

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



***In vitro* screening nových, potenciálně
antimykotický účinných sloučenin II**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Comová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 10. 5. 2019

Podpis:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cokora'.

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za vstřícný přístup a poskytování cenných rad, které mi pomohly při zpracování diplomové práce. Dále děkuji paní Idě Dufkové za pomoc při práci v laboratoři a rodině, která mi byla oporou.

Obsah

1.	Úvod.....	12
2.	Teoretická část	13
2.1	Epidemiologie mykotických infekcí	13
2.2	Charakteristika mikroskopických hub.....	14
2.3	Onemocnění vyvolené houbami.....	16
2.3.1	Mykotoxikózy	16
2.3.2	Mykoalergózy	16
2.3.3	Mycetismy.....	16
2.3.4	Mykózy	17
2.4	Antimykotické látky využívající se při terapii infekcí.....	18
2.4.1	Azolová antimykotika	19
2.4.2	Polyenová antimykotika.....	25
2.4.3	Echinokandiny.....	27
2.4.4	Allylaminy.....	28
2.4.5	Ostatní antimykotika	29
2.4.6	Nové, antimykoticky účinné sloučeniny ve vývoji	29
2.5	Rezistence mikroskopických hub vůči antimykotikům	32
2.5.1	Faktory a mechanismy ovlivňující antimykotickou rezistenci.....	33
2.6	Testování antimykotické citlivosti <i>in vitro</i>	38
2.6.1	Vývoj standardizovaných metodik.....	38
2.6.2	Hodnocení citlivosti	40
2.7	<i>In vitro</i> stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům	40
2.7.1	Agarové difúzní metody.....	40
2.7.2	Diluční metody.....	43
2.7.3	Komerční soupravy – kvalitativní stanovení	45
2.7.4	Komerční soupravy – kvantitativní stanovení	45
2.7.5	Vývoj nových metod ke stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům	48
3.	Experimentální část.....	50
3.1	Cíl práce	50
3.2	Použitý materiál	50

3.3	Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub a jejich charakteristiky .	51
	51
3.3.1	<i>Candida albicans</i>	51
3.3.2	<i>Candida krusei</i>	52
3.3.3	<i>Candida parapsilosis</i>	52
3.3.4	<i>Candida tropicalis</i>	52
3.3.5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	53
3.3.6	<i>Aspergillus flavus</i>	53
3.3.7	<i>Absidia corymbifera</i>	53
3.3.8	<i>Trichophyton interdigitale</i>	54
3.4	Přehled testovaných sloučenin	54
3.5	Standardy antimykotik	58
3.6	Metodika	59
3.6.1	Příprava růstového média.....	59
3.6.2	Příprava suspenzí	59
3.6.3	Příprava ředící řady testované látky	59
3.6.4	Postup pipetování do mikrotitrační destičky.....	61
3.6.5	Vyhodnocení	62
4.	Výsledky	63
5.	Diskuze.....	68
6.	Závěr	69
	Zdroje:.....	70
	Seznam obrázků	78
	Seznam tabulek	79

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Kandidát: Bc. Kateřina Comová

Školitel: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin II

Klíčová slova: kvasinky, houby, antimykotika, rezistence, mikrodiluční bujonová metoda, minimální inhibiční koncentrace.

Tato diplomová práce se zabývá převážně antimykotickou rezistencí a mechanismem účinku vybraných antimykotik.

Teoretická část je zaměřena na obecný přehled týkající se charakteristiky mikroskopických hub a onemocnění, která způsobují. Pozornost je také věnována antimykotickým látkám, které jsou běžně využívány při léčbě mykotických infekcí a dále látkám, které se v současné době nachází v různých fázích klinického hodnocení. S tím je spjat i mechanismus účinku těchto sloučenin, který je zde také popsán. V neposlední řadě shrnuje teoretická část vznik a princip antimykotické rezistence. V závěru teoretické části jsou popsány metody, které se využívají při stanovení *in vitro* citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům.

V praktické části je popsán postup kvantitativní mikrodiluční bujonové metody, která byla použita v této diplomové práci. Součástí praktické části je přehled testovaných sloučenin a výsledky s hodnocením, zda vykazují dostatečnou účinnost vůči mykotickým agens, či nikoli.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist in Laboratory Methods

Candidate: Bc. Kateřina Comová

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* screening of novel potentially active antimycotic compounds II

Key words: yeasts, fungi, antimycotics, resistance, microdilution broth method, minimal inhibition concentration.

The main focus of this thesis is on antifungal resistance and the mechanism of action of selected antifungal agents. The theoretical part of the thesis gives a general overview of the characteristics of microscopic fungi and the diseases they cause. Attention is also paid to antifungal agents that are commonly used in the treatment of fungal infections, as well as those that are currently at various stages of clinical trials. This ties in with the mechanism of action of these compounds, which is also described here. The theoretical part also summarizes the development and principles of antifungal resistance. The theoretical part concludes with the description of the methods used in the determination of *in vitro* susceptibility of fungal agents to antifungals. The practical part of the thesis describes the procedure of the quantitative broth microdilution method, which was used in this thesis. This part also includes an overview of the tested compounds and the results with an evaluation of whether the compounds show a sufficient effectiveness against fungal agents.

Seznam zkratek

5-FC	5-fluorocytosin (flucytosin)
5-FU	5-fluorouracil
FUR1	Gen kódující uracil fosforibosyl transferázu
ABC	ATP-binding cassette Transmembránový transportní mechanismus využívající ATP
AC	<i>Absidia corymbifera</i>
ADP	Adenosindifosfát
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
AFST	Antifungal Susceptibility Testing Antifungální testování citlivosti
ATCC	American Type Culture Collection Americká sbírka typových kultur
ATP	Adenosintrifosfát
BP	Breakpoint
CA	<i>Candida albicans</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CD	Cluster of differentiation Diferenciační skupina
CDR	Candida drug resistance Rezistentní kmen kvasinky rodu <i>Candida</i>
CFU	Colony forming unit

	Kolonie tvořící jednotka
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute Ústav laboratorních a klinických standardů
CNS	Centrální nervový systém
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CPR	Cytochrom P450 reduktáza
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CYP51	Cytochrom P450 rodiny 51
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid Deoxyribonukleová kyselina
ERG2, ERG3, ERG11	ETS (erythroblast transformation-specific) related gene Geny z genové rodiny ERG
ESCMID	European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci
EUCAST	The European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
FC	Flow cytometry
FCY1	Gen kódující cytosin deaminázu
FCY2	Gen kódující cytosin permeázu
FKS1, FKS2	Geny kódující β -1,3-glukansyntetázu
GIT	Gastrointestinální trakt

GPI	Glykofosfatidylinositol
HIV	Human Immunodeficiency Virus Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMG-CoA-reduktáza	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktáza
IMC	Izotermická mikrokolorimetrie
IZ	Inhibiční zóna
JIP	Jednotka intenzivní péče
MDR	Multi-drug resistance Multiléková rezistence
MFC	Minimum fungicidal concentration Minimální fungicidní koncentrace
MFS	Major facilitator superfamily Rodina membránových transportérů
MHA	Mueller-Hintonův agar
MHB	Mueller-Hintonův bujón
MHIC	Minimální tepelná inhibiční koncentrace
MIC	Minimum inhibitory concentration Minimální inhibiční koncentrace
MLC	Minimum lethal concentration Minimální letální koncentrace
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino) propansulfonová kyselina
mRNA	Mediátorová RNA
MS-MALDI-TOF	Mass spektrometry – Matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu

NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBD	Nukleotid vázající doména
NCCLS	National Commitee of Clinical Laboratory Standard Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDK 1	Fosfatidylinositol-dependentní kináza 1
QIDP	Qualified Infectious Disease Product
RNA	Ribonucleic acid Ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Chemicky definované růstové médium
Th1	T pomocný lymfocyt 1
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TMD	Transmembránová doména

1. Úvod

Téma „Screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin“ je v dnešní době důležité ve většině zemí světa i přes to, že údaje týkající se výskytu rezistence nejsou celosvětově shodné. Mikroskopické houby byly v medicíně mnoho let považovány za klinicky méně významné, nyní je tomu ale naopak. Chybná indikace antimykotika, jeho nadužívání, dlouhodobé užívání v malých dávkách a mnoho dalších aspektů při léčbě onemocnění vedou ke změně vlastností mikroskopických hub, narůstá jejich rezistence vůči antimykotikům, a tudíž se sníží jejich účinnost. Nejvíce ohroženi jsou pacienti se sníženou funkcí imunitního systému, kdy nemožnost léčby mykotické infekce je příčinou signifikantně zvýšené morbidity a mortality. Počet takových pacientů nadále roste v důsledku infekce virem HIV, orgánových transplantací, transplantací kmenových krvetvorných buněk, chemoterapie a dále díky prodlužující se délce života s četnými přidruženými nemocemi operovaných ve vysokém věku. [1,2]

Prvním krokem k objevu nového antimykotika je základní screening neboli vyhledávání antimykotického působení u dříve takto nepopsané známé látky. Tento základní screening se provádí *in vitro* za definovaných podmínek. Díky vzrůstu počtu rezistentních kmenů mikroskopických hub se vývoj tímto směrem stále zvyšuje. Doporučené metody pro testování citlivosti, jsou pro tyto účely vypracovány Ústavem laboratorních a klinických standardů (CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute), společně s Evropským výborem pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Dalšími nezbytnými kroky jsou laboratorní testování a klinické studie, díky kterým by mohla být nová látka podávána pacientům jako terapie.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení antimykotických účinků u 38 nově syntetizovaných sloučenin.

2. Teoretická část

2.1 Epidemiologie mykotických infekcí

Mykotické infekce způsobují přibližně 10 % nozokomiálních nákaz. Kmen *Candida* je celosvětově čtvrtou nejčastější příčinou nozokomiálních infekcí krevního řečiště. Nejčastějšími agens mykotických onemocnění jsou tedy kandidy, z nichž 60–80 % onemocnění tvoří *Candida albicans* a 20–30 % non-*albicans* druhy *Candida*, dále aspergily (15–30 %), kryptokoky (2 %) a sporadicky mukory. K nejčastějším původcům endemických mykóz patří rody *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Blastomyces*.^[1]

Epidemiologické studie dokazují, že v evropských státech a USA je celková incidence kandidemií velmi podobná. Orientaci ztěžuje odlišný způsob uvádění epidemiologických dat v Evropě a USA. Od počátku 90. let minulého století dochází k celkovému snížení výskytu kandidemií a tím i snížení mortality a morbidity u neutropenických nemocných díky zavedení flukonazolu. V souvislosti s terapeutickým používáním flukonazolu se změnilo i zastoupení jednotlivých druhů kandid, kdy se ve větším procentu začaly objevovat non-*albicans* kmeny (zejména *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*) a to jak v Americe, tak i v Evropě. Na jednotkách intenzivní péče, tj. hlavně u non-neutropenických pacientů, se naopak kandidózy stávají závažným problémem s neměnnou nebo stoupající incidencí. Epidemiologické průzkumy prokázaly, že 50 % zdravé populace má jako součást střevní mikroflóry *C. albicans*, zatímco hospitalizovaní pacienti mají díky antibiotické léčbě v gastrointestinálním traktu (GIT) přítomné kandidy až v 88 % s dominancí non-*albicans* druhů *Candida*.^[1, 2, 3]

Dle epidemiologických kritérií se mykotické infekce se dělí do 3 skupin. Do první skupiny se řadí méně časté patogeny vyvolávající latentní či lokální infekce, které spontánně vymizí. Patogeny ve druhé skupině vyvolávají u zdravého jedince onemocnění, která nejsou příliš závažná. Třetí skupinu představují patogeny vyvolávající závažná onemocnění.^[4]

Další rozdělení vychází z možného vzniku infekce dle výskytu patogenní houby, na endemické a oportunní. Patogeny endemických mykóz se vyskytují pouze v určité lokalitě, na kterou jsou vázány, a onemocnění tedy mohou vyvolat u malé části obyvatelstva. Patogeny patřící do skupiny oportunních mykóz jsou všudypřítomné a často tvoří přirozenou komenzální mikroflóru u lidí. Oportunní infekce představují

největší riziko pro pacienty s poruchou imunity. Vznik oportunní mykotické infekce závisí na vlastnostech patogenní houby a zdravotním stavu pacienta. Rozvoj infekce závisí na zdroji, cestě nákazy, vnímavosti jedince, infekční dávce a virulenci patogenního kmene. Faktory vzniku a rozvoje oportunní infekce jsou shrnuty v tabulce 1.

Mykotické onemocnění je nejčastěji přenášeno vzduchem, méně často kontaktem se zdrojem infekce apod. [4]

Tabulka 1: Faktory vzniku a rozvoje oportunní infekce. Převzato a upraveno z [4]

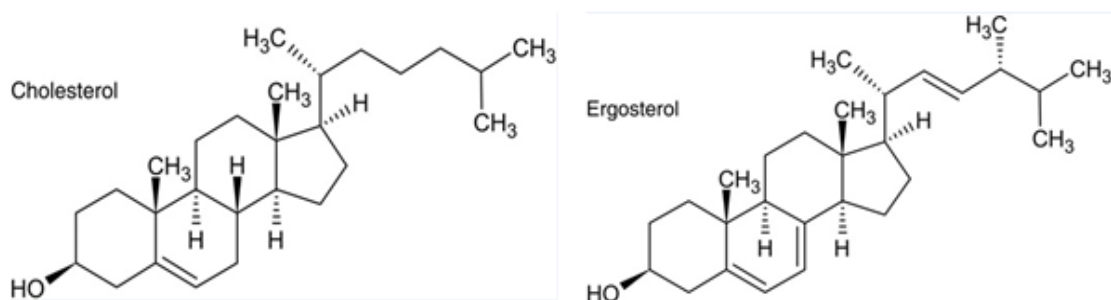
Virulence mikroorganismu	obecné faktory	
	specifické faktory	humorální
		specifické
Obranné mechanismy hostitele	mechanická bariéra (kůže, sliznice)	
	fyziologická mikroflóra	
	buněčná imunita	
	humorální imunita	
Charakter základního onemocnění	celkový stav pacienta	komorbidita
		výživový stav
		základní a podpůrná léčba

Při obraně organismu proti mykotické infekci se uplatňují neimunitní a specifické i nespecifické imunitní mechanismy. Neimunitní obranné faktory se uplatňují při porušení anatomických bariér a částečně i složení fyziologické flóry. Imunitní obranné faktory jsou zprostředkovány především makrofágy a dendritickými buňkami. K citlivosti organismu k těmto infekcím přispívá schopnost účinně indukovat mechanismy založené na spolupráci makrofágů a Th1 lymfocytů. [4,5]

2.2 Charakteristika mikroskopických hub

Houby neboli *fungi* jsou eukaryotní mikroorganismy a tvoří jednu z pěti samostatných říší živých organismů. Jejich buňky mají pevné jádro s jadernou membránou, mitochondrie a další organely. Plazmatická membrána se skládá z lipidů, glykoproteinů a sterolů. Buněčná stěna obsahuje chitin a glukany nebo manany. [6]

Podobnost struktury a funkce fungálních a živočišných buněk je příčinou toxického působení některých antimykotik na organismus při léčbě infekce. Tato podobnost je dána blízkou chemickou strukturou ergosterolu a cholesterolu, který je mj. součástí lidských buněčných membrán (Obr. 1). [2, 6, 7, 8]



Obrázek 1: Strukturální podobnost cholesterolu a ergosterolu.
Převzato a upraveno z [7].

Naopak odlišná struktura fungálních a bakteriálních buněk zajišťuje jejich rezistenci k antibiotikům. [6, 8]

Původci mykóz patří mezi výtrusné, stélkaté organismy. Tvoří samostatný kmen *Mycophyta*, ten se dále dělí na podkmeny *Phycomycetes* a *Eumycetes*. [6, 8]

Pravé plísně se označují jako *Phycomycetes*. Vytvářejí nepřehrádkované mycelium – podhoubí se sloupečkovitými sporangiofory, které jsou ukončeny sporangiem. Ve sporangiu se nachází množství nepohlavně vzniklých sporangiospor. Nejdůležitější druhy nacházející se ve skupině pravých plísní patří do třídy *Zygomycetes*, do řádu *Mucorales*. [6, 8]

Pravé houby se označují jako *Eumycetes*. Základní stavební jednotkou *Eumycetes* je hyfa – vlákno. Hyfa je jedno nebo mnohojaderná trubicovitá struktura, která může být opatřena septem – přepážkou. Obvykle se větví a splétají mycelium. Specializované hyfy tvoří spóry. Při kultivaci hub na pevné půdě, lze dle charakteru kolonie usnadnit jejich identifikaci. *Eumycetes* se dále dělí do tří tříd, a to na *Ascomycetes* (houby vřeckaté), mezi které patří např. rody *Candida*, *Trichophyton*, aj., dále *Basidiomycetes* (houby stopkovýtrusé) a *Deuteromycetes* (houby nedokonalé). Původci mykóz jsou většinou nedokonalé nebo vřeckovýtrusé houby, výjimečně houby stopkovýtrusé. [6, 8]

Některé houby mají v závislosti na vnějších podmínkách jedinečnou schopnost růst buď ve formě vláknitého mycelia, nebo kvasinek. Tento dimorfismus se označuje jako významný virulentní faktor.^[6]

2.3 Onemocnění vyvolené houbami

Chorobné stavy, které houby mohou vyvolat, se rozdělují do čtyř skupin na mykotoxikózy, mykoalergózy, mycetismy a mykózy.

2.3.1 Mykotoxikózy

Tyto stavy způsobuje metabolická činnost hub. Do této skupiny patří intoxikace po požití plodnic makromycet, např. *Amanita phalloides* (muchomůrkou zelenou) a vlastní mykotoxikózy, vyvolané toxickými metabolity, které se uvolňují do vnějšího okolí. Mykotoxiny mají odlišnou chemickou strukturu a biologické účinky. K intoxikaci dochází obvykle prostřednictvím kontaminované potravy. Jako hlavní producenti mykotoxinů se označují houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*.^[6, 8]

2.3.2 Mykoalergózy

Mykoalergie způsobují alergeny, které v tomto případě představují metabolické produkty hub a spóry, které jsou tvořeny po chemické stránce sacharidy a glykoproteiny. Tyto stavy se nijak neliší od reakcí na jiné alergeny a mohou způsobit alergickou rýmu, astma atd. K nejfrekventovanějším a významným houbám způsobující alergické reakce patří rody *Cladosporium*, *Aspergillus* a *Alternaria*.^[6, 8]

2.3.3 Mycetismy

Mycetismy jsou způsobeny požitím plodnic vyšších hub produkujících toxiny. Jde nejčastěji o stopkovýtrusné houby (*Basidiomycetes*): *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *A. muscaria*, *Entoloma lividum* a *Inocybe patouillardii*.

Vyprodukované toxiny lze rozdělit podle místa účinku na cytotoxiny a neurotoxiny. Do skupiny cytotoxinů patří např. amanitin a phalloidin a jsou charakteristické schopností inhibovat proteosyntézu somatických buněk. Po interakci cytotoxinu s polymerázou II dochází k ireverzibilnímu poškození buněk, které může vést k poruše funkce jater a ledvin. Druhou skupinu představují neurotoxiny. Jejich

zástupcem je alkaloid muskarin, který má parasymptomimetické účinky (křeče hladkého svalstva, zvýšená aktivita sekrečních žláz atd.). [8, 9]

2.3.4 Mykózy

Poslední skupinu představují mykózy, které jsou vyvolány mikromycetami. Mykózy je možné přenášet třemi základními způsoby:

- vzdušnou cestou
- přímým nebo nepřímým kontaktem
- poraněním

Z praktického hlediska terapeutického přístupu rozlišujeme dvě hlavní skupiny těchto infekcí. První reprezentují systémové neboli orgánové mykózy vyvolané primárně patogenními nebo oportunními houbami, z nichž především ty oportunní představují v intenzivní medicíně stále větší problém a u vysoce rizikových pacientů se stávají významnou příčinou morbidit a mortality. [6, 10]

Oportunní mykotické infekce jsou častou komplikací u pacientů se sníženou imunitou, jako jsou např. HIV pozitivní pacienti. Kandidóza, kterou nejčastěji trpí, je způsobena kvasinkou *Candida albicans* a u těchto pacientů se vyskytuje z 90 %. Další oportunní infekcí může být aspergilóza – onemocnění nejčastěji dolních cest dýchacích. Některé kmeny mohou produkovat hepatotoxické a karcinogenní mykotoxiny. Mukormykózová infekce je z epidemiologického hlediska podobná aspergilóze. Proniknutí agens do organismu probíhá cestou dýchacího ústrojí. Spóry se uchyť na nazální nebo nazofaryngeální sliznici a odtud se šíří do paranazálních dutin a dále až do mozku. V infikované tkáni vznikají trombózy a ischemické nekrózy. Další oportunní infekcí je kryptokokóza. Postihuje převážně plicní tkáň, krev, centrální nervový systém (CNS), lymfatické uzliny a GIT. Původcem onemocnění je nejčastěji *Cryptococcus neoformans*. Do rozšíření infekce HIV byly kryptokokové infekce velmi vzácné. V současné době 80–90 % pacientů s touto infekcí tvoří HIV pozitivní pacienti. V posledních letech je pozorována vzrůstající incidence tzv. non-albicans kandid, především *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*. Mezi vláknitými houbami se stále častěji objevují *Fusaria* a *Zygomycetes*. Výskyt dříve poměrně vzácných patogenů je s jistotou spjat s narůstajícím užíváním antimykotik (azolů i amfotericinu B) v profylaxi a empirické léčbě. [6, 10, 11, 12]

Do druhé skupiny se řadí kožní a slizniční infekce, které jsou, v porovnání se systémovými mykózami, obvykle spojeny s relativně zdravým hostitelem nebo pouze s lokální dispozicí. Skupinu lokálních infekcí lze dále dělit: [6, 8, 13, 14]

- povrchové – superficiální
- kožní – kutánní
- podkožní – subkutánní infekce.

Povrchové slizniční mykózy jsou lokalizovány ve stratum corneum a způsobují je např. rody *Aspergillus* a *Rhinosporidium*. [6, 15]

Kožní dermatomykózy „tinea“ postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehtové lůžko. Způsobují je např. rody *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* a onemocnění se odvozuje dle agens – trichomykóza, epidermomykóza atd. [6, 15]

Podkožní mykózy vznikají na podkladě traumatu a inokulaci mykotického agens. Může být postižen úsek od hlubší vrstvy dermis až po kost. Léčba spočívá mj. v chirurgickém odstranění postižené tkáně a jedná se spíše o chronický průběh infekce. [6]

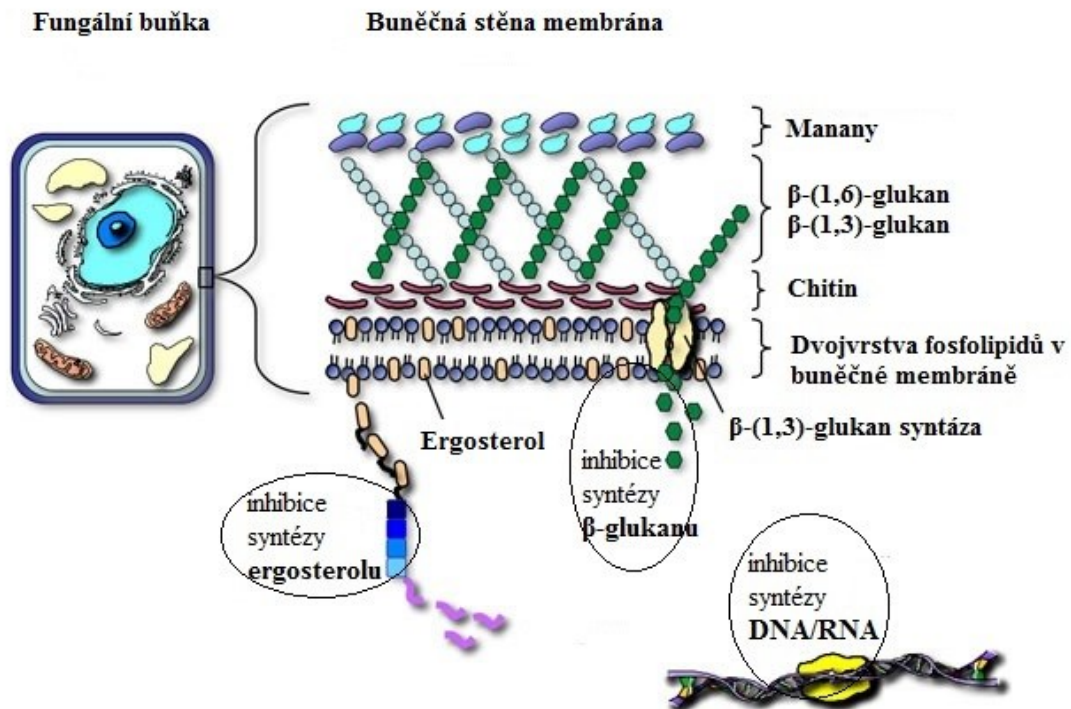
2.4 Antimykotické látky využívající se při terapii infekcí

Antimykotika slouží k léčbě lokálních i systémových infekcí vyvolaných patogenními houbami. Lze je dělit z mnoha hledisek. Jedním z nich je rozdělení na látky pro místní nebo celkové užití, dle charakteru onemocnění. Další rozdělení určuje jejich chemická struktura. Účinek může být fungistatický – zastavení růstu, nebo fungicidní – usmrcení patogenních agens. [11, 16, 17]

Jednotlivá antimykotika se liší v mechanismu účinku, resp. v místech zásahu do struktury nebo funkce patogenní houby, dále v citlivosti vůči různým mykotickým patogenům. Mají i rozdílné farmakokinetické vlastnosti a různé spektrum nežádoucích účinků a lékových interakcí. [11, 16, 17]

Většina antimykotik v klinickém použití je zaměřena na ergosterol nebo jeho biosyntézu, a tak využívá odlišného složení plazmatické membrány houbových buněk. Fungální buněčná stěna je složená z (1,3)- β -D-glukanů kovalentně spojených s (1,6)- β -D-glukanem a chitinem (Obr. 2). Tyto polymery vytvářejí vodíkové vazby mezi sousedními polysacharidovými řetězci za účelem vytvoření tvrdé trojrozměrné sítě

mikrovláken. I když jsou houby eukaryotní mikroorganismy, buněčná stěna není sdílena savčími buňkami, a proto poskytuje další cíl pro antifungální léčiva. [18]

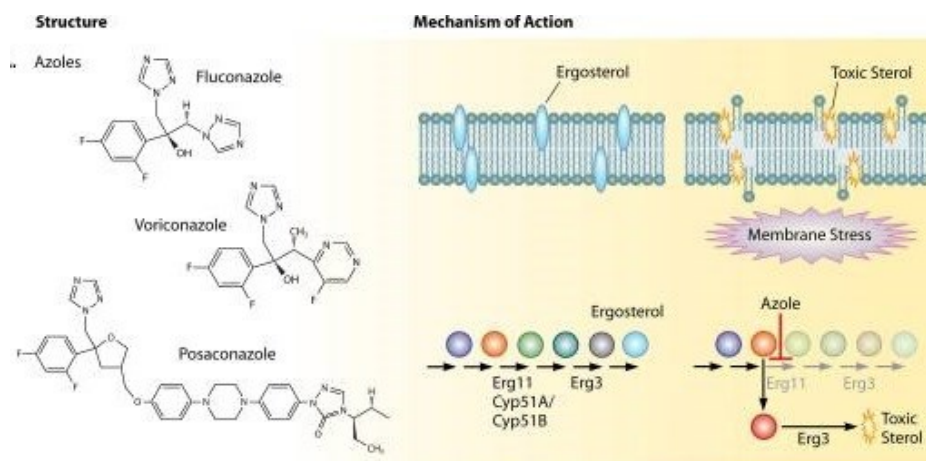


Obrázek 2: Znárodnění buněčné stěny mikroskopických hub a popis míst zásahů antimykotik.

Převzato a upraveno z [7].

2.4.1 Azolová antimykotika

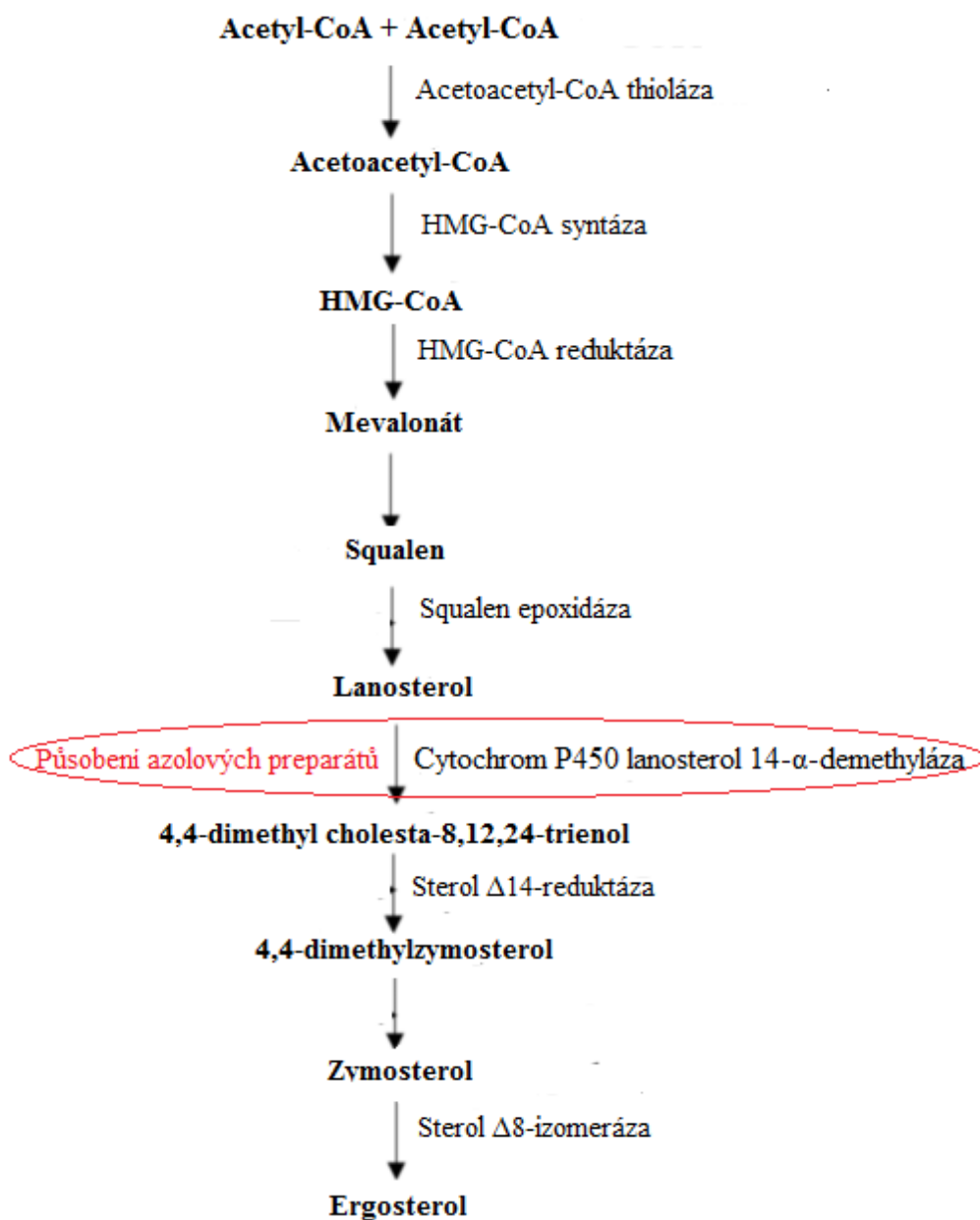
Jedná se o nejrozšířenější skupinu antimykotických látek. Dělí se dle struktury dusíkatého heterocyklu na imidazoly a triazoly.



Obrázek 3: Znáznornění zásahu azolového preparátu do bun. stěny mikroskopické houby. Převzato a upraveno z [18].

2.4.1.1 Mechanismus účinku azolových preparátů

Oxidační metabolismus lanosterolu, který je součástí biosynetické dráhy ergosterolu, je jedním z důležitých kroků mikrosomálního elektronového transportního systému, který je katalyzován cytochromem P450. Princip působení azolových preparátů spočívá v inhibici syntézy ergosterolu prostřednictvím selektivní inhibice enzymu lanosterol 14- α -demethylázy, označované také jako CYP51, která je závislá na **cytochromu P450** (Obr. 4).^[18, 19, 20, 21]

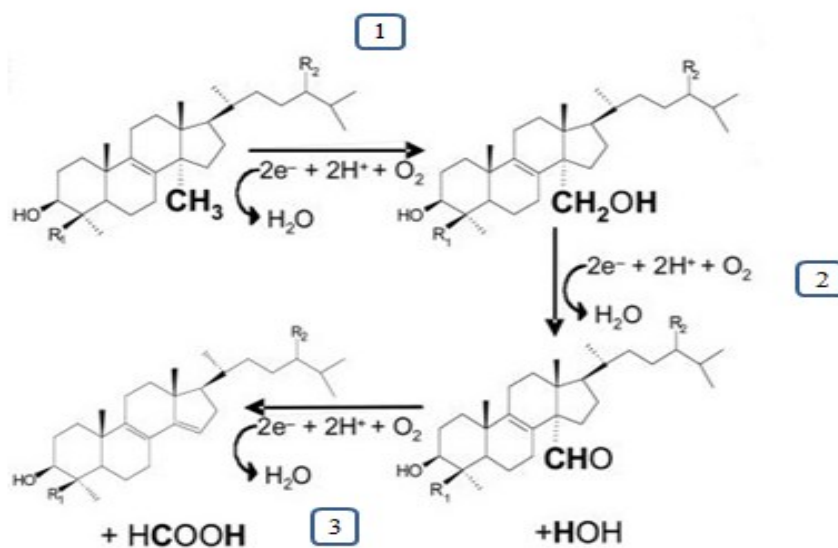


Obrázek 4: Syntéza ergosterolu a místo působení azolových preparátů. Převzato a upraveno ^[22]

Lanosterol 14- α -demethyláza – katalytická reakce a základ pro inhibici azolovými preparáty:

Lanosterol 14- α -demethyláza je monooxygenáza cytochromu P450, která katalyzuje unikátní třístupňovou reakci oxidačního odstranění 14- α -methylové skupiny ze sterolového jádra lanosterolu. Reakce zahrnuje tři postupné katalytické cykly cytochromu P450 (Obr. 5), z nichž každý vyžaduje dodávku dvou elektronů a dvou protonů prostřednictvím redukovaného nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) a kyslíku. Když se sterolový substrát váže v enzymově aktivním místě takovým

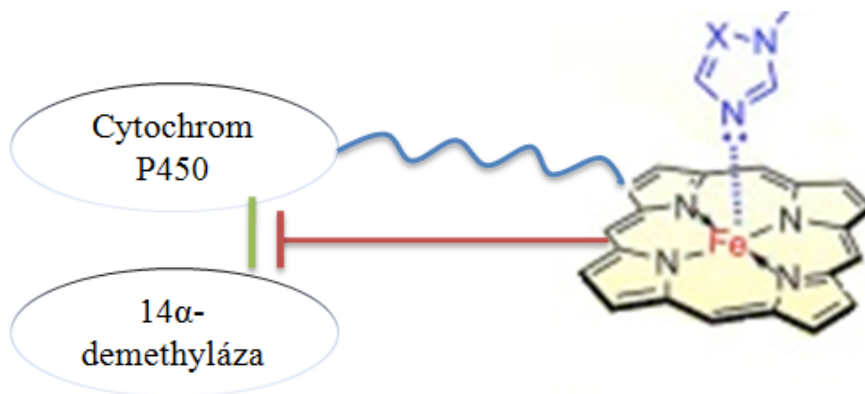
způsobem, že je 14- α -methylová skupina umístěna nad rovinou železa hemu, cytochrom P450 přijímá první elektron z cytochrom P450 reduktázy (CPR) a jeho hemové železo je redukováno do aktivního stavu ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Dodání prvního elektronu umožňuje navázání molekuly kyslíku v distální axiální poloze redukovaného železa v těsné blízkosti 14- α -methyl skupiny lanosterolu. Dále je druhý elektron přenesen CPR a zároveň dochází k redukci kyslíku, který je vázán na hem. Dva katalytické protony z povrchu proteinu způsobí štěpení molekulárního kyslíku a uvolnění jedné molekuly vody při zavádění druhého atomového kyslíku do methylové skupiny substrátu. Druhý krok katalýzy konvertuje 14- α -alkoholovou skupinu na aldehydovou. Třetí cyklus má za následek uvolnění kyseliny mravenčí a zavedení dvojné vazby do sterolového jádra.^[22]



Obrázek 5: Tříkroková reakce přeměny lanosterolu katalyzovaná enzymem lanosterol 14- α -demethylázou

Každý krok vyžaduje dva redukční ekvivalenty, dva protony a jednu molekulu kyslíku. Elektrony jsou dodávány z NADPH pomocí CPR. Přezvato z: [22]

K inhibici syntézy ergosterolu dochází po interakci volného dusíku imidazolů nebo triazolů azolového kruhu s hemem cytochromu P450, na který se váže jako šestý ligand (Obr. 6). Tímto se zabrání aktivaci kyslíku, který je nezbytný k dalším krokům vedoucím k tvorbě ergosterolu. Inhibice tohoto enzymu vede k vyčerpání ergosterolu v buněčné membráně a k akumulaci toxických mezifázových sterolů 14- α -methyl-3,6-diolu a 14 α -methylfekosterolu. To způsobuje zvýšenou membránovou permeabilitu a inhibici růstu mikroskopických hub. [18, 19, 20, 21]



Obrázek 6: Působení azolového preparátu na hem cytochromu P450.

2.4.1.2 Imidazolové preparáty

Imidazoly zastupují jednu ze dvou hlavních tříd azolových preparátů. I přes mnohá omezení v jejich použití významně přispívají k úspěšné terapii povrchových a méně často systémových mykotických infekcí. [23]

Obsahují molekulu se dvěma atomy dusíku v pětičlenném kruhu. Mají nižší antimykotickou specifitu, a o to více nežádoucích účinků. Ve většině případů se používají pro lokální léčbu ve formě krému. Krém dobře působí na neochlupené části těla, zatímco na nehtové mykózy je vhodnější použít roztok, který zatéká i za nehtovou ploténku. Jsou širokospektré, fungistatické a působí pouze na rostoucí mycelium. Kvůli přežívání spor, by se měla léčba prodloužit o 2-3 týdny po vymizení klinických příznaků. [13, 20]

Mezi imidazolové preparáty patří klotrimazol, ekonazol, ketokonazol a bifonazol.

Účinek klotrimazolu je spíše fungistatický. Působí na nekomplikované dermatofytické infekce, povrchové mykotické infekce, kandidové infekce v dutině ústní a na vaginální kandidózy. *In vitro* je aktivita klotrimazolu proti většině systémových patogenů srovnatelná s amfotericinem B. Proti dermatofytům je více účinný než griseofulvin a nystatin. Primární i sekundární rezistence na tento přípravek je velmi vzácná. Užívání klotrimazolu *per os* přináší problémy s toxicitou a jinými vedlejšími účinky, a proto se dnes takto prakticky neužívá. [13, 23, 24]

Ekonazol je *in vitro* účinnější než výše uvedený klotrimazol. Má široké spektrum účinku proti dermatofytickým a kandidovým infekcím, dalším patogenním

kvasinkám, vláknitým houbám a některým gramnegativním bakteriím. Je nevhodný pro systémové terapie.^[13, 23]

Ketokonazol se označuje jako imidazolový derivát druhé generace. Působí fungistaticky až fungicidně vůči dermatofytům, kvasinkám a dimorfním houbám. Méně citlivé jsou např. rody *Aspergillus*, *Mucor* a jiné zygomycety. Ve formě krému nebo šampónu je určený k léčbě seboroické dermatitidy nebo kandidózy.^[13, 16, 23, 25]

Poslední ze skupiny imidazolových preparátů je bifonazol. Jeho fungicidní mechanismus účinku je dán inhibicí syntézy ergosterolu s následnou poruchou funkce buněčné membrány a rozvratem vnitřního prostředí. Kromě cytochromu P450 je zablokována i HMG-CoA reduktáza. Účinek na rozdíl od jiných antimykotik velmi závisí na pH prostředí. Bifonazol je podáván ve formě krému nebo roztoku. Spektrum účinku zahrnuje dermatofyty, kvasinky i plísně. K léčbě onychomykóz se používá směs s 40% ureou, která selektivně změkčuje infikovanou část nehtu a usnadňuje průnik bifonazolu do tkáně. Primární i sekundární rezistence je vzácná. Díky vysoké lipofilitě se špatně rozpouští ve vodě. Lipofilita se musí brát v úvahu při testování citlivosti na tento preparát.^[13, 24]

2.4.1.3 Triazolové preparáty

Označují se jako nové azoly a lze je dělit na první a druhou generaci. Na rozdíl od imidazolu obsahují tři atomy dusíku, způsobují méně nežádoucích účinků a dobře pronikají do CNS.^[16, 20]

Fyzikální, chemické, farmakodynamické i farmakokinetické vlastnosti jsou vzájemně odlišné zejména v důsledku různé velikosti molekuly a rozdílné lipofility. Zástupci těchto preparátů jsou flukonazol, itrakonazol, vorikonazol a posakonazol.^[20]

Flukonazol je antimykotikum první generace, podáváný při léčbě systémových infekcí. Flukonazol se stal lékem volby v prevenci a léčbě invazivní kandidózy. Farmakokinetické vlastnosti jsou příznivé při perorálním i parenterálním podávání a je dobře tolerován díky minimální toxicitě u všech věkových kategorií. Má široké spektrum účinku, citlivé jsou např. *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. aj. Vlastnost primární rezistence na flukonazol má *Candida krusei* a snížená citlivost může být detekována u *Candida glabrata*.^[11, 17, 25]

Další antimykotikum první generace – itrakonazol je podáváný při léčbě systémových infekcí. Je charakteristický širokým spektrem účinku a nízkou incidencí nežádoucích účinků. Dostatečnou citlivost na tento preparát mají např. kvasinky

Candida spp., dermatofyty *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. Rezistenci vykazují plísně *Zygomycetes*, *Fusarium* spp. aj.^[17, 25]

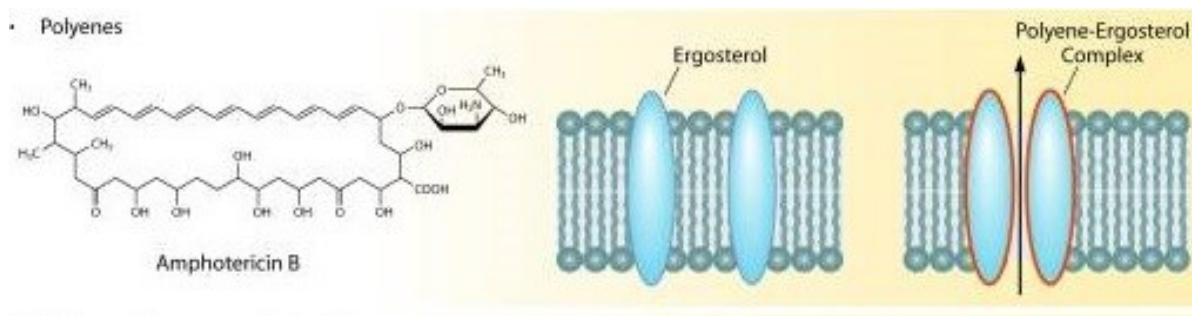
Antimykotikum druhé generace – vorikonazol je vhodný pro systémové užití. Mechanismus účinku spočívá v inhibici mykotické lanosterol 14- α -demethylázy, kterou zprostředkovává cytochrom P450. Tímto způsobem se zablokuje biosyntéza ergosterolu z lanosterolu. Vorikonazol vykazuje široké spektrum účinku. Na kvasinky působí fungistaticky stejně jako jiné azolové preparáty a na vláknité houby má fungicidní účinek. Působí i proti *C.krusei*, která je primárně rezistentní na flukonazol.^[16, 17, 26]

Posakonazol je širokospektré antimykotikum druhé generace se systémovým účinkem a lipofilním charakterem. Snižuje biosyntézu ergosterolu tím, že inhibuje enzym lanosterol-14- α -demethylázu. Účinně působí proti kvasinkám rodu *Candida*, vláknitým houbám rodu *Aspergillus*. Citlivost vůči posakonazolu vykazují dimorfní houby, jako *Histoplasma* spp., *Blastomyces* spp., *Coccidioides* spp. a zygomycetám. Ve srovnání s flukonazolem vykazuje lepší účinnost vůči *Cryptococcus* spp. a dermatofytům. Variabilní aktivitu vykazuje vůči *Fusarium* spp. Kmeny se sníženou citlivostí k posakonazolu mají substituci na cílovém proteinu CYP51, který se podílí na odstranění 14- α -methylové skupiny z lanosterolu. Podává se i jako profylaxe u lidí s imunodeficitem. Užívá se ve formě perorální suspenze nebo nitrožilně.^[17, 27]

2.4.2 Polyenová antimykotika

Mezi polyenová antimykotika patří amfotericin B, nystatin a natamycin. Pouze amfotericin B se používá pro systémovou terapii. Látky této skupiny jsou značně toxické.

Polyenové antifungální látky se vážou na ergosterol v membráně houbových buněk. Tato vazba vede k depolarizaci membrány a tvorbě pórů, tím se zvyšuje permeabilita pro proteiny, jednomocné a dvojmocné kationty, což nakonec vede ke smrti buněk (Obr. 7).^[7, 16, 20]



Obrázek 7: Znárodnění zásahu polyenových preparátů do buněčné stěny mikroskopické houby.
Převzato z [18].

2.4.2.1 Amfotericin B

Amfotericin B byl izolován z kmene *Streptomyces nodosus*. Má širokospektré antimykotické účinky a vykazuje nejmenší rezistenci. Je lipofilní povahy, ale s přidavkem deoxycholátu sodného se stává rozpustným ve vodě.

Mechanismus účinku spočívá v porušení permeability buněčné membrány tak, že se váže na ergosterol, a tak porušuje celistvost buňky. Dále indukuje vznik volných kyslíkových radikálů a tím se podílí na destrukci membrány.^[16, 20]

Využívá se při léčbě infekcí způsobených různými kvasinkami a vláknitými mikromycetami včetně dimorfních hub, jako je např. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*. Rezistentní na toto antimykotikum je *Fusarium*, *Trichosporon* spp. a *Pseudoallescheria boydi*. Má variabilní aktivitu proti *Aspergillus* spp. a zygomycetám (např. *Mucor* spp.).^[20, 28]

Stimulace hostitelských imunitních buněk amfotericinem B způsobuje uvolňování zánětlivých cytokinů, které vedou ke vzniku horečky, zimnice, nevolnosti a zvracení. Při vyšších koncentracích dochází k navázání amfotericinu B na cholesterol v savčích buněčných membránách, což způsobuje orgánovou toxicitu. Nejvýznamnější je nefrotoxicita. Aby se zamezilo poruše funkce ledvin, používají se lipozomální formy tohoto léčiva.^[7, 28]

2.4.2.2 Natamycin

Tento preparát má široké spektrum účinku a používá se při léčbě infekcí GIT. Z GIT se nevstřebává.^[16]

2.4.2.3 Nystatin

Ve svých účincích je podobný předchozí látce. Má fungistatické a fungicidní účinky. Tím, že se fixuje na steroly a mění permeabilitu buněčné stěny, působí účinně proti kvasinkám rodu *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* a mikromycet rodu *Aspergillus*. Při topickém ani při perorálním podání se prakticky nevstřebává do systémového oběhu a proto je nystatin vhodným lokálním antimykotikem ústní sliznice a GIT i pro těhotné ženy. [16, 24]

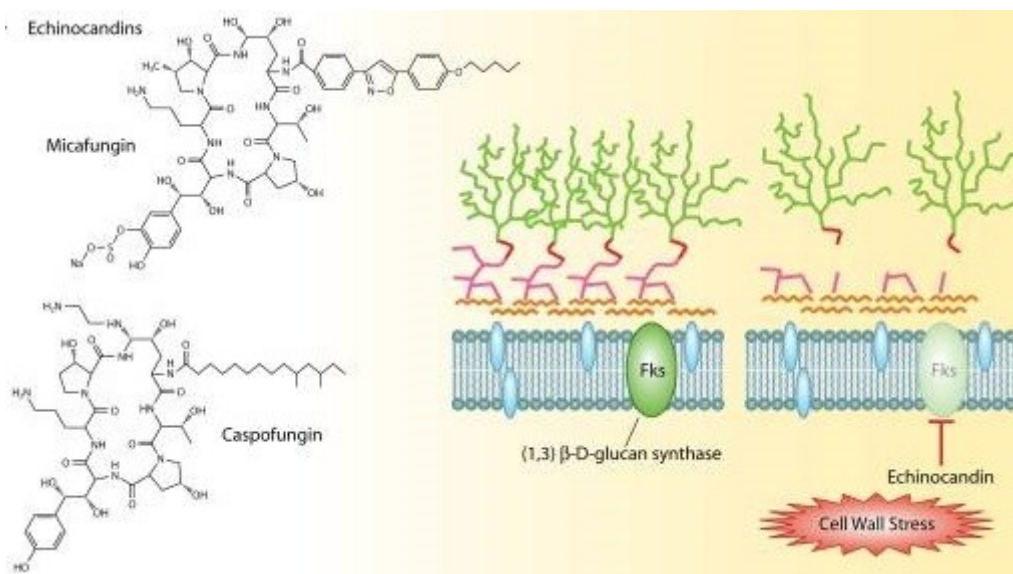
2.4.3 Echinokandiny

Mechanismus účinku, který znázorňuje Obr. 8, se významně liší od polyenových i azolových preparátů, což předurčuje látky z této skupiny do kombinace s jinými antimykotiky. Spočívá v inhibici β -(1,3)-glukansyntetázy. To vede k depleci glukanu v buněčné stěně, její osmotické nestabilitě a zvýšené permeabilitě buňky. V současné době existují tři látky působící na β -(1,3)-glukansyntetázu: kaspofungin, mikafungin a anidulafungin. [18, 20]

Jak by bylo možno předpokládat z jejich mechanismu účinku, zdá se, že tyto látky jsou dobře tolerovány a mají relativně nižší toxicitu než polyeny nebo azolové preparáty. [18, 20, 29]

Echinokandiny jsou lékem první volby u hemodynamicky nestabilních pacientů s kandidémií a také v situaci, kdy anamnéza potvrzuje předchozí léčbu azolovými preparáty. Účinek je u kandid fungicidní a u plísní fungistatický. Bohužel se objevují informace o kandidách, které jsou méně citlivé či zcela rezistentní i na echinokandiny (*Candida parapsilosis*, *Candida hamata*, *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*), echinokandiny rezistentní mutanta *Candida albicans*). Spektrum účinku kaspofunginu je široké, vedle kandid a aspergilů je účinný i na *Saccharomyces cerevisiae* a na cisty *Pneumocystis jiroveci*. Není účinný na kryptokoky. [18, 20]

Kaspofungin není vstřebáván z GIT kvůli jeho velké molekule. Biotransformace parenterálně podaného léčiva probíhá v játrech. [10, 18, 20]



Obrázek 8: Znázornění zásahu echinokandinů do buněčné stěny mikroskopické houby.
Převzato z [18].

2.4.4 Allylaminy

Tato antimykotika inhibují v časně fázi skvalenepoxidázu, dále dochází v buněčné membráně k deficienci ergosterolu a hromadění skvalenu. Tím allylaminy působí fungicidně. [20, 24, 30]

2.4.4.1 Naftifin

Antimykotikum určené pro lokální léčbu. Účinně působí proti dermatofytům, plísním a kvasinkám fungistaticky nebo fungicidně v závislosti na koncentraci. Má silné protizánětlivé účinky a působí i proti bakteriím, které by mohly vyvolat druhotnou infekci. [24]

2.4.4.2 Terbinafin

Širokospektré antimykotikum působící v nízké koncentraci proti dermatofytům, plísním a dimorfním houbám. Na kvasinky má fungistatické či fungicidní účinky v závislosti na druhu. Terbinafin se dobře vstřebává z GIT a váže se na tuky a keratin. [20, 24]

2.4.5 Ostatní antimykotika

2.4.5.1 Morfoliny

Morfoliny jsou sloučeniny, které inhibují dva enzymy účastnící se biosyntézy ergosterolu, konkrétně C-14 sterol reduktázu a C-8 sterol izomerázu.

Jsou zastoupené jednou, velmi účinnou sloučeninou – amorolfinem. Jedná se o širokospektré antimykotikum s fungistatickým účinkem. Amorolfin je vhodný pro doplňkovou nebo kombinovanou léčbu onychomykózy.^[9]

2.4.5.2 Flucytosin

Flucytosin neboli 5-fluorocytosin (5-FC) je fluorovaný analog pyrimidinové báze cytosinu, který zasahuje do funkcí buněčného jádra interferencí se syntézou RNA.

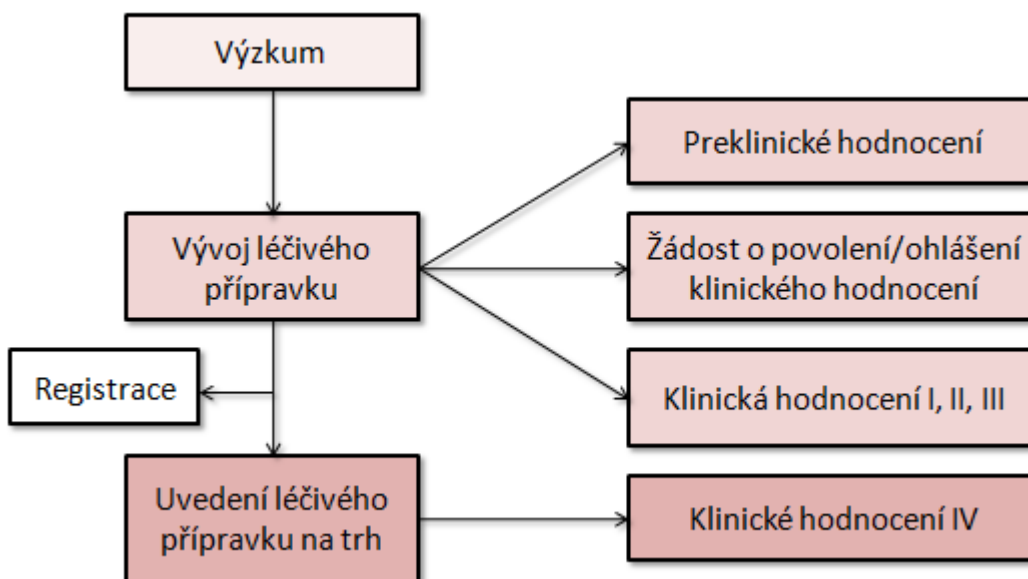
Mechanismus účinku spočívá v aktivním transportu 5-FC do buněk prostřednictvím cytosinové permeázy a je deaminován na 5-fluorouracil (5-FU), který soutěží s uracilem o zabudování do RNA, čímž dojde k inhibici syntézy nukleových kyselin. V omezené míře 5-FC snižuje syntézu DNA přímou cestou, jako antagonist cytosinu. Blokáda transportu a narušení několikastupňové intracelulární přeměny na účinnou látku jsou příčinou vysokého výskytu sekundární rezistence.^[31]

Toto léčivo je selektivně toxické pro houby, protože buňky savců neobsahují cytosinovou permeázu a nekonvertují 5-FC na 5-FU.^[31]

5-FC je lék k systémovému užití. Využívá se v kombinaci nejčastěji s amfotericinem B k léčbě kryptokokové meningitidy. Pokud je podáván samostatně, vykazuje slabou terapeutickou aktivitu. Kvasinky vyvíjejí relativně rychle a často rezistenci k tomuto léku, což je další důvod, proč není doporučena monoterapie. Jeho spektrum zahrnuje kvasinky rodu *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, či vláknité mikromycety rodu *Aspergillus*.^[31, 32]

2.4.6 Nové, antimykoticky účinné sloučeniny ve vývoji

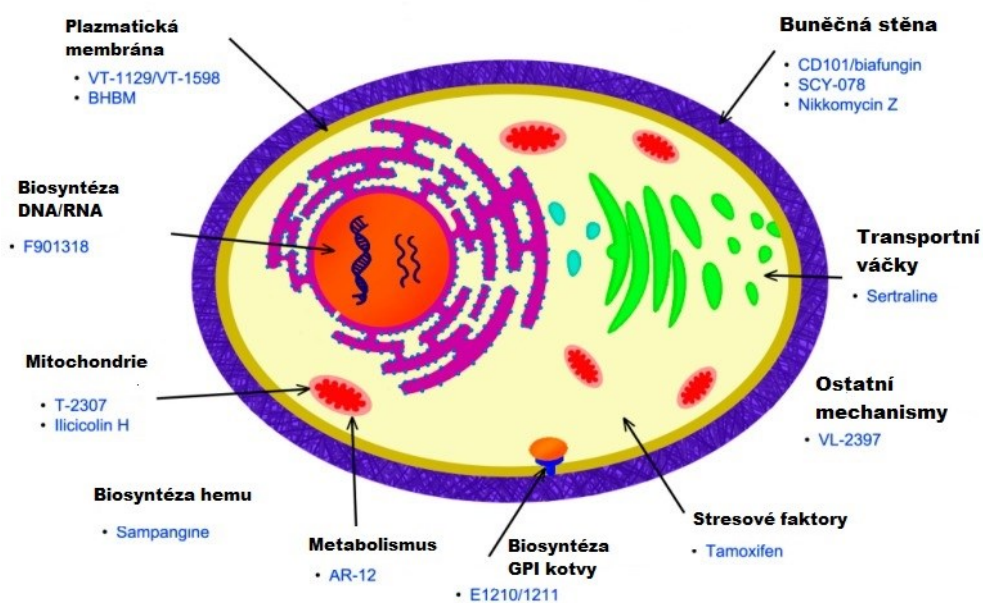
Vývoj nových, antimykoticky účinných sloučenin je velmi pomalý proces. Obecně se vývoj léků uskutečňuje ve čtyřech fázích klinického hodnocení (I-IV), při kterých je nutné prokázat bezpečnost, účinnost, nežádoucí účinky, farmakokinetické vlastnosti léků a mnoho jiných aspektů (Obr. 9).



Obrázek 9: Klinické hodnocení vývoje léčivých přípravků

Kromě aktuálně schválených antimykotických přípravků, jsou nové sloučeniny v různých stádiích klinických studií (viz Obr. 10).^[33, 34]

Za ideálních podmínek by nová antimykotika měla splňovat několik kritérií. Patří mezi ně dostatečná účinnost, nízká nebo žádná toxicita pro organismus, vysoká selektivita, široké spektrum účinku a rychlý účinek působení. Bohužel není možné splnit všechna tato kritéria.^[31, 33]



Obrázek 10: Nové molekuly ve vývoji a cíle jejich působení.

Převzato a upraveno^[33]

2.4.6.1 Buněčná membrána jako cíl účinku pro sloučeniny ve vývoji

Sloučeniny VT-1129, VT-1598 a VT-1161 (Viamet Pharmaceuticals) mají schopnost stejně jako azolové preparáty inhibovat enzym zodpovědný za konečný krok biosyntézy ergosterolu 14- α -demethylázu. Na rozdíl od azolů starší generace, jejichž vysoká afinita k hemovým skupinám vedla k inhibici lidských enzymů CYP, mají tyto sloučeniny nižší afinitu k hemu. Tyto vlastnosti umožňují sloučeninám VT-1129 a VT-1161 selektivně inhibovat fugální CYP51. VT-1129 inhibuje růst mnoha izolátů rodu *Cryptococcus*. VT-1598 se vyvíjí pro léčbu mykóz způsobených houbou *Coccidioides immitis*. VT-1161 se nachází ve fázi Ib klinických studií pro léčbu onychomykóz a recidivující vulvovaginální kandidózy.^[33]

2.4.6.2 Inhibitory syntézy buněčné stěny

Mezi inhibitory syntézy buněčných stěn patří látka CD101 (biafungin), patřící do skupiny echinokandinů. Oproti již existujícím přípravkům této skupiny disponuje vhodnější farmakokinetikou. Poločas sloučeniny *in vivo* je 81 hodin a to umožňuje podání léku pouze jednou týdně. Jako jiné echinokandiny vykazuje i biafungin málo lékových interakcí. Nachází se ve fázi III klinických studií pro léčbu kandidémie.

Polosyntetický derivát SCY-078 (Scynexis) je nový inhibitor β -1,3-glukansyntázy strukturálně odlišný od současně dostupných echinokandinů. *In vitro* vykazuje aktivitu proti izolátům *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. včetně několika flukonazol rezistentních kmenů. Tento léčivý přípravek je v současné době ve fázi II klinických studií pro orální podání k léčbě invazivní kandidózy, zatímco intravenózní forma podání se nachází ve fázi I klinického vývoje.^[33]

2.4.6.3 Mitochondrie jako cíl účinku pro sloučeniny ve vývoji

V klinickém testování se nachází nová, antimykoticky účinná látka T-2307 patřící do skupiny akrylamidů. Tato sloučenina ovlivňuje mitochondriální membránu některých mikroskopických hub a zabraňuje jim tak v produkci energie pro důležité buněčné procesy. Antimitochondriální aktivita je vysoce specifická, díky specifickému membránovému proteinu Agp2 typickému pro mycety, zprostředkovávající vysoce afinitní transport polyaminů za použití sperminu a spermidinu. *In vitro* vykazuje aktivitu proti druhům *Candida*, včetně izolátů *Candida* rezistentních na echinokandiny, *Cryptococcus neoformans* a *Fusarium solani*.

Další sloučeninou této skupiny je Ilicicolin H působící na mitochondrie tím, že inhibuje aktivitu komplexu cytochromu bc1. Inhibice tohoto enzymatického komplexu snižuje mitochondriální činnost a brání syntéze energie ve formě ATP. Výhodou preparátu je dostatečná selektivita. Nevýhodou je v některých případech bohužel rezistence.^[33]

2.4.6.4 Ostatní sloučeniny ve vývoji s nejasnými mechanismy účinku

VL-2397 (od společnosti Vical, San Diego, USA) je nová antimykotická látka, která získala označení QIDP (Qualified Infectious Disease Product) pro vývoj léčby aspergilózy. Sloučenina vykazuje *in vitro* antifungální aktivitu proti druhům *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Trichosporon ascii* a omezenou aktivitu proti *Fusarium solani*. Přípravek je v současné době ve fázi II klinických studií.^[33]

Přípravek AR-12 (společnost Arno Therapeutics, Flemington, USA) vykazující silnou fungicidní aktivitu, byl primárně testován ve fázi I klinických studií, jako protinádorové činidlo. První studie vedly k názoru, že antifungální aktivita je uskutečněna díky inhibici PDK 1 (fosfatidylinositol-dependentní kináza 1), ale následné studie prokázaly, že podstatou antimykotického účinku je pravděpodobně inhibice acetyl-koenzym A syntázy. AR-12 je širokospektré antimykotikum, působící proti kvasinkám (např. *Candida albicans*, non-*albicans Candida* druhy, *Cryptococcus neoformans*), dimorfním houbám (*Blastomyces*, *Histoplasma* a *Coccidioides*) a izolátům druhu *Candida* rezistentní na flukonazol a echinokandiny.^[33]

Sloučeniny E1210 a E1211 mají schopnost selektivní inhibice tvorby fungální GPI (glykofosfatidylinositol) kotvy. E1210 působí *in vitro* proti kmenům *Candida*, *Candida* rezistentní na azoly a echinokandiny, *Aspergillus*, *Fusarium* a *Scedosporium*.

Poslední sloučenina, kterou zde uvádím, je alkaloid sampangin. Výsledky studií naznačují, že antifungální aktivita sampanginu pravděpodobně zahrnuje porušení metabolismu nebo funkce hemu, ale přesný mechanismus tohoto účinku není v současné době znám.^[33, 35]

2.5 Rezistence mikroskopických hub vůči antimykotikům

Antimykotická rezistence může být definována dvěma způsoby, a to z hlediska laboratorního či klinického. Z klinického hlediska se rezistence projevuje perzistencí nebo progresí infekce, ačkoliv byla zvolena vhodná farmakoterapie.^[18]

V laboratorním prostředí se rezistence kvantifikuje pomocí MIC (minimální inhibiční koncentrace). MIC je definována jako nejnižší koncentrace léčiva z testované škály, která již zastavuje růst testovaného mikrobiálního kmene viditelný pouhým okem. Ačkoli MIC testy poskytují informaci, jak patogen reaguje na léčbu antimykotiky, nejsou vždy přesnými prediktory odpovědi *in vivo*. Testy MIC nezohledňují farmakokinetiku, interakce mezi hostitelem a patogenem, mikrobiální interakce a faktory prostředí ovlivňující rezistenci na léky. Klinická rezistence, definovaná jako selhání léčby u pacienta, nemusí vždy korelovat s *in vitro* rezistencí, měřenou jako zvýšení minimální inhibiční koncentrace léčiva.^[18, 36]

Rezistence může být vrozená nebo získaná. Vrozená neboli primární rezistence představuje geneticky předurčenou odolnost patogenu k antimykotiku. Vyskytuje se u některých hub přirozeně, a proto je důležité identifikovat druh patogenu z klinických vzorků. Příklady zahrnují rezistenci *Candida krusei* na flukonazol a *Cryptococcus neoformans* na echinokandiny. Získaná neboli sekundární rezistence vzniká v souvislosti s nepřiměřeným či nesprávným použitím antimykotik. Objevuje se po kontaktu s antifungální látkou u dříve citlivých kmenů a je obvykle důsledkem změny genové exprese. Příkladem tohoto typu rezistence je necitlivost *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* k flukonazolu.^[37, 38]

Velmi podstatnou součástí úspěšné léčby představuje přesná diagnostika. Histologické vyšetření ze vzorku infikované tkáně umožňuje zařazení patogenu do příslušného rodu, ale na základě této informace nelze vždy jednoznačně rozhodnout o volbě vhodného antimykotika. Kultivačními metodami a s použitím specifické PCR (polymerázová řetězová reakce) je možné určit patogen co nejpřesněji. V případě kultivačního záchytu je nezbytné provést vyšetření citlivosti/rezistence. Při volbě vhodného antimykotika se musí kromě citlivosti agens na antimykotikum zohlednit celá řada dalších faktorů, které významně ovlivňují efekt léčby. Nízké lékové hladiny v krvi nebo v postižených tkáních, mohou být příčinou neefektivní léčby i v případě použití antimykotika, na který je patogen dostatečně citlivý.^[11]

2.5.1 Faktory a mechanismy ovlivňující antimykotickou rezistenci

K antimykotické rezistenci přispívají faktory klinické, buněčné a molekulární. Klinické faktory tvoří neschopnost efektivně léčit onemocnění, které je vzniklé nejčastěji na podkladě protražované poruchy buněčné imunity.

Dalšími faktory vedoucími k rezistenci jsou faktory buněčné. Jsou charakterizované tím, že původně citlivý kmen byl nahrazen rezistentním. Dále může být na buněčné úrovni léková rezistence výsledkem změny endogenního kmene mutací nebo genovou expresí na rezistentní fenotyp.

Poslední skupinu představují molekulární faktory, které v konečném důsledku tvoří rezistentní fenotyp v buňce.^[39]

2.5.1.1 Antimykotická rezistence vyvolaná buněčnými vlivy

Mezi nejčastější mechanismy rezistence patří snížení prostupnosti molekul do buňky, modifikace nebo degradace léčiva ve chvíli, kdy se dostane do buňky, změny interakce sloučeniny s cílovým enzymem a zvýšené odčerpávání sloučeniny z buňky.

U imunokompromitovaných pacientů se často vyskytují endogenní infekce způsobené kmeny, které jsou součástí vnitřní mikroflóry. Tyto kmeny pak mohou být rezistentní z více důvodů. Původně citlivé mikroorganismy jsou postupně nahrazovány rezistentními díky stávající antimykotické terapii. Další možnost je, že endogenní kmen má vlastnosti spojené s primární rezistencí.^[39]

Po dlouhodobé expozici antimykotickým léčivem vzniká sekundární rezistence. Na rozvoji tohoto typu rezistence se podílí genetické alterace. Díky specifickým, ale náhodným mutacím může vzniknout dominantní kmen populace. Získanou rezistencí může způsobit i genová exprese mykotických buněk, která může být přechodná. Tento jev se nazývá epigenetická rezistence. Buňky mohou změnit svůj fenotyp v přítomnosti antimykotika a stávají se dočasně necitlivými. Po eliminaci léčiva se vrací do původního stavu.^[39]

Některé mikroskopické houby mají schopnost fenotypového přepnutí. Mohou tedy procházet morfologickou přeměnou, která určuje citlivost k antimykotiku v závislosti na buněčné formě. Schopnost fenotypového přepnutí má např. kvasinka *Candida albicans*. Výzkum její DNA ukázal, že existují dva fenotypy. První forma roste ve formě bílých hladkých kolonií (kvasinková forma) a druhá vytváří ploché šedé kolonie (vláknitá forma).^[39, 40]

2.5.1.2 Molekulární mechanismy antimykotické rezistence

Mykotická agens jsou schopna rozvíjet mechanismy proti fungistatickému a fungicidnímu působení antimykotických preparátů na molekulární úrovni (tab. 2), mezi které patří:

1. změna cílového místa působení (modifikace substrátu), která zabrání navázání antimykotické látky,
2. zvýšená produkce cílového enzymu,
3. změna propustnosti buněčné membrány – zabránění vstupu antimykotika dovnitř buňky,
4. zvýšená exprese genů, které kódují efluxní pumpy.

Tabulka 2: Molekulární mechanismy rezistence u hlavních antimykotických látek.
Převzato a upraveno z [36]

Antifungální látka	Způsob účinku	Mechanismus rezistence
Polyeny	vazba k ergosterolu	změna ve struktuře ergosterolu - absence ergosterolu díky funkční mutaci v ERG3 a ERG6
Azoly	inhibice funkce cytochromu p450	aktivace efluxních pump multidrug-transportéry (geny CDR, MDR)
		snížení afinity k vazebným místům (mutace v genech Erg11, CYP51)
		změna regulace cílových enzymů (mutace v genech ERG11, CYP51)
		aktivace vedlejší biosyntetické dráhy ergosterolu (gen ERG3)
Allylaminy	inhibice skvalenepoxidázy (ERG1)	neznámé
Fluorocytosin	defekt syntézy nukleových kyselin	genově podmíněná enzymatická modifikace – defekt cytosin permeázy
		nedostatek enzymů, které se podílejí na metabolismu flucytosinu
		změna regulace pyrimidinové biosyntetické dráhy
Echinokandiny	inhibice β -1,3-glukansyntetázy	změna afinity echinokandinů na β -(1,3)-glukansyntetázu (mutace v genech FKS1, FKS2)

Legenda: ERG3, ERG6, ERG11 – geny z rodiny ERG; CDR – Candida drug resistance, rodina genů kódující ABC transportéry podílející se na rezistenci; MDR – multi-drug resistance, geny kódující MFS (major facilitator superfamily) transportéry podílející se na rezistenci; CYP51 – gen kódující enzym z rodiny cytochromu P450; FKS1 a FKS2 – geny kódující β -1,3-glukan syntetázu.

- **Modifikace substrátu**

Modifikace substrátu lanosterol 14- α -demethylázy spočívá v bodové mutaci genu ERG11. Tato bodová mutace vede k nahrazení argininu lyzinem v aminokyselině 467 genu ERG11 (zkráceně R467K, kde R = Arg a K = Lys). Mutace je umístěna v blízkosti cysteinu, který koordinuje uložení atomu železa do páté pozice v hemovém kofaktoru a předpokládá se, že mutace způsobuje strukturální nebo funkční změny spojené s hemem, popř. s celým enzymem. Nedávné studie dokazují, že tato mutace vede k rezistenci na azolové preparáty.^[39]

Bylo detekováno více než 80 substitucí aminokyselin v ERG11. Jako příklady zde uvádím substituci glycinu a serinu v poloze 464 (G464S) v genu ERG1, která potvrdila v izolátu *Candida albicans* rezistenci vůči azolovým preparátům. Substituce treoninu za alanin v poloze 315 (T315A) způsobuje snížení aktivity enzymu a i redukcí afinity k flukonazolu a u *Candida albicans* se podstatně sníží jeho aktivita. Různé mutace mohou koexistovat v jednom genu s aditivními účinky.^[38, 41]

Rezistence způsobená modifikací substrátu vůči pyrimidinovým antimykotikům se může snadno vyvinout jako výsledek mutací v genech, které se podílejí na vychytávání 5-FC. Např. nejčastější příčinou rezistence vůči 5-FC u *Cryptococcus neoformans* jsou mutace v lokusech FCY1 a FCY2. Gen FCY1 kóduje cytosin deaminázu a gen FCY2 kóduje cytosin permeázu při přeměně intracelulárního 5-FC na 5-FU.^[38]

Druhým aspektem je ztráta aktivity uracil fosforibosyltransferázy kódované genem FUR1. Tento enzym za normálních okolností transformuje 5-FU na 5-fluorouridinmonofosfát a je příčinou sekundární rezistence *Candida albicans* vůči 5-FC.^[39, 42]

- **Zvýšená produkce cílového enzymu**

Mechanismem zvýšené produkce enzymu disponuje např. rod *Candida*, pokud projde genetickou změnou v genu ERG11. ERG11 je gen, který kóduje lanosterol demethylázu u všech fungálních druhů. Bylo zjištěno několik genetických změn, které jsou s tímto genem spojeny. Patří mezi ně bodové mutace v kódující oblasti, mitotická rekombinace, nadměrná exprese, amplifikace nebo zvýšená rychlost transkripce genu. Produkci lanosterol 14- α -demethylázy je možné zvýšit i díky aneuploidii chromozomu 5 tak, že se gen ve více kopiích přepisuje do mRNA ve větším množství. Zvýšená

produkce lanosterol 14- α -demethylázy může způsobit zvýšenou produkci ergosterolu a to vede k potřebě vyššího množství volných dusíků pocházející ze struktury azolového preparátu. [39, 43, 44]

Kromě mutací genu kódující lanosterol 14- α -demethylázu, mohou být za rezistenci odpovědny i změny v jiných enzymech biosyntetické dráhy ergosterolu.

- ***Změna propustnosti buněčné membrány***

Defektem enzymu lanosterol 14- α -demethylázy, v případě působení azolových preparátů, je možné dosáhnout změny ve složení cytoplazmatické membrány a ovlivňovat tak její fluiditu a funkci. Hromadění toxických 14- α -methyl sterolů (14- α -methyl-3,6-diolu a 14- α -methylfekosterolu) vede k inhibičnímu působení.

Mutace v ERG3 genu má za následek produkci enzymu Δ -5,6-steroldesaturázy se změněnou aktivitou. To brání vzniku 14- α -methyl-3,6-diolu z 14- α -methylfekosterolu a dochází k akumulaci 14- α -methylfekosterolu. V tomto případě je ergosterol v membráně nahrazen 14- α -methylfekosterolem, přičemž nedochází k porušení funkce membrány hromaděním toxických produktů. [38, 39, 44]

Změnu propustnosti v cytoplazmatické membráně mohou způsobit i různé poměry mastných kyselin a fosfolipidů navzájem. V cytoplazmatické membráně izolátu *Candida albicans* rezistentní vůči flukonazolu byl kromě snížené hladiny ergosterolu i snížený poměr fosfatidylcholinu a fosfatidylenolaminu. [38, 45]

- ***Rezistence zprostředkovaná zvýšenou expresí efluxních pump***

Redukce akumulace léčiva v buňce se dosáhne zvýšenou expresí efluxních pump. Hlavní dva typy těchto pump u eukaryotických buněk jsou ABC transportéry (ATP-binding cassette) a MFS transportéry. Skupina ABC a MFS tvoří téměř polovinu transportérů v genomu mikroorganismů. Tyto membránové proteiny aktivně přesouvají léčiva přes buněčné membrány za použití různých druhů energie. ABC transportéry mají širší specifitu než MFS, a proto mají větší klinický význam. [46, 47]

ABC proteiny jsou rodina primárně aktivních membránových transportérů, které jsou schopné transmembránového přenosu různých druhů sloučenin proti koncentračnímu spádu, za hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP) na adenosindifosfát (ADP). Hrají důležitou roli v transportu léků, lékových konjugátů a podílí se na aktivním vylučování molekul, které jsou pro buňky toxické. Základní struktura ABC transportérů se skládá ze dvou charakteristických cytoplazmatických domén: nukleotid

vázající doména (NBD) a transmembránová doména (TMD). ABC transportéry jsou kódovány geny *Candida drug resistance* (CDR). Nadměrná exprese genů CDR1 a CDR2 může hrát důležitou roli v rezistenci *Candida albicans* na flukonazol. [47, 48]

MFS transportéry jsou membránové proteiny, které slouží pro transport mnoha nízkomolekulárních sloučenin, včetně léčiv. Jako zdroj energie využívají elektrochemický gradient cílového substrátu nebo působí jako kotransportér, kdy je transport spojen s pohybem druhého substrátu. Gen kódující MFS transportér, který se podařilo identifikovat v patogenních houbách jako první, byl Multi-drug resistance (MDR1). Tento gen je pravděpodobně ze 71 proteinů MFS jako jediný zodpovědný za rezistenci *Candida albicans* k azolovým preparátům. [49, 50]

2.6 Testování antimykotické citlivosti *in vitro*

Laboratorní testy určené ke stanovení citlivosti k antimykotikům jsou zaměřené na mikroskopické houby, které mohou způsobit onemocnění, zejména pokud patří k druhům rezistentním na běžné antimykotické látky. *In vitro* antifungální testování citlivosti (AFST – antifungal susceptibility testing) je důležité pro sledování rezistence, epidemiologické studie a pro porovnání *in vitro* aktivity nových a stávajících antimykotických látek. AFST může pomoci lékařům při volbě vhodné terapie, zejména u těžko léčitelných invazivních kandidóz a aspergilóz.

Na trhu jsou komerčně dostupné metody AFST dostatečně účinné pro sledování antimykotické rezistence. V posledních letech se vyvíjí nové metody, jako je průtoková cytometrie (FC – flow cytometry), izotermická mikrokolorimetrie (IMC) nebo MS-MALDI-TOF (Mass spectrometry – matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu), které mohou spolehlivě a rychle poskytnout hodnocení AFST. [51, 52, 53]

2.6.1 Vývoj standardizovaných metodik

Vývoj standardních metodik pro testování citlivosti mikroskopických hub k antimykotikům dlouhou dobu zaostával za rozvojem metod ke sledování rezistence bakteriím k antibiotikům, díky dřívější nízké frekvenci výskytu mykotických onemocnění a jejich omezené léčbě. Dlouhou dobu chyběla akceptovaná metodika testování a laboratoře se ve svých výsledcích MIC shodovaly v nízké míře.

První instituce, která se zabývala standardizací těchto metod byl v roce 1982 americký Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy (National Committee for Clinical Laboratory Standards– NCCLS), dnes přejmenován na Ústav pro klinické a laboratorní standardy – CLSI. Subkomise v rámci NCCLS zveřejnila v roce 1992 dokument M27 zahrnující metodiku pro stanovení citlivosti kvasinek, známou jako diluční bujónová metoda. Od té doby byly vypracovány další tři dokumenty. Dokument M38 pro testování citlivosti vláknitých hub diluční metodou, M44 a M51 pro stanovení citlivosti kvasinek difúzní diskovou metodou.^[51, 54]

V roce 1997 se problematikou testování antimikrobiální citlivosti začala zabývat Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčního lékařství (European Society of Clinical Microbiology and Infectious – ESCMID). V rámci ESCMID byla vytvořena již zmíněna Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti – EUCAST a v rámci níž vznikla subkomise pro testování antifungální citlivosti (AFST). Postup provádění dilučních metod se americkou a evropskou institucí principiálně shodují, nicméně v některých aspektech se liší. Tyto aspekty, týkající se diluční metodiky určené pro testování citlivosti kvasinek *in vitro* jsou uvedeny v tabulce č. 3. Výsledné hodnoty MIC získané podle postupů v dokumentech CLSI a EUCAST vykazují vysokou korelaci, až 95 %.^[54]

Tabulka 3: Rozdíly mezi dilučními metodikami CLSI a EUCAST.
Převzato z^[54]

Metodický krok	CLSI	EUCAST
Denzita inokula [CFU/ml]	0,5-2,5 · 10 ³	0,5-2,5 · 10 ⁵
Glukóza v médiu [%]	0,2	2,0
Tvar dna jamky mikrotitrační destičky	kulatý	rovný
Inkubace [hod]	24, 48	24
Hodnocení MIC	vizuálně	fotometricky

Legenda: CFU – colony forming unit, kolonie tvořící jednotka; MIC – minimální inhibiční koncentrace, CLSI – Ústav laboratorních a klinických standardů, EUCAST – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti.

2.6.2 Hodnocení citlivosti

K hodnocení citlivosti pomáhají klinické breakpointy (BP), označované jako hraniční koncentrace nebo mezní hodnoty. Jsou stanoveny dohodou a využívají se v klinické laboratoři za účelem vyhodnocení a doporučení vhodné léčby onemocnění. Tabulky breakpointů jsou každoročně aktualizovány 1. ledna.

Instituce EUCAST a CLSI uvádí kategorie klinické rezistence a klinických breakpointů. Klinicky citlivý kmen vykazuje nízkou antimykotickou rezistenci spojenou s vysokou pravděpodobností terapeutického účinku. Pokud aktivita antimykotika poskytuje vysokou pravděpodobnost terapeutického selhání, označuje se kmen jako rezistentní. A nakonec pokud je úspěch léčby antimykotikem nejistý, kmen se označuje jako intermediálně rezistentní. V tabulkách EUCAST není intermediálně rezistentní kategorie definována, jelikož jí tvoří hodnoty mezi breakpointy pro citlivost a rezistenci. [55]

2.7 *In vitro* stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům

Metoda pro testování citlivosti *in vitro* by měla být pro klinickou laboratoř levná, rychlá a reprodukovatelná. Pro zjišťování a hodnocení citlivosti nebo rezistence se používají metody kvantitativní a kvalitativní.

Kvalitativní metody představují např. agarové difúzní metody, mezi které patří diskový difúzní test. Kvantitativní metody umožňují stanovit přesnou hodnotu MIC, tedy stupeň citlivosti/rezistence testovaného kmene k použitému antimykotiku. Mezi tyto metody se řadí gradientový difúzní test (E-test) nebo bujónová diluční metoda.^[56]

2.7.1 Agarové difúzní metody

Principem těchto metod je difúze antimykotické látky ze zdroje do okolí, kde zabraňuje růstu mikroorganismu.

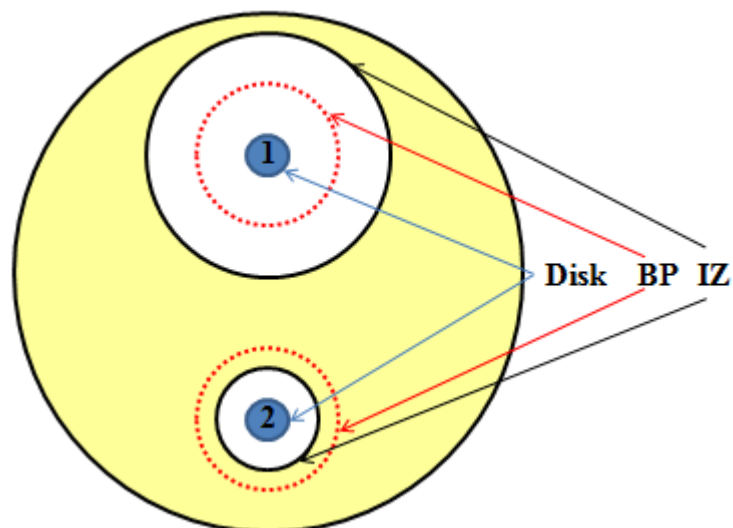
2.7.1.1 Diskový difúzní test.

Mezi kvalitativní metody patří diskový difúzní test. Tento test byl vyvinut ve 40. letech minulého století. Diskový difúzní test je metoda jednoduchá, rychlá a finančně nenáročná. Technologie pro testování mikroskopických hub je k dispozici v podobě dokumentů CLSI M44 pro kvasinky rodu *Candida* a M51 pro vláknité houby s

výjimkou dermatofytů. Dle standardní metodiky doporučuje CLSI použít Mueller-Hintonův Agar (MHA – v případě testování kandid s obsahem 2% glukózy a methylenové modři) o standardní výšce a zvolit disky s definovaným obsahem antimykotika. pH půdy nesmí překročit rozmezí 7,2-7,4. V případě kandid se z pěti náhodně vybraných kolonií vytvoří inokulum tím, že se suspendují ve fyziologickém roztoku, přičemž denzita je upravena na $1-5 \cdot 10^6$ CFU/ml. U vláknitých hub jsou ve fyziologickém roztoku suspendovány spóry a po 3-5 min sedimentace se pomocí spektrofotometru upraví denzita odebraného supernatantu tak, aby odpovídala $0,4-5 \cdot 10^6$ CFU/ml. Poté je v obou případech po 15 minutách provedena inokulace na testovací půdy. Před nanesením disků je nutno vyčkat, až inokulum na testovací půdě zaschne. Média jsou inkubována při 35 °C 24–72 hodin dle druhu testované mikromycety. Zóny inhibice (IZ) jsou měřeny posuvným pravítkem v milimetrech. Jednotlivé velikosti IZ se porovnávají s referenčními hodnotami (breakpointy). Princip odečítání a interpretaci inhibičních zón diskového difúzního testu znázorňuje Obr. 11. [54, 57]

K hodnocení IZ je možné využít i automatizované systémy, jako je ADAGIO (od firmy BioRad Laboratories, Francie) nebo BIOMIC (od firmy Giles Scientific, USA). Čtení musí ověřit odpovědná osoba a díky tomu je automatický odečet IZ více časově náročný. Zároveň musí být čtečka pravidelně kalibrována. [54, 57]

Ve srovnání s dilučními metodami jsou diskové metody jednodušší a více komerčně rozšířené, proto jsou vhodné pro běžné použití v klinických laboratořích. Nevýhoda diskového difúzního testu je pouze kvalitativní charakter. Není možné kvantifikovat množství antimykotické látky difundované do agarového média. Pokud testovaný kmen vykazuje sníženou citlivost, či rezistenci, je nutné ho ověřit stanovením MIC. [54, 57]



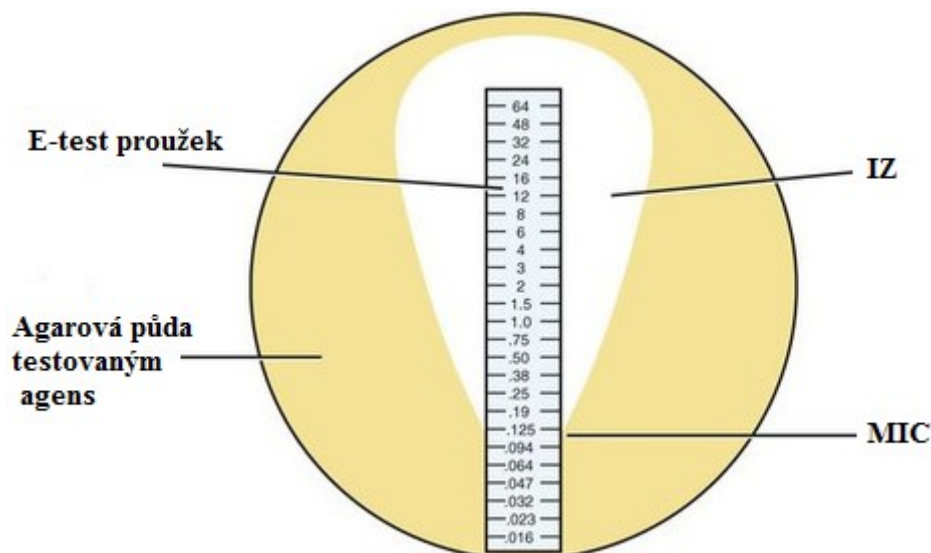
Obrázek 11: Diskový difúzní test.

Porovnání velikosti IZ s breakpointy (BP). Pokud je IZ větší, než hodnota určeného BP (červený kruh), je agens na dané antimykotikum citlivé – disk číslo 1. Pokud je IZ menší než zóna BP, nebo se nevytvoří vůbec, je agens vůči antimykotiku rezistentní – disk 2.

2.7.1.2 E-test (gradientový difúzní test)

E-test a disková difúzní metoda vychází v podstatě ze stejného principu, ale součástí E-testu je inertní plastický pásek, který obsahuje exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimykotické látky v suchém stavu. Na druhé straně pásku je kontinuální stupnice (v $\mu\text{g/ml}$), obvykle odpovídající patnácti ředěním testovaného přípravku. Na povrch agarové půdy se přikládá plastický proužek stranou obsahující antimykotickou látku. Po inkubaci se vytvoří kolem proužku zóna inhibice tvaru kapky až elipsy. Zóna inhibice se dotýká stupnice pásku při koncentraci, kdy testované antimykotikum inhibuje růst bakterií (viz. Obr. 12).^[54, 58]

V laboratořích se E-test využívá k testování nových léků, složitých organismů, které nelze snadno zpracovat rutinními metodami a v neposlední řadě i ke zpracování rozšířeného rozsahu MIC pro přesnější volbu antibiotické léčby pacientům s imunodeficitem. Výhodou je jednoduché provedení ve srovnání se standardní mikrodiluční bujónovou metodou. Nevýhodou E-testu je vysoká cena.^[54, 58]



Obrázek 12: E-test, stanovení hodnoty MIC.
Převzato a upraveno z [59]

2.7.1.3 Agarová difúzní metoda

Další možností kvalitativního stanovení citlivosti je agarová difúzní metoda. Princip testu je stejný jako u diskového difúzního testu. Rozdíl je v aplikaci antimikrobiální látky, která se pipetuje do asepticky vyhloubených jamek v agarovém médiu o průměru 6-8 mm. Agarové plotny jsou inkubovány za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Antimykotická látka difunduje do agarového média a může inhibovat růst testovaného kmene. [57]

2.7.2 Diluční metody

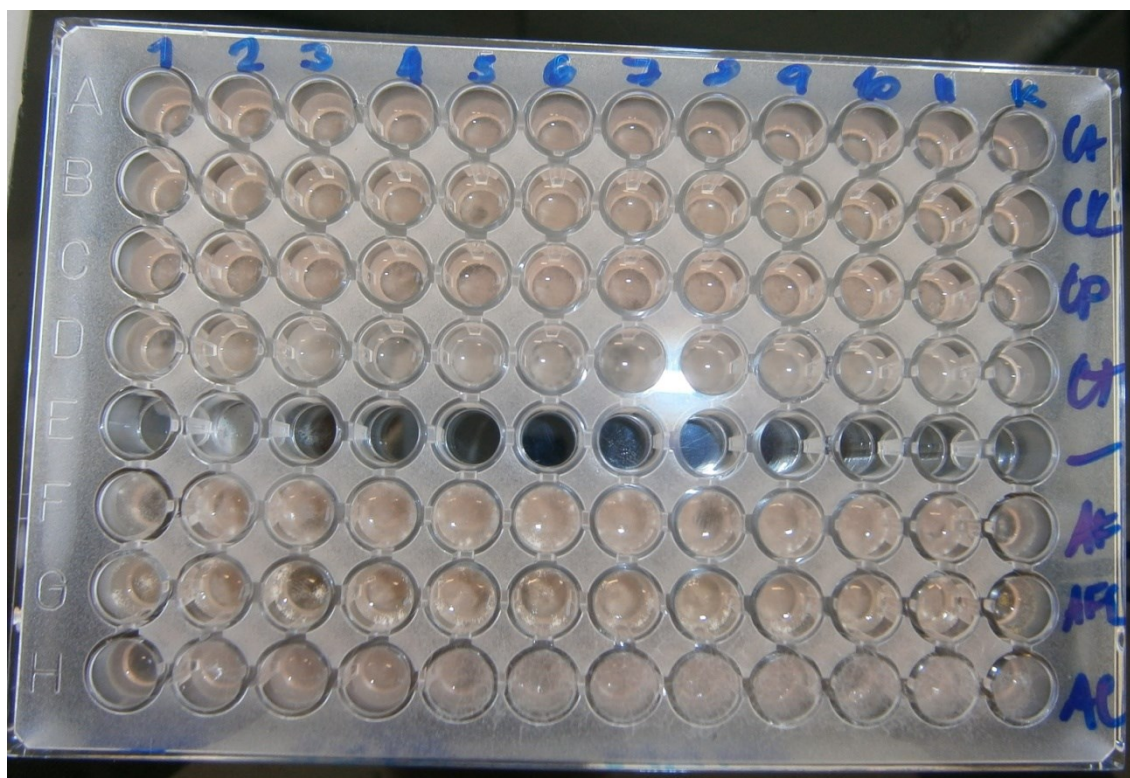
Diluční metody se užívají ke kvantitativnímu stanovení MIC, nebo minimální letální koncentrace (MLC). Nejnižší koncentrace testovaného antimykotického činidla, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů, se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ nebo v mg/l . Médiem pro zjišťování koncentrace testované látky může být agar nebo tekutý bujón. [57]

2.7.2.1 Bujónová diluční metoda

V této diplomové práci byla při hodnocení citlivosti mikroskopických hub vůči vybraným antimykotickým látkám využita bujónová diluční metoda. Existují dva pracovní postupy, z nichž první je starší a označuje se jako makrodiluční bujónový test. Tento se prováděl ve zkumavkách, ale kvůli vysokému riziku chyby při manipulaci a vysoké spotřebě reagensů, bylo nutné metodu miniaturizovat. Druhý postup, označován jako mikrodiluční bujónový test, je téměř totožný, ale místo zkumavek se začaly

používat polystyrenové mikrotitrační destičky s dvanácti sloupci a osmi řádky jamek. Díky miniaturizaci a vyšší reprodukovatelnosti se začal druhý postup rychle rozšiřovat.

Většinou se pro jedno antimykotikum používá osm koncentrací dosažených dvojkovým ředěním základního roztoku. Z tohoto důvodu se test označuje jako diluční. Po ředění antimykotické látky v růstovém médiu a zaočkování inokulem se obsah jamek důkladně promíchá a inkubuje za vhodných podmínek v závislosti na testovaném kmenu. Vyhodnocení hodnot MIC lze provádět vizuálně nebo spektrofotometricky. Spektrofotometrický odečet se provádí na základě měření zákalu (turbidimetrie), nebo změny barvy (kolorimetrie). Ve druhém případě jsou při testování použity barevné reagensie, jako jsou tetrazoliové soli, či Alamar Blue (resazurin).^[57, 60]



Obrázek 13: Mikrodiluční bujónová metoda

Zdroj: Kateřina Comová, pořízeno v mykologické laboratoři, (Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova)

Legenda: V rámci řádků A, B, C, D, F, G, H byla inokulována testovací mykotická agens kvasinky nebo vláknité houby. Sloupec číslo 1 obsahuje nejvyšší koncentraci testované antimykotické látky. Naopak ve sloupci číslo 11 je testovaná látka o nejnižší koncentraci. Sloupec označený písmenem K představuje pozitivní kontrolu, která neobsahuje žádnou testovací antimykotickou látku. Šestý řádek, označovaný E, je prázdný, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci inokula kvasinek (nad řádkem E) od inokula vláknitých hub (pod řádkem E).

2.7.2.2 Agarová diluční metoda

U agarové diluční metody se různé koncentrace antimikrobiální látky přidávají do rozehrátého tekutého média, které se poté rozlévá do Petriho misek. Na jednu plotnu se naočkuje jehlovým razidlem až 40 kmenů najednou. Plotna, ve které již není pozorován růst, odpovídá hodnotě MIC. Tato technika je vhodná jak pro testování antibakteriální citlivosti, tak pro testování antimykotické citlivosti. Nevýhodou agarové diluční metody je její náročnost na přípravu, a proto se v praxi běžně nepoužívá. [8, 56, 57]

2.7.3 Komerční soupravy – kvalitativní stanovení

Mezi komerční soupravy je zahrnut Neo-Sensitabs systém (od firmy Rosco Diagnostica, Dánsko), který je variantou diskové difúzní metody, ale místo disků jsou zde použity tablety se standardizovaným obsahem antimykotik. Metoda je celosvětově doporučována pro kvalitativní testování citlivosti kvasinek i vláknitých mikromycet k antimykotikům.^[54]

2.7.4 Komerční soupravy – kvantitativní stanovení

- **Sensititre YeastOne**

Jednoduchou, spolehlivou a komerčně dostupnou metodu pro kvantitativní testování citlivosti představuje mikrodiluční kolorimetrický test –Sensititre YeastOne (od firmy TREK Diagnostic Systems, USA). Jamky mikrotitrační destičky obsahují antimykotika v ředění odpovídajícím standardu CLSI M27-A2 a kolorimetrický indikátor Alamar blue ve vysušeném stavu. Alamar blue se rehydratuje suspenzí kvasinek. Doporučená inkubace při 35°C je 24 h pro kandidy, 72 h pro kryptokoky a 48–72 h pro aspergily. Růst mikromycet se projeví změnou barvy redukcí indikátoru v mikrotitrační jamce (přechod z modré na růžovou), (Obr. 14). MIC se stanoví jako nejnižší koncentrace antimykotika se zachovaným modrým zabarvením. Metoda plně respektuje standardní metodiku CLSI. Její velkou předností je jednoznačnost při odečtu výsledků a mezilaboratorní reprodukovatelnost.^[54]



Obrázek 14: *Sensititre YeastOne*
Převzato z ^[61]

- **Fungitest**

Pro semikvantitativní testování citlivosti slouží Fungitest (od firmy Bio-Rad Laboratories, Francie). Hodnocení se provádí ve dvou jamkách, které obsahují hraniční koncentrace antimykotik. Tímto způsobem lze testované kmeny zařadit do kategorií citlivý, citlivý v závislosti na dávce a rezistentní. Uvedeným způsobem je možno vyhodnotit citlivost kvasinek k celkem šesti antimykotikům (flukonazol, itrakonazol, amfotericin B, ketokonazol, mikonazol a flucytosin). Do Fungitestu (Obr. 15) jsou zahrnuty pozitivní kontroly růstu (růžové) a negativní kontroly růstu (modré). V souvislosti se současně dostupnými testy citlivosti, není souprava doporučena ani pro screeningové vyšetření.^[54]



Obrázek 15: *Fungitest*
Převzato z [62]

- **ATB Fungus**

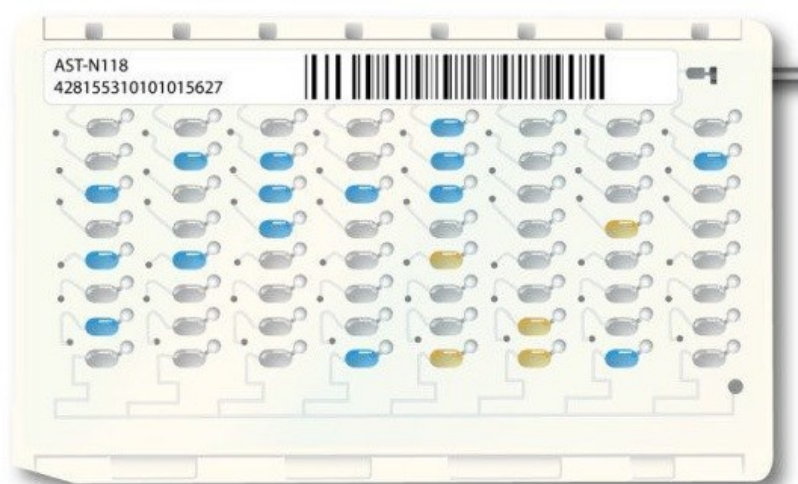
Test ATB Fungus (od firmy bio Mérieux, Francie) představuje plastovou mikrodestičku a turbidimetrické vyhodnocení. Umožňuje stanovení MIC u omezeného spektra systémových antimykotik (Obr. 16): flukonazolu a vorikonazolu (po 8 ředěních), amfotericinu B a itraconazolu (po 6 ředěních), flucytosinu (2 ředění). Ostatní antimykotické látky nejsou do soupravy zařazeny, což představuje jednu z nevýhod systému. Další nevýhodou je nejednoznačnost vizuálního hodnocení, resp. potřeba turbidimetru.^[54]



Obrázek 16: *ATB fungus*
Převzato z [63]

- **VITEK 2 AST-YS**

V některých laboratořích je nově zaváděn automatizovaný komerční systém VITEK 2 AST-YS (od firmy bio Mérieux, Francie). Kromě stanovení MIC je možné díky spektrofotometrickému odečtu určit růst kvasinek a jejich identifikaci. Systém zahrnuje specifické karty (Obr. 17), umožňující identifikaci druhu na základě porovnání biochemického profilu s databází. Vzhledem k tomu, že je systém plně automatizován, po vložení karty do přístroje není potřeba další manuální práce. Výsledek testu je znám do 9–27 hodin. Nevýhodou se zde stává omezené spektrum antimykotik, omezený počet testovaných koncentrací a nemožnost testovat pomalu rostoucí kmeny.^[54]



Obrázek 17: Karta k systému VITEK 2 AST-YS
Převzato z ^[64]

2.7.5 Vývoj nových metod ke stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům

Nové diagnostické přístupy založené na technologiích, jako je FC, MALDI-TOF MS a IMC, byly vyvinuty s cílem zlepšit schopnost klinických mikrobiologických laboratoří poskytnout výsledky *in vitro* antifungální citlivosti.

Průtokovou cytometrií je možné hodnotit účinky daného antifungálního léčiva pozorováním změn životaschopnosti houbových buněk než inhibicí růstu jako u konvenčních metod. Buňky, resp. jejich životaschopnost je identifikována změnami měřené fluorescence – MFEC, což je nejnižší koncentrace antifungální látky, u které je procento buněk vykazujících změněnou fluorescenci vyšší než předem stanovená mezní hodnota.^[53]

Použitím metody MALDI-TOF MS byl zaveden jednoduchý a rychlý test antifungální citlivosti, zvaný ms-AFST. Slouží k rozlišení citlivých a rezistentních izolátů kmene *Candida*. Zjednodušená verze testu ms-AFST umožňuje úspěšné rozdělení citlivých a rezistentních izolátů *Candida albicans* po 3 hodinách inkubace s kaspofunginem ve třech koncentracích: nulová, hraniční a maximální. Výsledky studií naznačují, že test ms-AFST, má potenciál stát se užitečným nástrojem pro rychlou detekci antimykotické rezistence.^[49, 53]

Test IMC spočívá v měření tepelných změn vyvolaných působením antifungálních látek. Minimální tepelná inhibiční koncentrace (MHIC) je nejnižší koncentrace antifungální látky, která snižuje 50 % celkového tepla, produkovaného kontrolním růstem kmenu po 48 hodinách. Tato metoda je zatím těžko reprodukovatelná, a proto je nutné provést další studie, aby ji bylo možné v budoucnu využít jako klinicky užitečný test.^[53]

3. Experimentální část

3.1 Cíl práce

Cíl této diplomové práce je *in vitro* screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin a určení MIC mikrodiluční bujónovou metodou s využitím vybraných referenčních kmenů kvasinek a vláknitých hub. Vyhodnocením reakcí lze určit, zda jsou testované sloučeniny účinné či nikoliv.

3.2 Použitý materiál

- Pomůcky technické
 - sterilní mikrotitrační destičky (firma Gamedium, Česká republika)
 - mikropipety (firma Socorex, Švýcarsko)
 - sterilní špičky (firma Eppendorf, Německo)
 - rezervoár na médium s dvanácti jamkami (firma Gamedium, Česká republika)
 - očkovací kličky (firma Gamedium, Česká republika)
 - sterilní UH a skleněné zkumavky (firma Gamedium, Česká republika)
 - stojánky na zkumavky

- Přístroje
 - laminární box EscoClass II type A2 (firma Esco Technologies, USA)
 - termostat Binder WTB (firma Binder, Německo)
 - denzitometr rDEN-1B McFarland Biosan (firma Biosan Ltd, Lotyšsko)
 - vortex MS2 Minishaker (firma IKA, Německo)
 - ultrazvuková lázeň

- Pomůcky chemické
 - dimethylsulfoxid (DMSO)
 - sterilní voda
 - NaOH
 - RPMI 1640 s glutamanem
 - pufr: MOPS [3-(*N*-morfolino) propansulfonová kyselina]
 - glukóza

3.3 Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub a jejich charakteristiky

Tabulka 4: Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub.

Testovaný kmen	Zkratka	Sbírkový kmen	Lab. ID
<i>Candida albicans</i>	CA1	ATCC 24433 (CCM 8320)	166-2016
<i>Candida krusei</i>	CK	ATCC 6258 (CCM 8271)	169-2016
<i>Candida parapsilosis</i>	CP	ATCC 22019 (CCM 8260)	167-2016
<i>Candida tropicalis</i>	CT	ATCC 750 (CCM 8264)	170-2016
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF	ATCC 204305	169-2017
<i>Aspergillus flavus</i>	AFla	CCM 8363	174-2017
<i>Absidia corymbifera</i>	AC	CCM 8077	173-2017
<i>Trichophyton interdigitale</i>	TI	ATCC 9533 (CCM 8377)	172-2017

Legenda: ATCC – American Type Culture Collection, Americká sbírka typových kultur, CCM – Czech Collection of Microorganisms, Česká sbírka mikroorganismů

3.3.1 *Candida albicans*

Nejčastější původci mykotických onemocnění člověka jsou kvasinky rodu *Candida* a nejčastěji izolovaná kvasinka z biologického materiálu je právě *Candida albicans*. Jak již bylo uvedeno výše, *C. albicans* je dimorfní houba a kvasinkové formy se množí pučením. Charakteristickou vlastností je schopnost germinace, což je tvorba zárodečných klíčků, ze kterých mohou vznikat pravé hyfy. Za určitých podmínek tvoří *C. albicans* rezistentní buňky – kulaté a silnostěnné chlamydospóry. V infikované tkáni mohou být přítomné jak kvasinky, tak i vlákna.

Candida albicans je oportunní patogen a může se v lehčích případech projevat jako superficiální mykóza postihující sliznice a kůži. Invazivní mykózy způsobují vysokou mortalitu a objevují se hlavně u oslabených pacientů.

Barvením dle Grama se prokáže směs pučících blastokonidií a vláken, které mohou vytvářet mikrokolonie. Ke kultivaci se používá Sabouraudův glukózový agar, jehož selektivita se může zvýšit přidáním antibiotik. K odlišení *C. albicans* od ostatních kvasinek rodu *Candida* se používají testy na tvorbu pseudomycelia a chlamydospór na rýžovém agaru a test tvorby zárodečných klíčků.^[8, 60]

3.3.2 *Candida krusei*

Candida krusei vytváří pseudomycelium charakteristické válcovitými konidiemi. Je vzácnou příčinou fungémie, ale u pacientů s hematologickými malignitami se objevuje naopak jako častá příčina fungémie. Vykazuje primární rezistenci vůči flukonazolu a má sníženou citlivost vůči flucytosinu a amfotericinu B.^[65]

3.3.3 *Candida parapsilosis*

Kvasinka *Candida parapsilosis* se vyznačuje vyšší afinitou k anorganickým i organickým povrchům a díky tomu se stala významným původcem nozokomiálních nákaz (oddělení JIP, katetrizovaní pacienti). *C. parapsilosis* je v současné době významný patogen, jehož význam a prevalence v posledních dvou desetiletích dramaticky vzrostl, takže je nyní jednou z hlavních příčin invazivních kandidových onemocnění. Jedinci s nejvyšším rizikem závažné infekce zahrnují novorozence a pacienty na jednotkách intenzivní péče.^[66]

Při kultivaci na Sabouraudově agaru jsou kolonie *C. parapsilosis* bílé nebo krémové, lesklé a hladké. Na rozdíl od *C. albicans* a *C. tropicalis*, které mohou existovat ve více morfogenetických formách, *C. parapsilosis* netvoří pravé hyfy a existuje buď ve fázi kvasinek nebo v pseudohyfální formě.^[66]

3.3.4 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis se řadí mezi patogenní kvasinky. Vyskytuje se jako všeobecný komenzál v dutině ústní, GIT, v plicích, ve vagíně a na pokožce lidí a zvířat. Svou nízkou náročností na podmínky výživy často vytlačuje z fermentačního procesu jiné kvasinky. Využívá se k výrobě krmného droždí z netradičních substrátů, často pod jinými názvy, čímž se zastírají její vlastnosti oportunního patogenu.

Je to druh podobný *C. albicans*, o čemž svědčí mikroskopický vzhled kultury. Liší se tím, že *C. tropicalis* nevytváří chlamydospóry stejného typu jako *C. albicans* a

že zkvašuje sacharózu. Existují i izoláty, které sacharózu nezakvašují, a je tedy složité odlišit tyto kmeny od kmene *Candida albicans*.^[67]

3.3.5 *Aspergillus fumigatus*

Vláknité houby rodu *Aspergillus* se běžně vyskytují v prostředí, a jak již bylo zmíněno výše, mohou ohrozit pacienta infekcí nebo intoxikací, protože jsou schopny produkovat aflatoxiny. Častějším původcem mykóz je *Aspergillus fumigatus*, méně častým *Aspergillus flavus*.

Mikroskopicky lze pozorovat septované hyfy větvičí se v ostrém úhlu. Mycelium je zakončeno vlákny (konidiofory), na jejichž konci je měchýřovitý útvar, z něhož vyrůstají buňky nesoucí řetízky konidií. Pro *Aspergillus fumigatus* je typické uniseriátní uspořádání, což znamená, že buňky nesoucí konidie vyrůstají přímo z hlavice konidioforu.

Vláknité houby rodu *Aspergillus* rostou na běžných kultivačních půdách, jako je Sabouraudův agar nebo krevní agar, při 30-37 °C, 3-5 dní. Barva kolonií je u druhu *Aspergillus fumigatus* modrozelená nebo hnědozelená.^[8, 60]

3.3.6 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus je v okolním prostředí všudypřítomný. Stejně jako *A. fumigatus* je schopen tvořit aflatoxiny a s tím spojené onemocnění. Vyskytuje se hlavně na obilninách, kukuřici a arašidech.

Pro plíseň *Aspergillus flavus* je typické uniseriátní a navíc i biseriátní uspořádání konidioforů (z hlavice vyrůstají oválné buňky a na ně nasedají buňky nesoucí konidie). Barva kolonií je při kultivaci u tohoto druhu žlutá, žlutozelená nebo žlutohnědá.^[60]

3.3.7 *Absidia corymbifera*

Absidia corymbifera patří do třídy *Zygomycetes*. Tento saprofytický mikroorganismus se běžně vyskytuje v půdě a v rozkládající se vegetaci. Jedná se o oportunní patogen, který zřídka infikuje imunokompetentní osoby a vyskytuje se převážně u imunokompromitovaných pacientů.^[68]

Inhalace spór, požití kontaminované potravy a poranění se zavlečením spór do rány tvoří pravděpodobně základ většiny případů infekce *A. corymbifera*.

Je pozoruhodné, že *A. Corymbifera* byla také nalezena na zachovalé zmrzlé přírodní mumii člověka (ledový muž Ötzi, s věkem přibližně 5300 let).^[68]

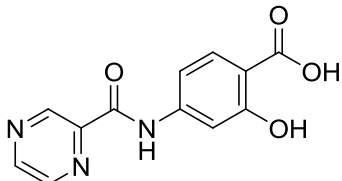
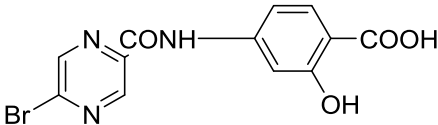
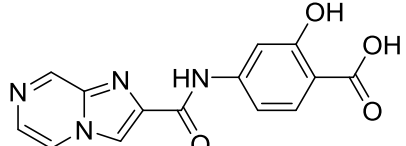
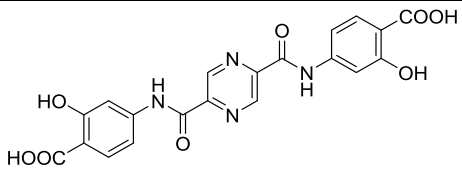
3.3.8 *Trichophyton interdigitale*

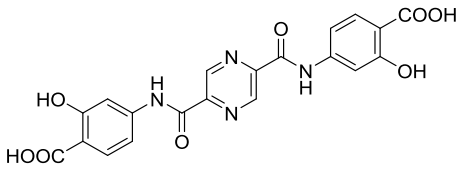
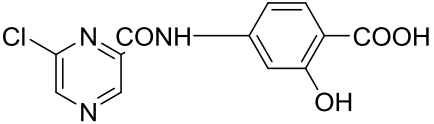
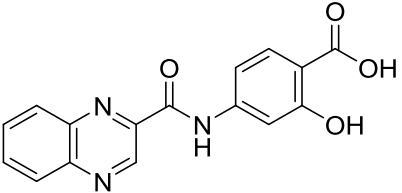
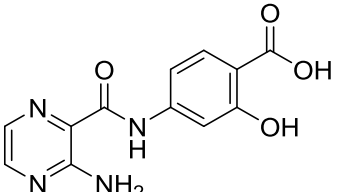
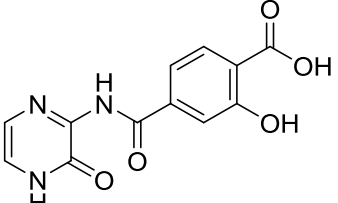
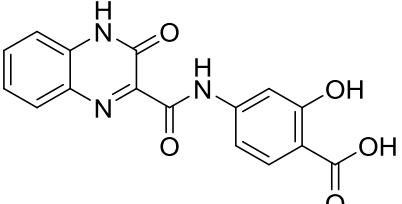
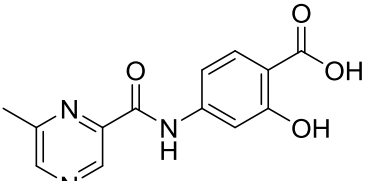
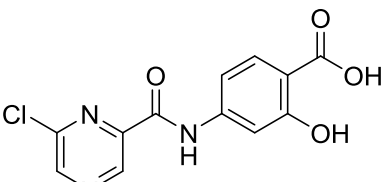
K přenosu infekce, kterou způsobuje *Trichophyton interdigitale*, dochází přímým nebo nepřímým kontaktem (společným užíváním bot, hygienických potřeb, kontaktem kontaminované podlahy ve sprchách). *Trichophyton interdigitale* patří mezi keratofilní houby a je původce tinea pedis, tinea unguium, tinea corporis.^[69]

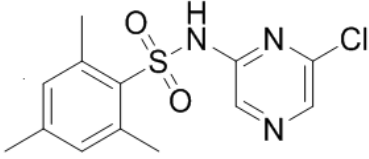
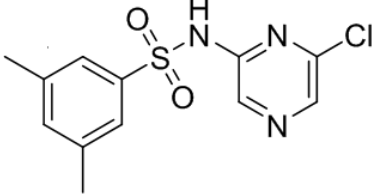
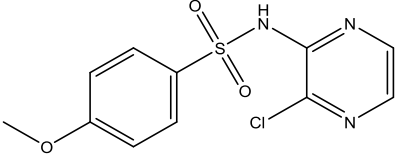
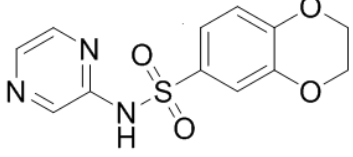
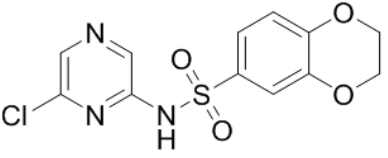
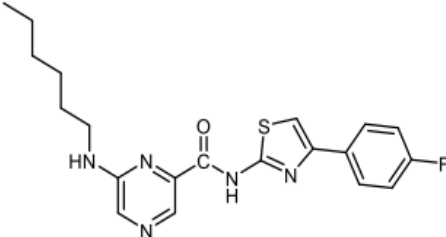
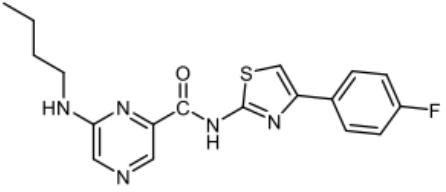
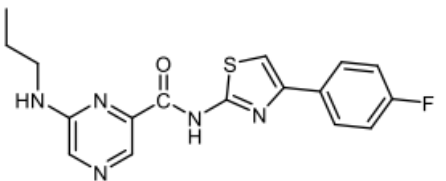
3.4 Přehled testovaných sloučenin

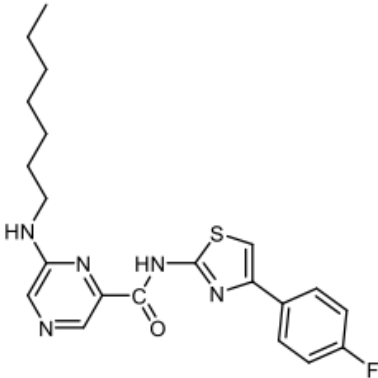
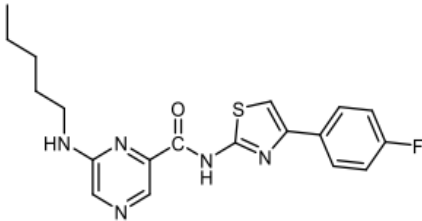
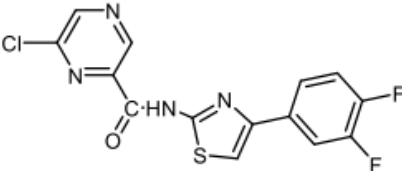
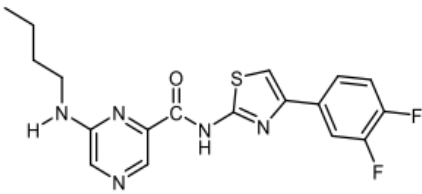
V této diplomové práci bylo hodnoceno 38 vzorků s potenciální antimykotickou aktivitou (tab. 5). Vzorky byly dodány do laboratoře v krystalické podobě a následně rozpuštěny. Byly testovány jejich účinky o koncentracích 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,98 a 0,49 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 5: Přehled testovaných sloučenin.

Kód testované látky	Sumární vzorec	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
BBPS1	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$		259,22	16,2
BBPS2	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BrN}_3\text{O}_4$		388,11	25,7
BBPS3	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4$		298,25	12,4
BBPS4	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5$		438,35	26,1

*BBPS4	$C_{20}H_{14}N_3O_5$		438,08	20,8
BBPS5	$C_{12}H_8ClN_3O_4$		293,66	21,1
BBPS6	$C_{16}H_{11}N_3O_4$		309,28	21,9
BBPS7	$C_{12}H_{10}N_4O_4$		274,24	13,7
BBPS9	$C_{12}H_9N_3O_3$		275,05	12,1
BBPS10	$C_{16}H_{11}N_3O_5$		325,28	20,3
BBPS12	$C_{13}H_{11}N_3O_4$		273,07	10,9
BBPS14	$C_{12}H_8ClN_3O_4$		293,02	17,0

EM18C	$C_{13}H_{14}ClN_3O_2S$		311,78	14,7
EM29C	$C_{12}H_{12}ClN_2O_2S$		297,76	12,8
EM32C	$C_{11}H_{10}ClN_3O_3S$		299,73	12,0
EM34C	$C_{12}H_{10}N_3O_4S$		239,30	10,4
EM35C	$C_{12}H_{10}ClN_3O_4$		327,74	13,3
JZ-MC1	$C_{20}H_{22}FN_5OS$		399,49	17,7
JZ-MC2	$C_{18}H_{18}FN_5OS$		317,43	10,8
JZ-MC3	$C_{17}H_{16}FN_5OS$		357,41	13,9

JZ-MC4	$C_{21}H_{24}FN_5OS$		413,52	13,4
JZ-MC5	$C_{19}H_{20}FN_5OS$		385,46	14,5
JZ-MC7	$C_{14}H_7ClF_2N_4O$ S		352,74	15,6
JZ-MC9	$C_{18}H_{17}F_2N_5OS$		389,42	16,7
<u>W020B</u>	–	–	342,12	5,3
<u>W025B</u>	–	–	308,14	5,4
<u>W025C</u>	–	–	322,15	4,3
<u>W029C</u>	–	–	322,15	3,1
<u>W030B</u>	–	–	368,14	5,0
<u>W031A</u>	–	–	392,14	2,0
<u>W034</u>	–	–	352,16	5,0
<u>W038A</u>	–	–	376,08	4,4
<u>W041A</u>	–	–	370,15	5,30
<u>W041B</u>	–	–	370,15	1,50
<u>F0947C</u>	–	–	360,11	4,2
<u>FE058H</u>	–	–	420,03	5,8

FE0958G	–	–	356,14	4,6
FE0950D	–	–	372,13	1,8

Sloučeniny podtržené pochází z jiného pracoviště než ostatní sloučeniny, proto není možné publikovat jejich strukturu a vzorec.

3.5 Standardy antimykotik

Jako standardy byly vybrány 2 antimykotické látky – amfotericin B a flukonazol (Sigma-Aldrich, Braunschweig, Německo). Hodnoty uvedené v tabulce 6 představují MIC kmenů kvasinek CA, CK, CG, CP a CT a hodnoty uvedeny v tabulce 7 představují MIC kmenů vláknitých hub AF, Afla, AC a TI. Hodnoty pro flukonazol jsou nižší díky pouze fungistatickému účinku.

Tabulka 6: Hodnoty standardů pro kvasinky.

KMEN/inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]			
		Amf B	Amf B 5 dní	Fluc	Fluc 5 dní
CA	24h	0,06	0,06	128	128
	48h	0,25	–	128	128
CK	24h	0,25	0,25	128	128
	48h	1,00	–	128	128
CG	24h	0,06	0,06	128	128
	48h	0,25	–	128	128
CP	24h	0,06	0,12	16	16
	48h	0,05	–	16	16
CT	24h	0,12	0,12	128	128
	48h	0,50	–	128	128

Tabulka 7: Hodnoty standardů pro vláknité houby.

KMEN/inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]			
		Amf B	Amf B 5 dní	Fluc	Fluc 5 dní
AF	24h	0,25	–	128	–
	48h	1	–	128	–
Afla	24h	2	–	128	–
	48h	4	–	128	–
AC	24h	1,125	–	128	–
	48h	1	–	128	–
TI	48h	0,5	–	32	–
	72h	1	–	32	–

3.6 Metodika

3.6.1 Příprava růstového média

RPMI 1640 je přesně chemicky definované 5x koncentrované růstové médium. Ředí se pufrém (0,165 M morfolinopropansulfonová kyselina – MOPS) v poměru 1 : 4 a pH se upravuje pomocí 10M NaOH na 7,0±0,1.

3.6.2 Příprava suspenzí

1. Sterilní zkumavky jsme popsali zkratkami testovaných kmenů.
2. Do každé zkumavky jsme nepipetovali 3 ml sterilní vody.
3. Odebrali jsme část kolonie z kultury jednotlivých kmenů, které byly narostlé na Sabouraudově glukózovém agaru.
4. Kolonii jsme resuspendovali ve zkumavce se sterilní vodou.
5. Obsah zkumavky jsme řádně promíchali na vortexu.
6. Hustotu suspenze jsme několikrát změřili na denzitometru (aby dosáhla hodnoty 1,0 stupně dle McFarlanda).

Pozn.: Takto připravené suspenze inokula vydrží v lednici cca 1 týden.

3.6.3 Příprava ředící řady testované látky

Do laboratoře musí být testovaná látka dodána společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti.

1. Navážené množství testované látky jsme rozpustili v příslušném objemu DMSO tak, aby 1. testovaná koncentrace byla 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ale zároveň nesměla finální koncentrace DMSO přesáhnout 1 % v jamce. Objem DMSO byl vypočítán ze vzorce:

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

Legenda: m – navážka [g], c – 1. testovaná koncentrace = 500 $\mu\text{mol/l}$ = 0,0005 mol/l, M – molární hmotnost

2. Pokud se látka vysrážela nebo nerozpustila, přidali jsme 2. nebo 3. ekvivalent rozpouštědla. S každým dalším přidáním ekvivalentu rozpouštědla byla

posunuta první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z 500 $\mu\text{mol/l}$ na 250 $\mu\text{mol/l}$, z 250 $\mu\text{mol/l}$ na 125 $\mu\text{mol/l}$ atd.). Ke zlepšení rozpustnosti bylo možné použít vyhřívanou ultrazvukovou lázeň.

3. Do sterilní zkumavky označené č. 1 jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a 20 μl připravené (rozpuštěné) testované látky. Po promíchání obsahu zkumavky na vortexu bylo nutné zkontrolovat, jestli se testovaná látka v růstovém médiu nevysrážela. Pokud ne, získali jsme tímto pracovní roztok č. 1 testované koncentrace, který bude později přemístěn do 1. jamky dvanáctijamkového rezervoáru.
4. Do deseti sterilních skleněných zkumavek, označených 2 – 11, jsme připravili dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO:
Do každé zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml DMSO. Do zkumavky označené č. 2 jsme napipetovali stejný objem testované látky rozpuštěné v DMSO. Následně bylo přeneseno 0,5 ml do zkumavky č. 3. Vždy bylo nutné obsah zkumavky po přidání testované látky dobře promíchat. Stejným postupem jsme pokračovali až ke zkumavce č. 11. Tímto způsobem jsme získali dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO, tedy v každé následující zkumavce se nacházela testovaná látka s poloviční koncentrací.
5. Do jamek 2 – 12 jamkového rezervoáru (Obr. 18) jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a pak jsme do jamek přidali 20 μl naředěné testované látky z ředící řady ve skleněných zkumavkách tak, aby např. v jamce č. 2 bylo 20 μl ze zkumavky č. 2. Jamka č. 12 představovala kontrolu a bylo do ní přidáno 20 μl DMSO.



Obrázek 18: Dvanáctijamkový rezervoár

Zdroj: Kateřina Comová, pořízeno v mykologické laboratoři, (Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova)

3.6.4 Postup pipetování do mikrotitrační destičky

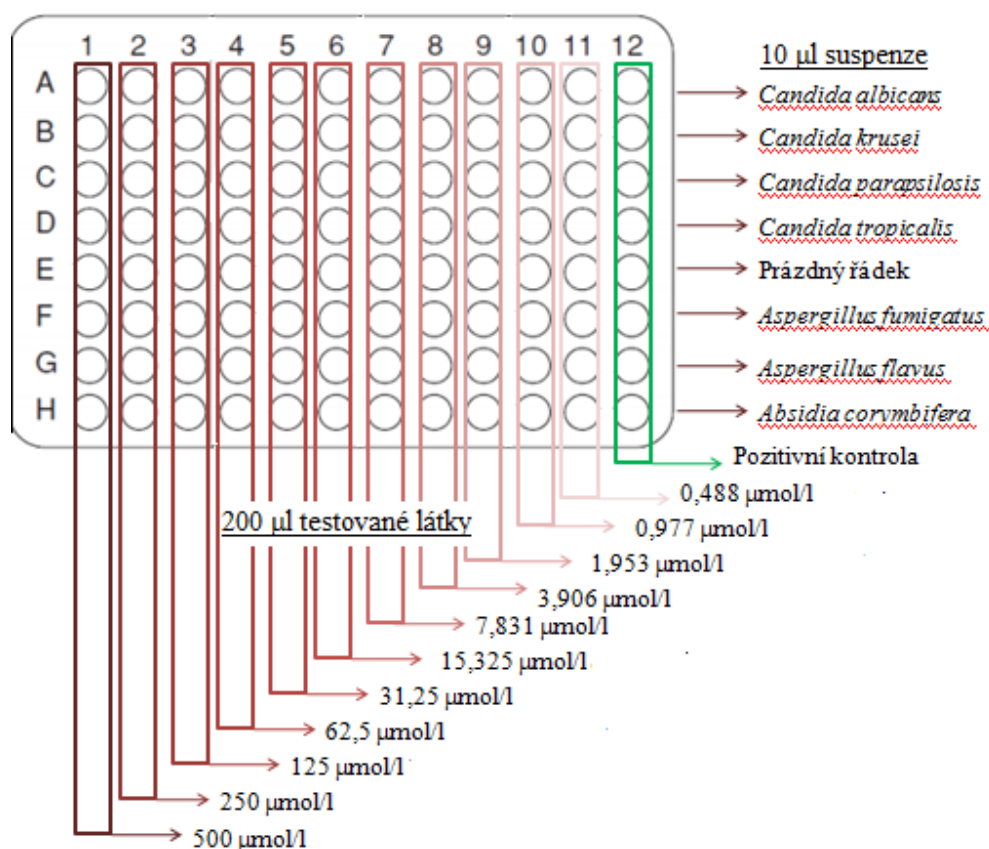
1. Dvě sterilní mikrotitrační destičky jsme označili číslem, kódem testované látky, datem, a příslušným kmenem. První destička sloužila k testování citlivosti kmenů *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* a druhá pro kmen *Trichophyton interdigitale*.
2. Pomocí 12tikanálové pipety (Obr. 19) jsme napipetovali 200 μ l zásobního roztoku z rezervoáru do všech jamek mikrotitrační destičky, kromě řádku E (1 destička odpovídá 1 testované látce). Do druhé destičky bylo stejným způsobem nepipetováno 200 μ l zásobního roztoku pouze do prvního řádku.



Obrázek 19: Pipetování pomocí 12tikanálové pipety do jamek mikrotitrační destičky.

Zdroj: Kateřina Comová, pořízeno v mykologické laboratoři, (Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova)

- Dále jsme do řádků 1 – 8 napipetovali 10 μl připravené suspenze testovaných kmenů (1 řádek odpovídá jednomu testovanému kmenu). (krok 2 a 3 shrnuje Obr. 20)
- Po přiklopení víčkem byly destičky inkubovány v termostatu při teplotě 35°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Odečet byl proveden po 24 a 48 hodinách u první destičky a po 72 a 120 hodinách u druhé destičky, kde byl inokulován pouze kmen *Trichophyton interdigitale*.



Obrázek 20: Pipetování testovaných látek a mykotických agens do mikrotitrační destičky.

Do řádků bylo nepipetováno vždy 10 μl mykotického agens. Do sloupců bylo napipetováno vždy 200 μl testované látky.

3.6.5 Vyhodnocení

Vyhodnocení růstu kvasinek a vláknitých hub probíhalo po uplynutí inkubační doby ve všech jamkách. Hodnota MIC byla odečtena v první jamce s nejnižší koncentrací testované látky, ve které již nebyl viditelný růst kvasinky nebo vláknité houby.

4. Výsledky

Výsledky testování 38 sloučenin jsou přehledně shrnuty v tabulkách číslo **8 – 13**. Tučně zvýrazněná čísla v tabulkách představují hodnoty MIC, kdy testovaná látka dokázala zastavit růst kvasinek nebo vláknitých hub. V mikrotitrační destičce byly tyto jamky čiré. Znaménko „>“, nacházející se před čísly, určuje nejvyšší testovanou hodnotu koncentrace, při které testovaná látka stále není účinná.

Tabulka 8: Skupina testovaných látek 1

KMEN/ inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]				
		EM18C	EM29C	EM32C	EM34C	EM35C
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72h	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500

V tabulce **8** jsou výsledky testovaných látek skupiny 1, které nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl pozorován zákal způsobený růstem kmenů kvasinek a vláknitých hub, a to i při nejvyšší možné koncentraci testované látky.

Tabulka 9: Skupina testovaných látek 2

KMEN/ inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]					
		BBPS1	BBPS2	BBPS3	BBPS4	*BBPS4	BBPS5
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 10: Skupina testovaných látek 2 – pokračování

KMEN/ inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]					
		BBPS6	BBPS7	BBPS9	BBPS10	BBPS12	BBPS14
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500

V tabulce č. 9 a 10 jsou výsledky testovaných látek skupiny 2, které nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl pozorován zákal způsobený růstem kmenů kvasinek a vláknitých hub, a to i při nejvyšší možné koncentraci testované látky. Sloučeniny BBPS4 mají stejné kódové označení, proto jsem je v této diplomové práci rozlišila jako BBPS4 a *BBPS4. Dle sumárního vzorce se jedná ale o různé sloučeniny.

Tabulka 11: Skupina testovaných látek 3

KMEN/ inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]						
		JZMC1	JZMC2	JZMC3	JZMC4	JZMC5	JZMC7	JZMC9
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AFla	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
TI	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500

V tabulce 11 jsou výsledky testovaných látek skupiny 3, které nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl pozorován zákal způsobený růstem kmenů kvasinek a vláknitých hub, a to i při nejvyšší možné koncentraci testované látky. U látky JZMC7 byla stanovena nejvyšší možná koncentrace 125 $\mu\text{mol/l}$ kvůli nižší rozpustnosti.

Tabulka 12: Skupina testovaných látek 4

KMEN/ inkubační doba	TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [$\mu\text{mol/l}$]										
	W020B	W025B	W025C	W029C	W030B	W031A	W034	W038A	W041B	WK4	
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
CP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
AFla	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>500	>500	>125	–
TI	72h	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>125	–
	120h	>500	>500	>500	500	>500	>250	>500	>500	>125	–

V tabulce 12 jsou výsledky testovaných látek skupiny 4, které až na jedinou výjimku nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Látka W029C je v koncentraci $500\mu\text{mol/l}$ na kmen *Trichophyton interdigitale* slabě účinná. U látky W041B byla stanovena nejvyšší možná koncentrace $125\mu\text{mol/l}$, kvůli nižší rozpustnosti.

Látku WK4 nebylo možné rozpustit v DMSO, a tak nebyla dále testována.

Tabulka 13: Skupina testovaných látek 5

KMEN/inkubační doba		TESTOVANÁ LÁTKA – MIC [μmol/l]			
		FE0947C	FE0958H	FE0958G	FE0950D
CA	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
CK	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
CP	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
CT	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
AF	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
AFla	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
AC	24h	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>500	>500	>125
TI	72h	500	>500	>500	>125
	120h	500	>500	>500	>125

V tabulce 13 jsou výsledky testovaných látek skupiny 5, které až na jedinou výjimku nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Látka FE0947C je v koncentraci 500 μmol/l na kmen *Trichophyton interdigitale* slabě účinná. U látky FE0950D byla stanovena nejvyšší možná koncentrace 125 μmol/l, kvůli nižší rozpustnosti.

5. Diskuze

Studium rezistence vůči antimykotickým látkám zaostávalo za studiem antimikrobiální rezistence, a to hned z několika důvodů. Snad nejdůležitější je, že mykotická onemocnění nebyla až do nedávné doby považována za významná. Například roční míra úmrtí způsobená kandidózou byla stabilní mezi rokem 1950 a asi 1970. Od roku 1970 se tato míra významně zvýšila. Před schválením imidazolů na konci 80. let byl pro léčbu mykotických infekcí dlouhou dobu dostupný pouze amfotericin B. Konec 80. a začátek 90. let byly tedy významným mezníkem ve vývoji antimykotických látek. [70]

Zlomem se stala pandemie HIV/AIDS, ale i využívání terapie potlačující imunitní systém, např. při transplantacích. K rezistenci přispívá i časté nebo nesprávně indikované použití antimykotických přípravků. Tento vývoj a související nárůst plísňových infekcí urychlil hledání nových, bezpečnějších a účinnějších látek pro boj proti závažným plísňovým infekcím. [70]

Cílem této diplomové práce bylo určit antimykotickou aktivitu 38, resp. 37 sloučenin, protože jednu sloučeninu (kódovým označením WK4) nebylo možné rozpustit v DMSO. Část testovaných vzorků byla syntetizována na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy pod vedením pana PharmDr. Jana Zitka, PhD. Druhá část byla syntetizována na spolupracujícím pracovišti Jagelonské Univerzity v Polsku. Antimykotické působení sloučenin bylo testováno na mikromicetách *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton interdigitale*.

Z výsledků vyplývá, že téměř všechny sloučeniny jsou neúčinné vůči mykotickým agens, která byla pro tuto diplomovou práci k dispozici. Výjimkou byly sloučeniny s kódovým označením W029C a FE0947C, které vykazaly aktivitu vůči druhu *Trichophyton interdigitale* v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$. Což je však v porovnání se standardy zanedbatelná hodnota.

Při práci v laboratoři nelze vyloučit chyby v preanalytické a postanalytické fázi vyšetření, které mohou ovlivnit průběh testování potenciálně antimykoticky účinných sloučenin. Tyto chyby mohou vést k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům. Pro ověření výsledků je vhodné stanovení opakovat.

6. Závěr

Účelem této diplomové práce bylo testování nových, potenciálně antimykoticky působících sloučenin, které byly do laboratoře dodány PharmDr. Janem Zitkem, Ph.D. (výzkumná skupina prof. M. Doležala) z katedry Farmaceutické chemie a Farmaceutické analýzy.

K dispozici jsme měli 38 sloučenin, ale sloučenina s kódovým označením WK4 nebyla rozpustná v DMSO a nebyla dále testována. V této diplomové práci bylo tedy testováno 37 potenciálně antimykoticky působících látek mikrodiluční bujónovou metodou. Testování bylo prováděno v mykologické laboratoři katedry Biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy.

Výsledek diplomové práce ukazuje, že antimykotickou aktivitu vykazovaly sloučeniny s kódovým označením W029C a FE0947C a to vůči druhu *Trichophyton interdigitale* v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$. Na základě těchto výsledků není možné predikovat vztah mezi strukturou testované sloučeniny a aktivitou z důvodu nízkého počtu aktivních sloučenin.

Stanovení MIC testované sloučeniny je důležitým krokem ve vývoji nových antimykotických látek. I když se prokáže, že sloučenina vykazuje antimykotické účinky, čeká ji ještě dlouhý proces výzkumu zahrnující laboratorní a klinické testování.

Zdroje:

1. ZEZULA, R., SCHINDLER, I., SPÁLENÝ, A., VAŠÁKOVÁ, M., DUTKA, J. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi*. 2005, 7(7): 349-353
2. GISELLE, C., VASCONECOLEOS, C., LOPES, O., CASTÁGENES, S., FILHO, O., NASCIMENTO, F., RAMOS, M., PIRES, E., ANDRADE, M., ROCHA, F., MONTEIRO C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Front. Microbiol.* 2018, 9: 1351
3. HABER, J., MALLÁTOVÁ, N., KOLEŠOVÁ, E., HNÁTKOVÁ, M., KOŘEN, J., HEROLD, I. Epidemiologie invazivní kandidózy a kandidémie – stále aktuální problém. *Anest. Intenziv. Med.* 2008, 2: 110–119
4. MATOUŠKOVÁ, M. Mykotické infekce. *Urol List*. 2005, 3 (2): 39-43
5. HOŘEJŠÍ, V. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-7132.
6. BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V., *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Karolinum, 2002. ISBN 8071845655
7. Fungal cell structure and Targets – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://drfungus.org/knowledge-base/antifungal-pharmacology/>
8. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V. SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virology, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238- 0297-6.
9. BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠTÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M., DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Medicína pro praxi*. 2009, 6 (3): 155-164.

10. HABER, J. *Systémové mykózy a jejich léčba*. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-85824-16-7
11. SEDLÁČEK, P. Terapie invazivních mykotických infekcí u imunosuprimovaných pacientů. *Ambulantná terapie*, 2008, 6 (2): 92-97
12. LOBOVSKÁ, A. *Infekční nemoci*, Praha: Karolinum, 2001, ISBN 80-246-0116-8
13. SKOŘEPOVÁ, M. Antimykotika z pohledu dermatologa. *Remedia* 2002, 12 (1): 51-54
14. DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství*. 2006, 2 (1): 10-14
15. KOĐOUSEK, R. *Mykózy: lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 8024406497.
16. Speciální farmakologie. Díl VII/A. *Protinádorová a protiinfekční chemoterapeutika*. Praha: Karolinum, 1999, ISBN 80-7184-942-1
17. JEDLIČKOVÁ, A. *Systémové mykózy*, Praha: Maxdorf, 2006 ISBN 978-80-7345-101-1
18. SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2011, 75 (2): 213-267
19. ZHOU, W. Synthesis and Biological Activity of Sterol 14 α -Demethylase and Sterol C24-Methyltransferase Inhibitors. *Molecules*. 2018, 23(7): 1753
20. ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2008, 22 (2): 40-44

21. DOHNAL, V., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J. Ergosterol: steroid hub. České Budějovice: zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, 10 (2). ISSN 1804-7122. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/administrace/clankyfile/20120504145335154666.pdf>
22. LEPESHEVA, G. I., WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11 (16): 2060-2071
23. FROMTLING, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988, 1 (2): 187-217.
24. LEDLIČKOVÁ, A., MAŠATA, J., SKOŘEPOVÁ, M. *Lokální mykózy*. Praha: Maxdorf, 2008, ISBN 978-80-7345-150-9
25. SUCHOPÁR, J. *Antibiotika, antimykotika, antivirotika*. Praha: Panax. 1992, ISSN 0862-8947.
26. SARAVOLATZ, L., JOHNSON, L., KAUFFMAN, C. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *Clin. Infect. Dis.* 2003 36(5): 630-637
27. HABER, J., MALLÁTOVÁ, N. Posakonazol. *Remedia* 2007, 17 (1) 50-60
28. ANDRIOLE, T. V. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemoth.* 1999, 44(2): 151-162
29. HABER, J. Nová antimykotika – jaká jsou a co přinášejí. *Remedia*. 2005, 5 (3): 247-258
30. DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství*. 2006, 1: 25-29

31. KOSELNY, K., GREEN, J., DIDONE, L., HALTERMAN, J., FOTHERGILL, A., PATTERSON, T., CUSHION, M., RAPPELYE, C., WALLINGTON, M., KRYSAN, D. The Celecoxib Derivative AR-12 Has Broad-Spectrum Antifungal Activity *In Vitro* and Improves the Activity of Fluconazole in a Murine Model of Cryptococcosis. *Antimicrob. Agents. Ch.* 2016, 60 (12): 7115-7127
32. ŠPAČEK, J., BUCHTA, V., JÍLEK, P. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4554-1
33. PIANALTO, K. M., ALSPAUGH, A. J. New Horizons In Antifungal Therapy. *Journal of Fungi*. 2016, 2 (4): 26
34. SÚKL [online]. [cit. 2019-03-24] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>
35. BACHER, F. Ergosterol-Biosynthese: Suche nach neuen Antimykotika. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 2002 (47): 83
36. VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. [online]. [cit. 2019-03-24] Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/713687/>
37. ACKERMANN, P. Problematika rezistence oomycet a houbových patogenů révy k fungicidům a antirezistentní strategie. [online]. [cit. 2013-11-03] Dostupné z: <http://www.ekovin.cz/akce-svazu/prednaska-rezistence?highlightWords=rezistence>
38. KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46 (1): 120-128.
39. WHITE, T. C., KIEREN, A. M., BOWDEN, A. R. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11(2): 382-402

40. Wikipedia contributors: Wikipedia, The Free Encyclopedia: *Candida albicans* [online]. [cit. 2019-03-24] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans
41. LAMB, D., KELLY, D., SCHUNCK, W., SHYADEHI, A., AKHTAR, M., LOWE, D., BALDWIN, B., KELLY, S. The Mutation T315A in *Candida albicans* Sterol 14 α -Demethylase Causes Reduced Enzyme Activity and Fluconazole Resistance through Reduced Affinity. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(9): 5682-8
42. CHAPELAND-LECLERC, F., BOBUCHOUX, J., GOUMAR, A., CHASTIN, C., VILLARD, J., NOEL, T. Inactivation of the FYC2 Gene Encoding Purine-Cytosine Permease Promotes Cross-Resistance to Flucytosine and Fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 2005, 49(8): 3101-3108
43. PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, Epidemiology and Consequences for Treatment. *Am. J. Med.* 2012, S3-S13
44. SELMECKI, A., FORCHE, A., BERMAN, J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug resistant *Candida albicans*. *Science*, 2006, 313(5785): 367-370
45. LOEFFLER, J., STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2003, S31-S41
46. PAO, S. S., PAULSEN, T. I., SAIER, H. M. Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 1998, 62(1): 1-34
47. CANNON, R. D., LAMPING, E., HOLMES, A. R., NIIMI, K., BARET, P., KENIYA, M., TANABE, K., NIIMI, M., GOFFEAU, A., MONK, B. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, 22(2): 291-321

48. BORST, P., ELFERINK, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71: 537-592
49. Wikipedia contributors: Wikipedia: Major facilitator superfamily [online]. [cit. 2019-03-24] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Major_facilitator_superfamily
50. PASRIJA, R., PANWAR, L. S., PRASAD, R. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* Display Different Lipid Specificities: both ergosterol and sphingolipids are Essential for Targeting of CaCdr1p to membráně rafts. *Antimicrob. Agents. Ch.* 2008, 52(2): 694-704
51. EUCAST definitive dokument Edef 7.1: method for the determinativ of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin. Microbiol. Infec.* 2008, 14: 398-405.
52. VELLA, A., De CAROLIS, E., MELLO, E., PERLIN, D., SANGLARD, D., SANGUINETTI, M., POSTERARO, B. Potential Use of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Antifungal Resistance in the Human Pathogen *Candida glabrata*. *Sci. Rep.* 2018, 7: 9099
53. POSTERARO, B., TORELLI R., DE CAROLIS, E., POSTERARO, P., SANGUINETTI, M. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role from the Clinical Laboratory Perspective. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2014, 6(1): e2014030
54. MALLÁTOVÁ, N., HAMAL, P., KOČMANOVÁ, I., BUCHTA, V., MENCL, K. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů - doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgraduální medicína.* 13: 51-65
55. SZÚ. Definice klinických breakpointů a epidemiologických předělů EUCAST. [online]. [cit. 2019-03-24] Dostupné z:

http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/klinicke_breakpointy/Definice_BP_ECOFFs.pdf

56. JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., FÖRSTL, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.
57. BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, I. S. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, 4(2): 71-79
58. ETEST. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/etestr>
59. Principles of Antimicrobial Chemotherapy. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <https://basicmedicalkey.com/principles-of-antimicrobial-chemotherapy/>
60. VOTAVA, M., RŮŽIČKA, F., WOZNICOVÁ, V., ČERNOHORSKÁ, L., DVOŘÁČKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ M., HOLÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O. *Lékařská mikrobiologie a vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN: 978-80-86850-04-7
61. Sensititre YeastOne. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/YO9>
62. Fungitest. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/product/broth-dilution-method-antifungal-micropanel?ID=NMUAX98UU>
63. ATB Fungus. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at-antifungigramme.html>
64. VITEK 2 AST-YS. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: https://www.socimed.com/ajax/index/options/product_id/11105/

65. ABBAS, J., GERALD, P., HEND, A., MARDANI, M., GIRGAWY, E., ABI-SAID, D., WHIMBEY, E., HACHEM, R., RAAD, I. *Candida krusei* Fungemia An Escalating Serious Infection in Immunocompromised Patients. *Arch. Intern. Med.* 2000, 160(17): 2659-2664
66. TROFA, D., GACSER, A., NOSANCHUK, D. J. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathgen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008 21(4): 606-625
67. MINIATLAS MIKROORGANISMŮ. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/mikr.htm>
68. RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, L. C., BAKER, D. J. Zygomycetes in human Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13(2): 236-30
69. Mycology online. [online]. [cit. 2019-03-23] Dostupné z: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>
70. GHANNOUM, M. A., RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode ofAction, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12 (4): 501-517.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1: Strukturní podobnost cholesterolu a ergosterolu.</i>	15
<i>Obrázek 2: Znázornění buněčné stěny mikroskopických hub a popis míst zásahů antimykotik.</i>	19
<i>Obrázek 3: Znázornění zásahu azolového preparátu do bun. stěny mikroskopické houby</i>	20
<i>Obrázek 4: Syntéza ergosterolu a místo působení azolových preparátů</i>	21
<i>Obrázek 5: Tříkroková reakce přeměny lanosterolu katalyzovaná enzymem lanosterol 14-α-demethylázou</i>	22
<i>Obrázek 6: Působení azolového preparátu na hem cytochromu P450.</i>	23
<i>Obrázek 7: Znázornění zásahu polyenových preparátů do buněčné stěny mikroskopické houby.</i>	26
<i>Obrázek 8. Znázornění zásahu echinokandinů do buněčné stěny mikroskopické houby.</i>	28
<i>Obrázek 9: Klinické hodnocení vývoje léčivých přípravků</i>	30
<i>Obrázek 10: Nové molekuly ve vývoji a cíle jejich působení.</i>	30
<i>Obrázek 11: Diskový difúzní test.</i>	42
<i>Obrázek 12: E-test, stanovení hodnoty MIC</i>	43
<i>Obrázek 13: Mikrodiluční bujónová metoda</i>	44
<i>Obrázek 14: Sensititre YeastOne</i>	46
<i>Obrázek 15: Fungitest</i>	47
<i>Obrázek 16: ATB fungus</i>	47
<i>Obrázek 17: Karta k systému VITEK 2 AST-YS</i>	48
<i>Obrázek 18: Dvanáctijamkový rezervoár</i>	60
<i>Obrázek 19: Pipetování pomocí 12tikanálové pipety do jamek mikrotitrační destičky.</i>	61
<i>Obrázek 20: Pipetování testovaných látek a mykotických agens do mikrotitrační destičky.</i>	62

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Faktory vzniku a rozvoje oportunní infekce</i>	14
<i>Tabulka 2: Molekulární mechanismy rezistence u hlavních antimykotických látek</i>	35
<i>Tabulka 3: Rozdíly mezi dilučními metodikami CLSI a EUCAST</i>	39
<i>Tabulka 4: Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub</i>	51
<i>Tabulka 5: Přehled testovaných sloučenin</i>	54
<i>Tabulka 6: Hodnoty standardů pro kvasinky</i>	58
<i>Tabulka 7: Hodnoty standardů pro vláknité houby</i>	58
<i>Tabulka 8: Skupina testovaných látek 1</i>	63
<i>Tabulka 9: Skupina testovaných látek 2</i>	64
<i>Tabulka 10: Skupina testovaných látek 2 – pokračování</i>	64
<i>Tabulka 11: Skupina testovaných látek 3</i>	65
<i>Tabulka 12: Skupina testovaných látek 4</i>	66
<i>Tabulka 13: Skupina testovaných látek 5</i>	67