3391