

# OBSAH

<b>1. Souhrn</b> .....	4
<b>2. Abstract</b> .....	5
<b>3. Seznam zkratek</b> .....	6
<b>4. Úvod</b> .....	7
<b>5. Teoretická část</b> .....	8
5.1 <u>Charakteristika houbových organizmů</u> .....	8
5.2 <u>Lékařsky významné houby</u> .....	8
○ Zygomycetes.....	9
○ Ascomycetes.....	9
○ Basidiomycetes.....	9
○ Fungi Imperfecti.....	10
5.3 <u>Onemocnění vyvolaná houbami</u> .....	11
5.3.1 Mykózy.....	12
○ Povrchové mykózy.....	12
○ Podkožní mykózy.....	14
○ Systémové mykózy.....	15
5.3.2 Mykotoxikózy.....	17
5.3.3 Mykoalergózy.....	19
5.3.4 Mycetizmy.....	20
5.4 <u>Charakteristika testovaných druhů hub</u> .....	21
5.4.1 <i>Candida albicans</i> .....	21
5.4.2 <i>Candida tropicalis</i> .....	23
5.4.3 <i>Candida krusei</i> .....	24
5.4.4 <i>Candida glabrata</i> .....	25
5.4.5 <i>Trichosporon beigeli</i> .....	25
5.4.6 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	26
5.4.7 <i>Absidia corymbifera</i> .....	26
5.4.8 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	27
5.5 <u>Terapie houbových infekcí, antimykotika</u> .....	28
5.5.1 Specifická antimykotika.....	30
○ Polyenová antimykotika.....	30
○ Azolová antimykotika.....	32

○ Echinokandiny.....	39
○ Allylaminová antimykotika.....	40
○ Thiokarbamáty.....	41
○ Antimetaboly.....	42
○ Ostatní antimykotika.....	42
○ Vytvořená antimykotika.....	44
5.5.2 Nespecifická antimykotika.....	44
5.6 <u>Testování antifungální aktivity in vitro</u> .....	45
5.6.1 Difúzní disková metoda.....	46
5.6.2 Diluční metody.....	46
5.7 <u>Laboratorní diagnostika kvasinek a plísní</u> .....	48
5.7.1 Mikroskopická vyšetření.....	48
5.7.2 Kultivační vyšetření.....	49
5.7.3 Další možnosti diagnostiky.....	49
5.7.4 Komerční identifikační soupravy.....	50
5.7.5 Chromogenní půdy.....	51
<b>6. Experimentální část</b> .....	52
6.1 <u>Pomůcky a přístroje</u> .....	52
6.2 <u>Chemikálie</u> .....	52
6.3 <u>Použitá média</u> .....	52
6.4 <u>Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub</u> .....	53
6.5 <u>Metodika</u> .....	53
6.6 <u>Testované látky</u> .....	56
<b>7. Výsledky</b> .....	70
7.1 <u>Deriváty pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu</u> .....	70
7.2 <u>Deriváty pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu</u> .....	70
7.3 <u>Deriváty pyrazinu-anilidy</u> .....	70
7.4 <u>Deriváty pyrazin-2-aminu</u> .....	70
7.5 <u>Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-dikarbonitrilu</u> .....	71
7.6 <u>Deriváty pyrazol-1-karboxylátu</u> .....	71
7.7 <u>Deriváty hydrazinkarboxylátu</u> .....	71
7.8 <u>Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu</u> .....	71
7.9 <u>Derivát cyklohexanonu</u> .....	71
7.10 <u>Deriváty benzamidu a benzenkarbothioamidu</u> .....	71

7.11 <u>Deriváty thiazolidin-4-onu</u> .....	72
7.12 <u>Tabulkový přehled výsledků</u> .....	72
<b>8. Diskuse</b> .....	84
<b>9. Závěr</b> .....	89
<b>10. Seznam literatury</b> .....	90
<b>11. Seznam obrázků a tabulek</b> .....	93

# 1. Souhrn

**Jindřiška Nitraiová**

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody I

**Diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Farmacie

---

Cílem této diplomové práce byl skrínig aktivity nových potencionálně antifungálních látek.

Pro testování látek byla použita mikrodiluční bujónová metoda, která umožňuje rutinní stanovení MIC u většího počtu antimykotik a v celých souborech kmenů. V naší práci jsme testovali sloučeniny na kmenech *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon beigellii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Z otestovaných sloučenin žádnou antimycetární účinnost neprojevily deriváty pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu, pyrazol-1-karboxylátu, hydrazinkarboxylátu, diazen-1,2-dikarboxamidu a cyklohexanonu. Naopak deriváty benzamidu a benzenkarbothioamidu prokázaly dobrou antimykotickou účinnost proti všem testovaným kmenům. Ve skupině ostatních látek, derivátů pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu, pyrazinu-anilidy, pyrazin-2-aminu, pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-dikarbonitrilu a thiazolidin-4-onu, některé sloučeniny projevily antimykotickou aktivitu a jiné neprokázaly žádný účinek.

Nejvyšší antimykotickou aktivitu projevily deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu, benzamidu a benzenkarbothioamidu.

Nejcitlivější byly kmeny *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans*. Nejméně citlivý byl kmen *Absidia corymbifera*.

U derivátů benzamidu a benzenkarbothioamidu se projevilo, že s délkou alkylového řetězce se inhibice růstu kvasinek a vláknitých hub zvyšuje.

Abychom mohli vyvodit nějaké závěry z výsledků u sloučenin, které jevily antimykotickou aktivitu, bylo by třeba provést rozsáhlejší testování.

## 2. Abstract

**Jindřiška Nitraiová**

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

**Diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Farmacie

---

The aim of the thesis was a screening of activity of new potential antifungal substances.

For testing of substances was used the microdilution broth method. This method allows a routine assesment of MIC of a larger amount of antimycotics and also complete strains. The compounds for the strains *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon beigelii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes* were tested.

The derivates of pyrazinedicarbamide, pyrazinedicarbothioamide, pyrazole-1-carboxylate, hydrazinecarboxylate, diazene-1,2-dicarboxamide and cyclohexanone did not show any antimycotic effectiveness. On the contrary the derivates of benzamide and benzenecarbothioamide showed a good antimycotic activity against all the testing strains. In the group of other substances, it means the derivates of pyrazinecarboxamide, pyrazinecarbothioamide, pyrazine-anilides, pyrazine-2-amine, pyrazine-2-carbohydrazide and pyrazine-2,5-dicarbonitrile and thiazolidine-4-one, some substances were effective but some had no effect.

The derivates of pyrazine-2-carbohydrazide, derivates of benzamide and benzencarbothioamide showed the most intense antimycotics activity.

*Trichophyton mentagrophytes* and *Candida albicans* were the most sensitive strains and *Absidia corymbifera* strain was the least sensitive.

With the increasing length of alkylating chain is the inhibition of growth of microorganism higher. This fact relates to the derivates of benzamide and benzencarbothioamide.

More extensive testing is necessary to carry out to deduce some conclusions based on the outcome of the substances showing some antifungal activity.

### 3. Seznam zkratek

AC	-	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	-	acquired immunodeficiency syndrome (syndrom získané imunodeficiency)
ALT	-	alaninaminotransferáza
CA	-	<i>Candida albicans</i>
CFU	-	colony forming units
CG	-	<i>Candida glabrata</i>
CK	-	<i>Candida krusei</i>
CT	-	<i>Candida tropicalis</i>
DMSO	-	dimethylsulfoxid
HIV	-	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficiency)
MFC	-	minimální fungicidní koncentrace
MIC	-	minimal inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
TB	-	<i>Trichosporon beigeli</i>
TM	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>

## 4. Úvod

V posledních letech přibýlo incidence i závažnosti mykotických onemocnění postihujících člověka. Tento nárůst infekcí je způsoben několika faktory, jako např. nárůstem počtu imunokompromitovaných pacientů (hlavními původci onemocnění u těchto osob jsou oportunní houby rodu *Candida* a *Aspergillus*), vzrůstající spotřebou širokospektrých antibiotik, chemoterapie a transplantace, zvyšující se možností cestování a stěhování. Patogeny vyvolávající mykotické infekce se stávají rezistentní na dostupnou terapii. Na některé mykózy jsou dnešní antimykotické látky používané v klinické praxi nedostatečně účinné. Je proto nutné objevovat a vyvíjet stále nové potencionálně antifungální sloučeniny, které budou účinnější a také méně toxické pro člověka.

Cílem diplomové práce byl skrínig aktivity nových potencionálně antifungálních látek. Sloučeniny použité v této práci byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

## **5. TEORETICKÁ ČÁST**

### **5.1 CHARAKTERISTIKA HOUBOVÝCH ORGANISMŮ**

Houby jsou samostatnou říší živých organismů, která se nazývá Fungi. Jedná se o jednobuněčné a vícebuněčné, eukaryotické organizmy se saprofytickým způsobem výživy. Jsou destruenty celulózy, ligninu, chitinu a keratinu. Některé druhy hub jsou parazité a způsobují nemoci rostlin a zvířat, degradaci potravin a léků. Houby mají negativní vliv na zdraví člověka, vyvolávají různé druhy onemocnění (*Buchta, 1998*). Některé houby produkují metabolity (mykotoxiny), které mohou být, v případě, že došlo ke kontaminaci potravin, i kancerogenní.

Některé houbové organizmy mají však i přínos pro člověka, například ve výrobě potravin (piva, vína, některých sýrů), léků (antibiotika, imunosupresiva), organických kyselin (vitamíny, enzymy) (*www.mycolog.com*).

Některé houby lze uměle pěstovat pro spotřebu (žampiony, hlíva ústříčná).

Eukaryotickou stavbou buňky se houby podobají více savčím buňkám než bakteriím. Tato podobnost představuje jeden z problémů při vývoji nových, selektivně antifungálně působících látek s nízkou toxicitou pro člověka. Dnes většina antimykotik působí na úrovni ergosterolu, složky plazmatické membrány hub.

### **5.2 LÉKAŘSKY VÝZNAMNÉ HOUBY**

Klasifikace hub vychází ze způsobu jejich rozmnožování, morfologie reprodukčních orgánů a spór.

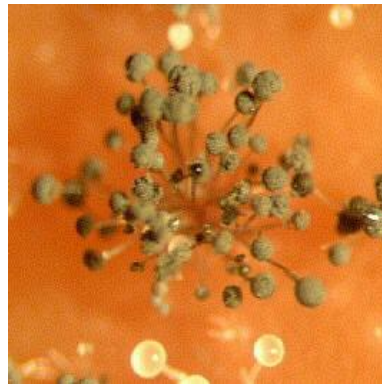
Houby potenciálně patogenní pro člověka patří mezi pravé houby (Eumycota). Eumycota mají stélku tvořenou hyfami, pseudomyceliem nebo jen blastospórami. Buněčná stěna je složena z chitinu a glukanů. Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně.



**Eumycota** se dělí na:

➤ **Zygomycetes** (houby spájkivé):

Třída Zygomycetes má mycelium tvořené hyfami bez přehrádek, kolonie na pevném agaru jsou tvořeny typickým vysokým vzdušným myceliem, rozmnožují se pohlavně, výsledkem jsou zygospóry, nebo nepohlavně pomocí endogenně vzniklých sporangiospór, většina druhů je saprofitických, některé jsou parazitické. Mezi zygomycetes řadíme rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Basidiobolus*, *Conidiobolus* (Buchta, 1998).



Obr. 1 Dozrálé sporangium rodu *Mucor* ([www.mycolog.com](http://www.mycolog.com))

➤ **Ascomycetes** (houby vřeckovýtrusné):

Mají mycelium septované, rozmnožují se nepohlavně pomocí exogenních konidií nebo pohlavně prostřednictvím askospór, které vznikají ve vřecku (askus) po spojení hyf – samčí (anteridium) a samičí (askogonium). Mnoho druhů parazituje na rostlinách a živočiších. Mezi ascomycetes patří např. rod *Eurotium* – zde řadíme farmaceuticky významné rody *Penicillium* a *Cephalosporium*, *Saccharomyces*, *Claviceps* – druhy tohoto rodu obsahují námelové alkaloidy, které mají farmaceutické využití.

➤ **Basidiomycetes** (houby stopkovýtrusné):

Jsou charakteristické myceliem, které tvoří typicky bílé zbarvené podhoubí tvořené dikaryotickými buňkami, rozmnožují se pohlavně, výsledkem

jsou basidie s exogenními basidiospórami. Basidiomycetes tvoří plodnice (basidiokarp), které se konzumují, u jedovatých hub mohou vyvolat u konzumenta alimentární otravy (mycetizmy), tato třída jsou saprofyté, žijí v symbióze s kořeny rostlin (mykorrhiza), některé druhy parazitují na rostlinách nebo i člověku (vyvolávají kryptokokózu). Mezi basidiomycetes patří rod *Amanita*, *Boletus*, *Inocybe*, *Tricholoma* (Buchta, 1998).



Obr. 2 Plodnice stopkovýtrusných hub  
([www.tolweb.org/Basidiomycota/20520 - 61k](http://www.tolweb.org/Basidiomycota/20520-61k))

Rody *Epidermophyton*, *Trichophyton* a *Microsporum* patří mezi tzv. dermatofyty. Ty dělíme na:

- a) zoofilní (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, *M. canis* )
- b) antropofilní (*E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. violaceum*, *T. schoenleinii*, *T. concentricum*, *M. ferrugineum*, *M. audouinii*)
- c) geofilní (*M. gypseum*)  
(Fragner, 1984)

➤ **Fungi Imperfecti** (Deuteromycetes):

Tyto houby představující umělý taxon zahrnují nepohlavní (asexuální, imperfektní) stádia hub. Ta se rozmnožují pomocí konidií nebo vegetují jako

sterilní mycelium. Nepohlavní stadium se nazývá anamorfa. U některých druhů byla však objevena i pohlavní stádia, telomorfy.

Většina hub této třídy, patogenních pro člověka, náleží do dvou následujících řádů:

- Blastomycetes – Jedná se o imperfektní kvasinky. Patří sem např. rod *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.
- Hyphomycetes – Řád zahrnuje vláknité houby rozmnožující se konidiemi. Řadí se zde *Aspergillus*, *Blastomycetes*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Geotrichum* (Buchta, 1998).

### **5.3 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ HOUBAMI**

V osmdesátých letech se houby objevily jako hlavní příčina onemocnění u imunokompromitovaných pacientů a u pacientů s vážným onemocněním hospitalizovaných v nemocnicích. Nárůst infekcí vyvolaných houbami je ovlivněn mnoha faktory. Jedním z nich je nárůst počtu imunokompromitovaných pacientů s poruchami slizničních a kožních bariér, poruchami v počtu a funkci neutrofilů nebo buněk zprostředkujících imunitní reakci a poruchami metabolismu. Dalším faktorem, který je zodpovědný za nárůst houbových infekcí, je vzrůstající spotřeba širokospektrých antibiotik, chemoterapie a transplantace. Vedle toho vzrůstající možnost cestování, stěhování a vystavení lidí vlivu různých endemických houbových patogenů může vést k zvýšení výskytu mykotických onemocnění (Pfaller, 2007).

Rozeznáváme tyto chorobné stavy vyvolané patogenními houbami:

- Mykózy
- Mykotoxikózy
- Mykoalergózy
- Mycetizmy

### 5.3.1 Mykózy:

Výskyt mykóz se zvýšil ve 20. století z několika důvodů. Jedním z nich je lepší diagnostika tohoto onemocnění a s tím související větší záchyt mykóz. Další, již zmíněnou, příčinou je také přenos choroby díky cestování. Mezi iatrogenní faktory (způsobené lékařským zásahem nebo léčbou) patří např. používání antibiotik, kortikoidů, cytostatik, imunosupresiv, hormonální antikoncepce. Dalšími predispozičními faktory jsou diabetes či závažné infekce jako např. AIDS nebo tuberkulóza. Jedním z důvodů jsou také ekologické faktory, jako prachové částice, chemické látky a smog, narušující dolní cesty dýchací.

Původcem mykóz jsou imperfektní houby a houby vřeckovýtrusné (Ascomycetes), výjimečně také houby stopkovýtrusné (Basidiomycetes).

Mykózy dělíme obvykle dle anatomické lokalizace na:

- **Povrchové mykózy** (superficiální): na kůži (kutánní) a viditelných sliznicích
- **Podkožní mykózy** (subkutánní)
- **Hluboké mykózy**: orgánové a systémové

#### a) **Povrchové mykózy:**

Onemocnění vyvolané houbami, které se množí v kůži, ale nepronikají hlouběji do kůže, tzv. kožní (kutánní) mykózy ([www.biomikro.vscht.cz](http://www.biomikro.vscht.cz)).

#### ✓ Kožní mykózy (dermatomykózy):

Infekce postihuje keratinizované vrstvy kůže, nehty a vlasy. Původcem onemocnění jsou rody *Trichophyton*, *Microsporum* (postihující kůži a vlasy) a *Epidermophyton* (zasahující kůži a nehty).

Povrchové mykózy se šíří přímým nebo nepřímým kontaktem s indiferentní osobou nebo zvířetem. K nákaze dochází obvykle pomocí zlomku keratinu, který obsahuje živé houby. K nepřímému přenosu dochází např. na podlaze koupališť a sprch, prostřednictvím hřebenů, ručníků. Dermatofyty

přežívají relativně dlouho. K infekci je pravděpodobně nutná i nepravidelnost epidermis, jako slabé olupování nebo drobné poranění.

Podle druhu dermatofyta a místa infekce se liší léze, jimiž se onemocnění projevuje. Někdy jde jen o suché olupování nebo hyperkeratózu, častěji se objevuje dráždění, zčervenání, otok a tvoření puchýřků.

Někdy se u pacientů s dermatomykózou rozvine sekundární exantém, označovaný jako reakce *id*, který je imunitní odpovědí na mykotickou infekci. U pacientů s tinea pedis má podobu vaskulárního exému na ruce a nohou, u dermatomykóz na hlavě nebo trupu vzniká exantém, který je formou kožní vaskulitidy. Tyto sekundární léze neobsahují mikroby (*Greenwood et al., 1999*).

✓ Povrchová kandidóza:

Onemocnění je rozšířeno po celém světě. Postihuje kůži, nehty a sliznici úst a pochvy. Infekce sliznic se nazývá moučnivka.

Etiologickým agens je nejčastěji *Candida albicans*, vyskytují se však i tzv. non-albicans druhy jako *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* atd.

Kvasinky jsou součástí přirozené mikroflóry a přerůstají a způsobují infekci při zásahu do normální flóry nebo při snížení celkové rezistence organismu v důsledku nemoci.

- **Infekce sliznic:** Jde o nejčastější projev povrchové kandidózy, kdy se na sliznici tvoří ohraničené bílé skvrny, které mohou i splývat. Okolní sliznice je zarudlá a bolestivá.

- **Infekce kůže a nehtů:** Oblastmi výskytu kandidózy kůže jsou axily, třísla, perineum, vyskytuje se pod prsy, mezi prsty, u dětí jako dermatitida pod plenkami. K infekci nehtového lůžka dochází při častém máčení rukou.

- **Chronická kandidóza kůže a sliznic:** Infekce se objevuje v dětství a přechází v perzistující, někdy granulomatózní infekci úst kůže a nehtů (*Greenwood et al., 1999*).

✓ Pityriasis versicolor:

Původcem tohoto onemocnění, projevujícího se depigmentovanými skvrnami na kůži, je kvasinka *Malassezia furfur*. Je součástí přirozené mikroflóry kůže především v oblastech s vyšším výskytem tuků.

✓ Tinea nigra:

Onemocnění způsobené rodem *Cladosporium*. Projevuje se pigmentovanými lézemi na kůži.

✓ Piedra:

Pro tuto mykózu jsou charakteristické světlé (původcem je *Piedraia*) nebo tmavé (původcem je *Trichosporon*) noduly ve vlasech ([www.biomikro.vscht.cz](http://www.biomikro.vscht.cz)).

**b) Podkožní mykózy (subkutánní):**

Toto onemocnění je vyvoláno saprofyty z půdy, nejčastěji jejich zanesením pod kůži poraněním. Většinou jde o pomalý infekční proces, často chronického charakteru.

✓ Sporotrichóza:

Onemocnění, pro které je typický chronický zánět, je rozšířeno po celém světě. Na kůži vznikají léze a abscesy. Často jsou postiženy lymfatické uzliny. Vyskytuje se u zahradníků, zemědělců, horníků, jde tedy o profesionální chorobu. Původcem je *Sporothrix schenckii*.

✓ Choromykóza (choroblastomykóza):

Původcem této mykózy, projevující se chronickým zánětem a bradavicemi až abscesy na kůži, je *Cladosporium carrionii*. Jde o tropickou nemoc ([www.biomikro.vscht.cz](http://www.biomikro.vscht.cz)).

✓ Mycetom:

Jde o chronické granulomatózní onemocnění kůže, podkoží, fascie a kosti, hlavně na rukou a nohou.

Původcem jsou např. rody *Madurella*, *Exophiala*, *Acremonium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Streptomyces*.

Tato infekce se vyskytuje nejčastěji v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie a Střední Ameriky.

✓ Feohyfomykóza:

Feohyfomykóza je charakteristická nespecifickými solitárními podkožními lézemi, jež jsou způsobené černě zbarvenými houbami.

✓ Rinosporidióza:

Chronické granulomatózní postižení sliznic a kůže, jejímž původcem je *Rhinosporidium seeberi*. V nose nebo na spojivce se tvoří rozsáhlé polypy nebo bradavicové léze. Infekce se vyskytuje převážně v Indii a v Jižní Americe (Greenwood et al., 1999).

**c) Systémové mykózy (hluboké, orgánové):**

Jedná se o onemocnění postihující jeden nebo více orgánů, která mohou diseminovat a přejít do septického stavu, obzvláště u imunoalterovaných pacientů.

**Primární mykózy:**

Původci primárních mykóz vyvolávají onemocnění i u lidí s nenarušenou obranyschopností.

✓ Infekce vyvolané dimorfními houbami:

Etiologickými agens jsou houby *Coccidioides immitis* (kokcidioidomykóza), *Histoplasma capsulatum* (histoplasmóza), *Blastomyces dermatitis* (blastomykóza), *Paracoccidioides brasiliensis* (parakocidioidomykóza).

Onemocnění se u zdravých lidí projevuje jako pulmonální infekce a má asymptomatický nebo mírný průběh. U imunoalterovaných pacientů dochází k orgánovému postižení plic, kůže, sliznic, lymfoidních orgánů a kostí.

Hlavní oblastí výskytu těchto infekcí je USA, Kanada a střední Amerika (Buchta, 1998).

✓ Kryptokokóza:

Jde o onemocnění centrálního nervového systému, i když primární je postižení plic. Původcem je kvasinka *Cryptococcus neoformans*. Vyskytuje se po celém světě, nejčastěji u osob s AIDS.

Infekce vzniká po inhalaci buněk *Cryptococcus neoformans*, které se díky malým rozměrům mohou dostat hluboko do plic. Nejčastějším přírodním rezervoárem těchto kvasinek je holubí trus, k přenosu tedy dochází vzdušnou cestou (na rozdíl od ostatních kvasinek) (Greenwood et al., 1999).

**Sekundární mykózy (oportunní mykózy):**

Tyto infekce, způsobené oportunními houbami, které postihují hlavně imunoalterované jedince, se vyskytují nejvíce jako nozokomiální nákazy.

✓ Kandidóza:

Většinu systémových kandidóz způsobuje nejčastěji kvasinka *Candida albicans*, dále pak také *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei*. Při močových infekcích se vyskytuje spíše *C. glabrata* a *C. parapsilosis* je často původcem endokarditidy.

Systémová kandidóza je buď lokalizovaná, například v močovém ústrojí, ledvinách, na srdečních chlopních (endokarditida), meningách, v dutině břišní, nebo je diseminovaná a spojená se sepsí (kandidemie). Diseminovaná forma postihuje játra, ledviny, mozek a trávicí ústrojí. Plicní infekce jsou vzácné.

Kvasinky jsou součástí přirozené mikroflóry člověka. Systémová kandidóza vzniká, když tyto kvasinky přerostou při nějakém vážném stavu. Je to obvykle iatrogenní infekce u hospitalizovaných pacientů. Převládnutí kandid a tím predispozicemi a rizikovými faktory pro rozvoj tohoto onemocnění je např. léčba širokospektrými antibiotiky, steroidy, imunosupresivní terapie, dále pak také věk (novorozenci, staří lidé), těhotenství, diabetes mellitus, imunodeficience, defekty T-lymfocytů (AIDS), nedostatek železa nebo zinku, katetrizace, popáleniny.



✓ Aspergilóza:

U člověka vyvolává onemocnění nejčastěji *Aspergillus fumigatus*, dále pak *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*.

Aspergilóza postihuje nejčastěji plíce, ale také vedlejší nosní dutiny a povrchové tkáně. K nákaze dojde inhalací spór, které se vyskytují nejvíce v tlejících rostlinách (senu) a v zemědělských staveních.

Po inhalaci spór se mohou kolonizovat již vzniklé dutiny, např. tuberkulózní, vytváří se koule mycelia, které se opouzdřují vazivovou stěnou. Jde o tzv. aspergilom.

U osob s atopií se zvýšenou hladinou IgE se může vyvinout reakce přecitlivělosti (alergická aspergilóza). Projevuje se dušností, horečkou a únavou. U osob se sníženou imunitou mohou aspergily způsobovat invazivní plicní onemocnění a diseminovat do orgánů.

✓ Zygomykóza (mukormykóza, fykomykóza):

Onemocnění způsobené plísněmi rodu *Mucor*, *Absidia* a *Rhizopus*. Nejznámější je forma mozkové zygomykózy, která se téměř vždy vyskytuje při diabetes mellitus, leukémii nebo lymfomu (*Greenwood et al., 1999*).

### **5.3.2 Mykotoxikózy:**

Mykotoxikózy jsou otravy toxiny nebo jinými toxickými látkami sekundárního metabolismu hub, které jsou obvykle součástí kontaminované potravy.

Mykotoxiny jsou toxické organické látky, které jsou produkovány řadou mikroskopických hub (plísní) po celém světě (*Ostrý, 1997*).

#### **a) Aflatoxiny:**

Aflatoxiny jsou zdravotně nejvýznamnější skupina mykotoxinů. Představují skupinu chemicky podobných sloučenin. Historicky byly považovány za produkt plísně *Aspergillus flavus* – odtud také pochází název aflatoxin (*Aspergillus flavus* toxin). Později byla produkce aflatoxinů připsána i jiným druhům: *A. nomius* a *A. niger*.

Celkem byly popsány aflatoxiny (AF): B1, B2, G1 a G2. Jejich označení pochází od barvy fluorescence v UV oblasti: AFB1 a AFB2 poskytují modrou fluorescenci (Blue), AFG1 a AFG2 žlutozelenou (yellow-green). Později bylo popsáno i minoritní zastoupení aflatoxinů M1, M2 v mléce (Milk) krav krmených kontaminovanými píceňinami (*Pohanka, 2008*).

Aflatoxiny mohou negativně ovlivnit organismus v několika směrech. Mohou přímo pozměnit genetickou výbavu organismů, indukovat tvorbu karcinomu jater nebo inhibovat enzymy podílející se na přenosu nervového signálu: acetylcholinesterázy (*Pohanka, 2008*).

Nadměrný příjem aflatoxinů organismem má za následek rozvinutí otravy nazývané aflatoxikóza. Rozlišujeme:

- Akutní aflatoxikóza:

Tato otrava vzniká nadměrnou intoxikací v rámci jednorázového příjmu toxinů nebo příjmu během velmi krátkého času. Za nejméně závažný následek má částečné poškození jater, v extrémním případě naprosté selhání jejich funkce. Pozorovaná může být i krvácivost a vznik edémů.

- Chronická aflatoxikóza:

Otrava je důsledkem dlouhodobého příjmu aflatoxinů, nejčastěji ze zaplísňených potravin. Její diagnóza může být složitá a fyziologický projev málo patrný. Nejzávažnějším dopadem chronické aflatoxikózy je cirhóza respektive karcinom jater (*Pohanka, 2008*).

Riziko aflatoxikózy představují zejména kontaminované potraviny. Zdrojem aflatoxinů je především dlouhodobě skladovaný vlhký a teplý substrát jako obilniny, olejninny, krmiva a kompoty.

Člověk se může nakazit primárně, prostřednictvím kontaminované potravy (aflatoxin B1), nebo sekundárně (aflatoxin M1), pozřením kravského mléka nebo mateřského mléka, které pocházejí ze zvířat intoxikovaných aflatoxinem B1 (*Buchta, 1998*).

**b) Námelové alkaloidy** (ergotové, klavinové alkaloidy):

Jedná se o látky obsažené ve sklerotiu (námel) askomycety *Claviceps pupurea* a *C. paspali*. Používají se jako výchozí suroviny pro výrobu léčiv stimuluujících stahy hladkého svalstva dělohy a sympatiku (kys. lysergová a její deriváty).

K intoxikaci ergotovými alkaloidy může dojít např. pozřením potravin z infikovaného obilí. Tzv. ergotizmus se projevuje nekrotickými změnami orgánů. Příčinou toho je  $\alpha$ -adrenergní blokáda mající za následek vazokonstrikci periférních cév, tím dochází k nedostatečnému prokrvení tkání, jež vede k nekróze a gangréně (Buchta, 1998).

### **5.3.3 Mykoalergózy:**

Houbový alergen, představovaný většinou spórami, jako antigen stimuluje imunitní systém hostitele, což se projevuje hypersenzitivní reakcí.

Nejčastější a nejvýznamnější alergenní houby jsou hyfomycety rodu *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, dále také basidiomycety, některé kvasinky a zygomycety (*Mucor*, *Rhizopus*).

Alergická onemocnění vyvolaná houbami dělíme do čtyř skupin:

- Alergická rhinitis a astma:

Alergie postihuje přednostně atopické jedince. Původcem jsou obzvláště druhy rodu *Cladosporium* a *Alternaria*.

- Alergická alveolitis (hypersenzitivní pneumonitis):

Po kontaktu organismu se spórami aktinomycet (*Faenia rectivirgula*) nebo hub (*Aspergillus*, *Penicillium*) se rozvíjí granulomatózní zánětlivá reakce. Často postihuje zemědělce pracující v uzavřených prostorech, jde tedy o nemoc z povolání známou jako farmářské plíce.

- Chronická bronchitis

Hypersenzitivní reakce může vést až k chronickému zánětu průdušek.

- Toxický syndrom reakce na organický prach:

Jedná se o komplexní alergickou pulmonální reakci na masivní expozici prachem, který obsahuje spóry hub, mykotoxiny, bakterie a endotoxiny G-bakterií (Buchta, 1998).

#### **5.3.4 Mycetizmy:**

Původcem mycetizmů, což jsou alimentární otravy po požití plodnic vyšších hub a intoxikace jejich toxiny, jsou jedovaté stopkovýtrusné houby (*Basidiomycetes*).

U nás jde nejčastěji o druhy *Amanita phalloides*, *A. pantherina*, *A. muscaria*, *Entoloma lividum*, *Inocybe patouillardii* a *Boletus satanas*.

Mykotoxiny kloboukatých hub dělíme do dvou skupin:

- Cytotoxiny: amnitoxiny, phallotoxiny

Jsou nebezpečnější. Otrava muchomůrkou se projevuje nejprve gastrointestinálním dyskomfortem (bolest břicha, zvracení, průjemy), poté přechodným ústupem symptomů, ale poté dochází k primárnímu poškození jater a ledvin (žloutenka, hypoglykémie, oligurie), krvácení, delíriu až kómatu.

- Neurotoxiny: muskarin

Při otravě muskarinem se příznaky dostávají rychle. Dochází k postižení trávicího systému a parasympatiku (slzení, slinění, zvracení, bolest hlavy, neostře vidění). Jako antidotum, lze podat atropin (Buchta, 1998).

## 5.4 Charakteristika testovaných druhů hub

V naší studii (viz. Praktická část) byly použity následující druhy hub: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Výskyt jednotlivých testovaných druhů hub je různý. *Absidia corymbifera* je saprofytický půdní druh vyskytující se převážně na rostlinném materiálu (nejčastěji seno, obilná zrna). *Aspergillus* (kropidlák) s velkým počtem druhů je rozšířen po celé světě. Vyskytuje se v půdě, účastní se rozkladných procesů v přírodě. Nalezneme jej i na pícninách, zrní, zelenině, ovoci, potravinách a textilu. *Trichophyton* patřící mezi dermatofyty se vyskytuje u divoce žijících, domácích, hospodářských a laboratorních zvířat, z nichž se přenáší na člověka (zoofilní dermatofyty). Naopak antropofilní dermatofyty jsou přenosné z člověka na člověka. Nákaza může proběhnout prostřednictvím společných koupelen, holícího náčiní, hřebenem, strojkem na vlasy. Druhy rodu *Candida* se vyskytují geopolitně v přírodě v kvasnicích, ovocných šťávách, na ovoci, na mrtvých listech, v půdě, ve vodě, ve vzduchu, ve zbytcích jídla (Fragner, 1984).

### 5.4.1 Candida albicans:

*Candida albicans* se vyskytuje v lidském materiálu ze všech kvasinek nejčastěji.

Kvasinkovité mikroorganismy, mezi které *Candida albicans* patří, žije v ústech, v krku, ve střevech a v urogenitálním traktu většiny lidí a jsou obvykle považována za normální součást střevní mikroflóry. Za potravu jí slouží převážně cukry, které zkvašuje na etanol a oxid uhličitý. Etanol v malém množství není škodlivý, protože má antioxidační a dezinfekční účinky. Pokud je ho však v těle velké množství, začne se měnit na acetaldehyd, který se hromadí v tkáních, což může vést k nejrůznějším patologickým stavům ([www.metabolickety.py.com](http://www.metabolickety.py.com)).

Tato kvasinka je hlavním původcem kandidóz (sooru - bělavý povlak na sliznicích ústní dutiny, moučnivky). Nejčastěji způsobuje onemocnění kůže, rukou a sliznic, vyvolává také sepse, fungémie, endokarditidy, meningitidy a

střevní kandidózu. Krevní cestou se může dostat do jakéhokoliv orgánu v těle, nejčastěji do plic.

Kolonie této kvasinky mají obvykle průměr 3-7 mm, jsou porcelánově bílé, mírně až polokulovitě vyklenuté, hladké a lesklé. Okraj je kruhovitý a nevláknitý. Nejlépe rostou při 37 °C ( *Fragner, 1984*).



Obr. 3 Kolonie *Candida albicans* na Sabouraudově agaru  
(Foto: Mgr. Marcela Vejsová)

Buňky kandidy mají za normálních okolností oválný tvar a jsou veliké asi jako červené krvinky. Pokud není růst kandidy dostatečně omezován imunitním systémem, začnou se namnožené kvasinky prodlužovat a pučí v řetízcích či vláknech, které pronikají sliznicemi a vytvářejí v nich mikroskopické trhliny. Výsledkem perforace je, že do krevního řečiště mohou začít pronikat cizorodé antigeny, bakteriální jedy a neúplně strávené bílkoviny. Tyto částice pak mohou ucpávat lymfatickou soustavu, vyvolávat záněty a podílejí se i na vzniku potravinových alergií. Neustálý tlak na imunitní systém vytvářený nadměrným růstem kandidy může vést k oslabení rezistence vůči všem nemocem ([www.metabolickety.py.com](http://www.metabolickety.py.com)).

Značná adaptabilita kandidě umožňuje produkovat maskovací antigeny, které imunitnímu systému znesnadňují, aby ji rozpoznal jakožto cizí a škodlivou. Narušení procesu rozlišování vlastních a cizích buněk může vést k řadě autoimunitních onemocnění. Toxiny produkované kandidou pak budou moci cirkulovat prakticky bez problémů a kandida bude prorůstat do řady tkání. Tato zjevná tolerance kandidy imunitním systémem může být napravena jedině dlouhodobým vyčištěním těla od jejích antigenů a toxinů. I u řady lidí, kteří

nevykazují žádné zjevné příznaky, se v krevním séru objevují pro kandidu specifické imunoglobuliny. To ukazuje, že bílé krvinky (B-lymfocyty) musí neustále bojovat proti bakteriálním toxinům ([www.metabolickety.py.com](http://www.metabolickety.py.com)).

Příznaky infekce se projevují zpočátku mírnějšími potížemi, například rýma, svědění v nose, puchýře v ústech, podrážděné nebo suché hrdlo, bolesti břicha, říhání, nadýmání, pálení žáhy, zácpa, průjem, pálení nebo svědění rekta, svědění, pálení nebo výtok z pochvy, stále obtížnější premenstruační syndrom (PMS), zánět předstojné žlázy, impotence, časté močení, pálení při močení, infekce močového měchýře, atd. Pokud imunitní systém zůstane oslabený dlouhodobě, může se kandida rozšířit do všech částí těla a způsobovat nejrůznější problémy, například únavu, mátožnost, nekoordinovanost pohybů, nesoustředěnost, výkyvy nálad, závratě, bolesti hlavy, zkažený dech, kašel, dušnost, otoky kloubů, artritidu, poruchy zraku, bolesti uší, ztrátu sluchu, pálení a slzení očí, bolesti svalů, deprese, podrážděnost, touhu po sladkém, zvýšenou citlivost na potraviny a chemikálie, astma, sennou rýmu, vícečetné alergie, kopřivku a vyrážky, ekzémy, lupénku a chronická plísňová onemocnění (plísně mezi prsty, lišej) ([www.metabolickety.py.com](http://www.metabolickety.py.com)).

#### **5.4.2 Candida tropicalis:**

*C. tropicalis* může vyvolat u člověka smrtelná systémová onemocnění, sepse, endokarditis, oční onemocnění, kožní kandidózy, paronychia a onychomykózy rukou, otomykózy, vaginální mykózy .

Kolonie těchto kvasinek jsou v průměru 4-5 mm velké, porcelánově bílé, bělavě krémové nebo šedavě krémové, téměř kulovitě vyklenuté, hladké, polomatné až matné a vytvářejí květákovité až kytičkovité kolonie.



Obr. 4 *C. tropicalis* na Sabouraudově agaru  
(Foto: Mgr. Marcela Vejsová)

#### 5.4.3 Candida krusei :

Tento patogen je původcem hlavně vaginální mykózy. Kultury jsou ploché, polomatné nebo matné, okraje jsou laločnaté. Průměr kolonií je asi 3-8 mm.



Obr. 5 *C. krusei* na Sabouraudově agaru  
(Foto: Mgr. Marcela Vejsová)



#### 5.4.4 Candida glabrata :

Kvasinka je etiologickým agens vaginální mykózy, vzácně sepse, fungémie a endokarditis. Kolonie mají průměr 3-7 mm, jsou vysoce lesklé, bělavě krémové, nízké, s okrajem kruhovitým nebo mírně laločnatým.



Obr. 6 *C. glabrata* na Sabouraudově agaru  
(Foto: Mgr. Marcela Vejsová)

#### 5.4.5 Trichosporon beigeli :

Kvasinka *Trichosporon beigeli* se vyskytuje v půdě, vodě, zelenině, tělech savců a ptáků. Je součástí přirozené mikroflóry kůže a sliznice dutiny ústní. Kolonie této kvasinky rychle narůstají, jsou vrásčité, vysoké, sametově lesklé, křehké, voskovitého vzhledu, bílé nebo bíložlutě až krémově zbarvené, typické je pro kolonie zvedající se střední část.

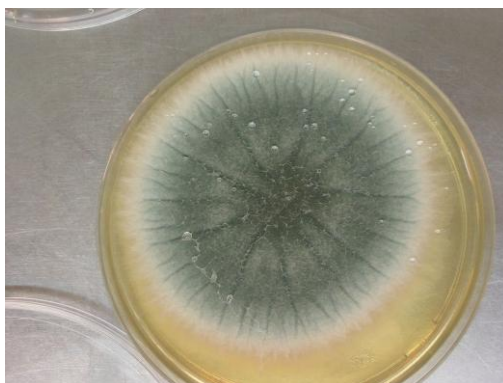


Obr. 7 *Trichosporon beigeli* na Sabouraudově agaru  
(Foto: Mgr. Marcela Vejsová)

#### **5.4.6 Aspergillus fumigatus :**

*A. fumigatus* způsobuje otomykózy, granulomy, aspergilózu plic, bronchů, pohrudnice, tromby v krevních cestách, endokarditis, myokarditis, infekce ledvin, močového měchýře a uretry, abscesy a granulomy v mozku, kožní granulomy a podkožní projevy s postižením lymfatických uzlin, onychomykózy, oční keratitidy a generalizovaná onemocnění.

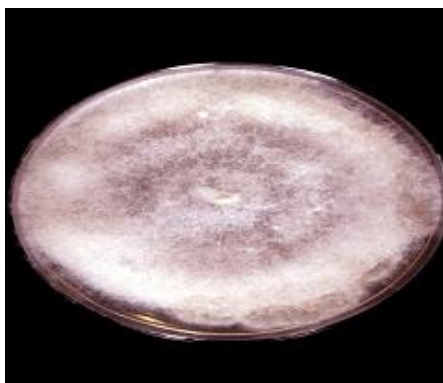
Kolonie o průměru 20-30 mm jsou tmavě zelené, jemně zrnité, nízké, uprostřed mírně vyvýšené, k periférii bělavější. Okraj kolonií je bílý, vláknitý, paprscitě se rozbíhající.



Obr. 8 *A. fumigatus* na Sabouraudově agaru  
([www.commons.wikimedia.org](http://www.commons.wikimedia.org))

#### **5.4.7 Absidia corymbifera :**

Tato mikromyceta vyvolává otitidy, granulom v kůži hrudníku, generalizované mykózy s postižením dýchacího, trávicího ústrojí a mozku. Kolonie jsou na agaru celkem vysoké, povrch je pokryt šedým chmýřím 5-10 mm vysokým. Spodní strana je nezbarvena nebo šedá až žlutavá.



Obr. 9 *A. corymbifera* na Sabouraudově agaru  
([www.microbes.blogfa.com](http://www.microbes.blogfa.com))

#### **5.4.8 Trichophyton mentagrophytes :**

*Trichophyton mentagrophytes* má několik variet: *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*.

Kolonie jsou poměrně velké, o průměru 25-35 mm, jasně bílé, uprostřed s lehkým žlutavým nádechem, hrubě zrnité. Okraj se paprsčité rozbíhá v bezbarvá vlákna (Fragner, 1984).



Obr. 10 *T. mentagrophytes* na Sabouraudově agaru  
([www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au))

## 5.5 Terapie houbových infekcí, antimykotika

V posledních letech dramaticky přibylo incidence i závažnosti humánních mykóz, zejména následkem pokroků v chirurgii, v terapii zhoubných nádorů a v péči provázené zvýšeným používáním širokospektrých antibiotik i důsledkem epidemie HIV. Všechny tyto změny vyvolaly zvýšení počtu pacientů ohrožených houbovými infekcemi. Terapii mykóz ovlivnilo především zavedení perorálních azolových derivátů. Po čase se objevily azolrezistentní kvasinky a zvýšil se počet pacientů ohrožených mykotickými infekcemi. Tím bylo třeba zkoušet a objevovat nové potencionálně antifungálně působící látky, jako např. analogy echinokandinu a nikkomyciny (*Katzung, 2001*).

Podle mechanismu účinku dělíme antifungální léčiva na:

✓ **Specifická:** zasahují obvykle na definovaném místě mikromycetů

Podle chemické struktury se specifická antimykotika rozdělují do tří základních skupin:

- Polyenová antimykotika: (*amfotericin B, nystatin, natamycin*)

Inhibují tvorbu buněčné stěny vazbou na ergosterol a zhoršují její bariérové funkce. Tím dochází ke zvýšení permeability buněčné membrány a ke smrti buňky.

- Azolová antimykotika:

(imidazolová a triazolová antimykotika: *flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, bifonazol, klotrimazol, ekonazol, isokonazol, ketokonazol, mikonazol, oxikonazol, fentikonazol*)

Inhibují cytochromovou lanosterol-14 $\alpha$ -demethylázu, která je nezbytná pro syntézu ergosterolu v buněčné stěně. Jejich antifungální spektrum zahrnuje kvasinky, dermatofyty, dimorfní houby a některé další mikromycety.

- Allylaminová antimykotika: (*naftifin, terbinafin*)

Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici skvalenepoxidázy. Nahromadění skvalenu vede k porušení funkce buněčné stěny a ke smrti buňky. Ve srovnání s azolovými antimykotiky jsou účinnější na dermatofyty, naopak mají menší účinnost na kvasinky.

- Thiokarbamáty: (*tolnaftát, tolciklát, lironaftát*)

Látky inhibují skvalenepoxidázu, čímž blokují biosyntézu sterolů v houbových buňkách.

- Antimetabolity: (*flucytosin*)

Flucytosin se intracelulárně přeměňuje na účinné metabolity a inhibuje syntézu DNA a RNA.

- Echinokandiny: (*caspofungin, mikafungin, anidulafungin*)

Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy významné složky buněčné stěny hub 1,3- $\beta$ -D-glukanu. To vede k depleci glukanu v buněčné stěně, její osmotické nestabilitě a lýze buňky.

- Ostatní: (*morfoliny-amorolfín, ciclopirox, griseofulvin*)

✓ **Nespecifická**: mají obecný fungistatický účinek a obvykle také účinek bakteriostatický, denaturují bílkoviny, ovlivňují permeabilitu buněčné stěny, případně mění pH (*Haber, Suchopár, 1999*).

Mechanismus účinku antimykotik vychází z odlišností fungální a lidské buňky. Polyeny, azoly a allylaminy poškozují buněčnou membránu mikromycet, echinokandiny inhibují syntézu buněčné stěny a antimetabolity představované flucytosinem blokují proteosyntézu a méně syntézu DNA v mykotické buňce (*Rozsypal, 2008*).

### 5.5.1 Specifická antimykotika:

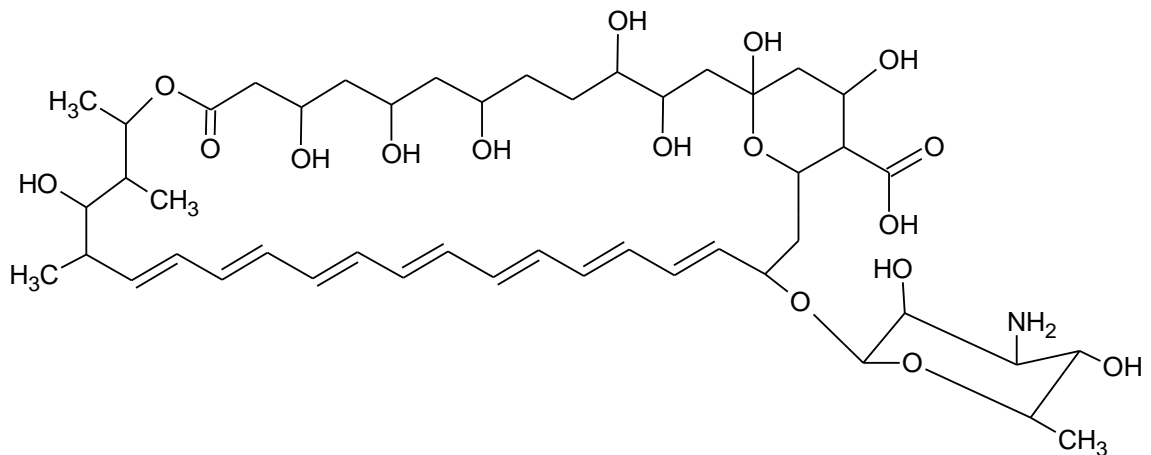
#### ➤ **Polyenová antimykotika:**

Tato léčiva jsou produkována *Streptomyces spp.* Jejich hlavní indikací je terapie kandidóz a některých mykóz vyvolaných saprofitickými mikromycety (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*) (Haber, Suchopár, 1999).

- Amfotericin B:

Amfotericin B je makrolidové polyenové antimykotikum se systémovým antimykotickým účinkem. Mezi organizmy citlivé na amfotericin B řadíme kandidy, kryptokoky, aspergily, mukory, dále také *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix spp.*, *Leishmania spp.*, parazity *Plasmodium falciparum*. K hlavním klinickým indikacím patří: kandidové infekce (kandidémie, diseminovaná kandidóza, kandidová peritonitida, urocystitida, kandidóza oka a plicní kandidóza), aspergilózy, kryptokokové infekce a mukormykózy. Amfotericin B se perorálně nevstřebává, podává se nitrožilní infúzí, ale i do tělních dutin nebo endobronchiálně. Existuje řada lékových forem obsahujících amfotericin B na tukových nosičích (Lincová, 2007). Tyto lipidové přípravky amfotericinu B – liposomální amfotericin B (L-AMB, Ambisome – v ČR není registrován), amfotericin B lipidový komplex (ABLC, Abelcet) a amphotericin B koloidní disperze (ABCD, Amphocil) ([www.farmakoterapie.cz](http://www.farmakoterapie.cz)) jsou oproti konvenčnímu amfotericinu B výhodnější, především díky nižší nefrotoxicitě. Nevýhodou je poměrně dost vysoká cena.

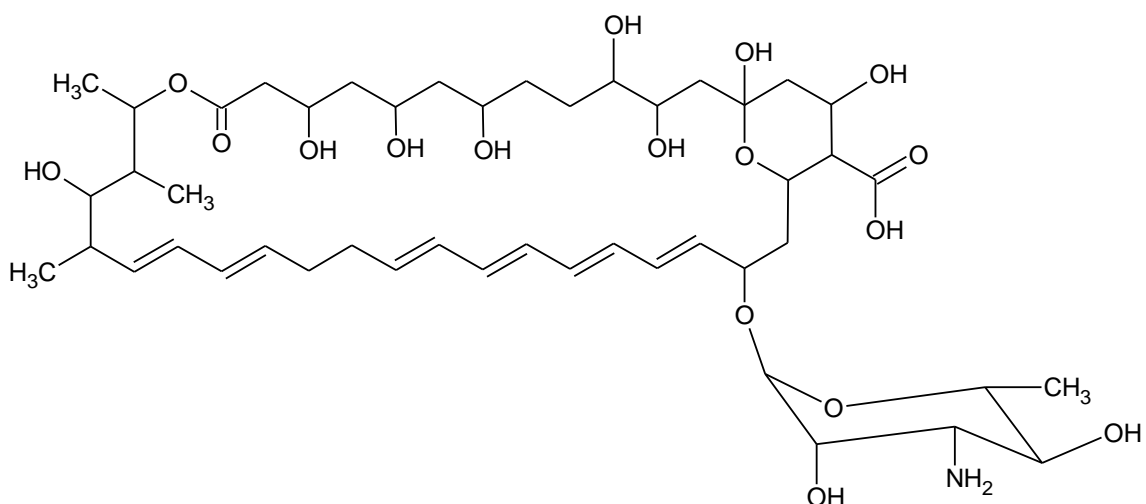
Obr.11 Amfotericin B



- Nystatin:

Jde o polyenové antimykotikum s lokálním fungistatickým až fungicidním účinkem. Do spektra jeho účinku patří rody *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* a *Aspergillus*. Nystatin je indikován u povrchových kandidóz a k doplnění léčby vaginálními tabletami při poševní kandidóze. Není vhodný k léčbě endomykóz. Při aplikaci na kůži nebo slinice se neresorbuje (Lincová, 2007).

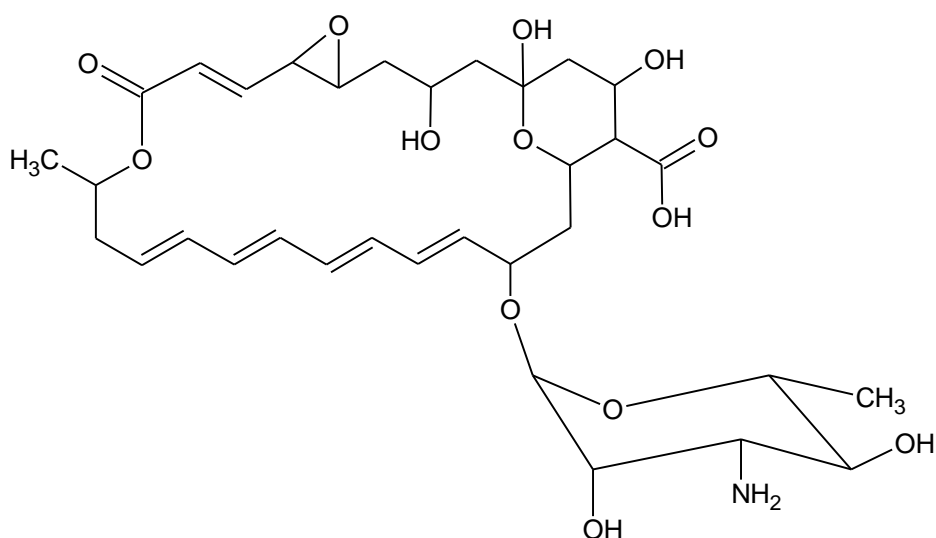
Obr.12 Nystatin



- Natamycin:

Účinek lokálního polyenového antimykotika s fugistatickým působením spočívá ve vazbě na ergosterol. Jeho spektrum účinku zahrnuje kvasinky, dermatofyta, plísně. Terapeuticky lze využít účinek proti kandidám a *Trichomonas vaginalis*. Je indikován u kandidózy ústních koutků, vulvovaginální kandidózy, onychomykózy a kandidové paronychie. Při p.o. podání nepůsobí na bakterie a tím nenarušuje fyziologickou mikroflóru (Lincová, 2007).

Obr.13 Natamycin



➤ **Azolová antimykotika:**

Mezi systémová azolová antimykotika řadíme např. imidazoly mikonazol a ketokonazol a triazoly flukonazol a itrakonazol.

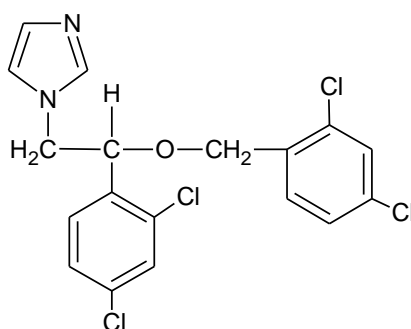
- Mikonazol:

Jedná se o nejstarší širokospektré imidazolové antimykotikum, které je v dnešní době nahrazováno novějšími deriváty. Na mikonazol jsou citlivé kandidy, kryptokoky, některé aspergily, dále také rody *Coccidioides*, *Paracoccidioides* a *Histoplasma*. Účinek byl prokázán i na některé grampozitivní bakterie (*Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, na enterokoky, stafylokoky, pyogenní streptokoky) a na *Helicobacter pylori*. Hlavními indikacemi mikonazolu jsou systémové kandidózy, kryptokokózy, dermatomykózy těžšího klinického průběhu, blastomykóza, histoplasmóza,



kokcidioidomykóza, nokardióza. Mikonazol se metabolizuje v játrech a snadno proniká k zánětlivým ložiskům. Nežádoucí účinky, jako gastrointestinální potíže, alergické projevy až anafylaktický šok, vedly k postupnému ústupu používání mikonazolu ve prospěch flukonazolu a itrakonazolu (*Lincová, 2007*).

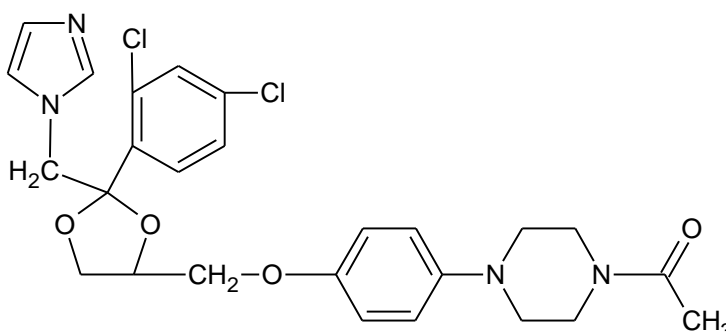
Obr.14 Mikonazol



- Ketokonazol:

Jde také o širokospektré systémové azolové antimykotikum, které je dnes rovněž nahrazováno novějšími deriváty itrakonazolem a flukonazolem. Ketokonazol se významně akumuluje v kůži, kde přetrvává až 5 dnů po vysazení léčby. Hlavními indikacemi jsou proto infekce kůže, nehtů a vlasů způsobené dermatofyty nebo kvasinkami (dermatofytózy, onychomykózy, pityriasis versicolor, p. capitis, chronická mukokutánní kandidóza) a dále také kvasinkové infekce gastrointestinálního traktu (*Lincová, 2007*).

Obr.15 Ketokonazol

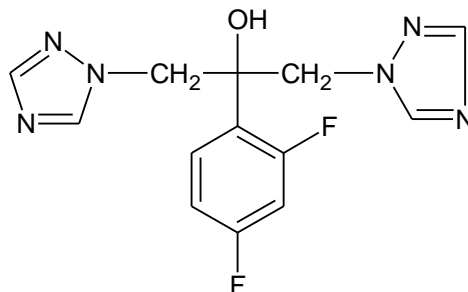


- Flukonazol:

Novější systémové triazolové antimykotikum pro parenterální i perorální podání je bis-triazolový derivát propanolu a má vysokou antifungální specifitu

účinku. Ze všech azolových derivátů má nejvyšší terapeutický index, nejméně nežádoucích a lékových interakcí. Mezi nežádoucí účinky flukonazolu patří většinou nezávazné dyspeptické potíže, bolesti hlavy, kožní exantém a asymptomatické zvýšení ALT. Jeho antimikrobiální spektrum zahrnuje *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, dermatofyty (*Microsporum spp.* a *Trichophyton spp.*), *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*. Rezistentní je druh *Candida krusei* a sníženou citlivost vykazují i druhy *C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*. Flukonazol neúčinkuje na aspergily a zygomycety. Mezi nejdůležitější klinické indikace flukonazolu patří systémové kandidózy, kandidémie, orofaryngeální kandidóza, chronická orální, jícnová, mukokutánní kandidóza, vulvovaginální kandidóza a balanitida, kryptokokózy (plicní, nitrolební, kožní), dermatomykózy (tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris, onychomykóza, tinea versicolor), kožní kandidové infekce a systémové endemické mykózy (kokcidiomykóza, parakokcidiomykóza, sporotrichóza a histoplasmóza) (Lincová, 2007).

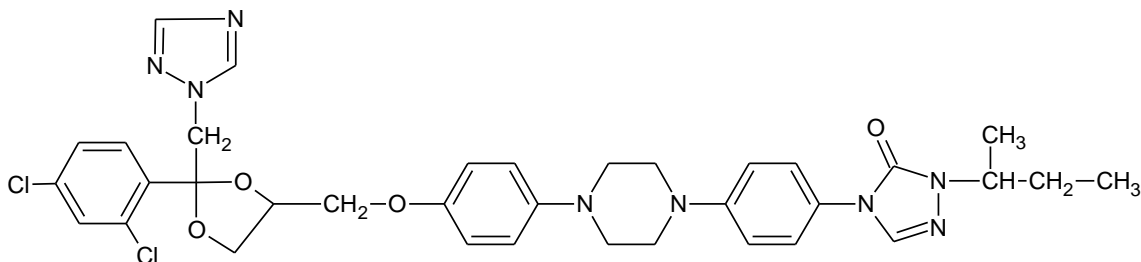
Obr.16 Flukonazol



- Itrakonazol:

Itrakonazol je systémové triazolové antimykotikum pro parenterální i perorální podání. Má vysokou antifungální specifitu. Je účinný i proti aspergilům.

Obr.17 Itrakonazol

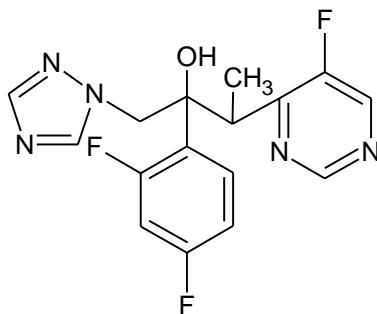


Mezi nová triazolová antimykotika 2. generace řadíme:

- Vorikonazol:

Jedná se o analog flukonazolu, který je již u nás běžně dostupný v perorální i parenterální formě a je pro něj charakteristická vysoká antifungální aktivita proti většině druhů kandid a fungicidní účinek na aspergily. Je tedy lékem volby u závažných aspergilových infekcí a infekcí vyvolaných kandidami rezistentními na flukonazol (*Lincová, 2007*).

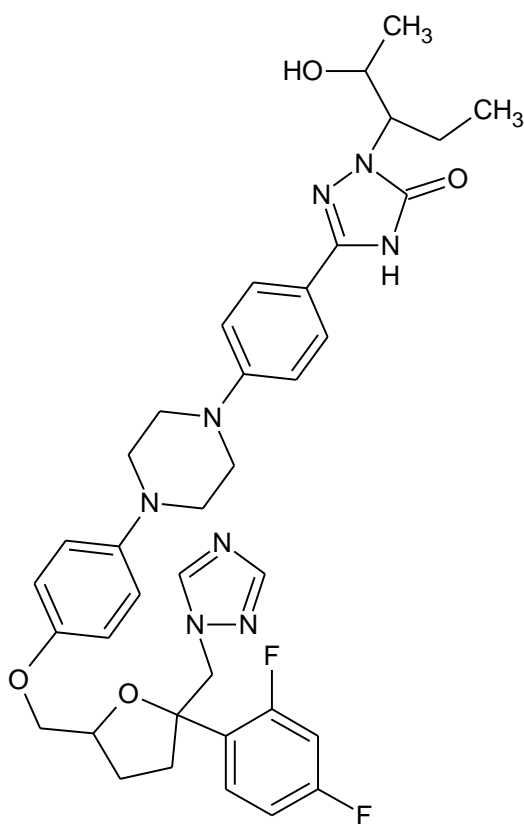
Obr.18 Vorikonazol



- Posakonazol:

Posakonazol je analogem itrakonazolu. Je účinnější než flukonazol a itrakonazol. Má široké spektrum účinku a je dostupný zatím jen v perorální formě (*Haber, 2005*).

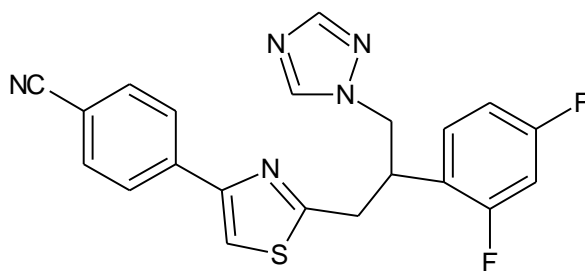
Obr. 19 Posakonazol



- Ravukonazol:

Ravukonazol je účinný proti *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, dermatofytům. Méně citlivé jsou kmeny *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* a *Candida krusei* ([www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org)).

Obr. 20 Ravukonazol

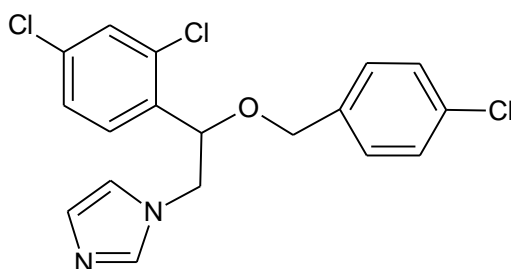


Mezi lokální azolová antimykotika patří např. ekonazol, klotrimazol, fentikonazol a tiokonazol.

- Ekonazol:

Dermatologikum, lokální azolové antimykotikum, působí fungistaticky až fugicidně na proliferující houby, kvasinky a plísně. Nepůsobí na spory (konidie). Působí bakteriostaticky na většinu grampozitivních bakterií. Při lokální aplikaci na kůži je systémová absorpce (ve formě nitrátu) velmi nízká. Většina aplikované dávky zůstává na povrchu kůže, ale přesto se ve stratum corneum vytváří koncentrace, která přesahuje minimální inhibiční koncentraci pro dermatofyty. Inhibiční koncentrace je dosaženo v epidermis a v hloubce odpovídající střední vrstvě kůže. Hlavními indikacemi ekonazolu jsou dermatomykózy vyvolané dermatofyty (trichofycie, epidermofycie, mikrosporie), kvasinkami (kandidózy), fakultativně patogenními houbami i plísněmi. Dalšími indikacemi jsou smíšené mykotické a bakteriální kožní infekce vyvolané dermatofyty nebo kvasinkami v kombinaci se streptokoky, stafylokoky, nokardiemi, také pityriasis versicolor. Nežádoucí účinky, jako mírné lokální podráždění, kontaktní alergická reakce, se vyskytují velmi zřídka, především u citlivých osob (*Haber, 2005*).

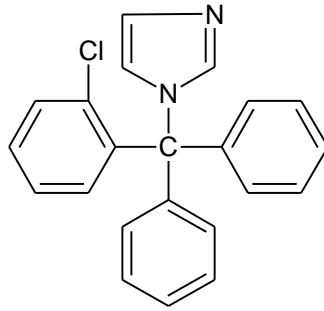
Obr.21 Ekonazol



- Klotrimazol:

Lokální azolové antimykotikum působí také na proliferující houby, plísně a kvasinky jako ekonazol. Klotrimazol se ukládá v rohové vrstvě epidermis v koncentraci převyšující antifungální i antibakteriální MIC. Proniká do nejnížší vrstvy epidermis v dostatečně účinné dávce. Perkutánní resorbce je velmi nízká. Indikacemi klotrimazolu jsou dermatomykózy, kandidózy a keratomykózy (pityriasis versicolor), paronychie, balanitidy a vulvitidy (*Haber, 2005*).

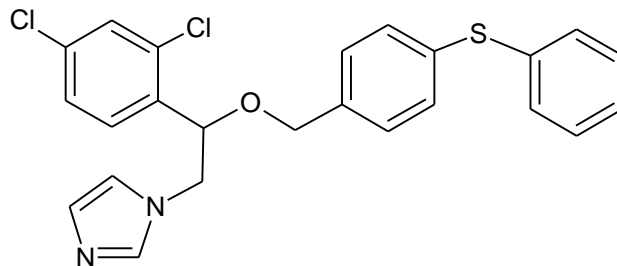
Obr.22 Klotrimazol



- Fentikonazol:

Lokální azolové antimykotikum vlastnostmi podobné jiným azolům je indikováno u dermatomykóz, včetně pityriasis versicolor, a smíšených mykotických a bakteriálních infekcí citlivých na fentikonazol (např. vulvovaginální kandidóza) (*Haber, 2005*).

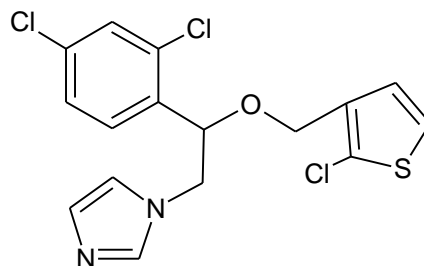
Obr.23 Fentikonazol



- Tiokonazol:

Tiokonazol je lokální azolové antimykotikum určené k terapii kandidových vulvovaginitid. Stejně tak se používá oxikonazol a terkonazol.

Obr.24 Tiokonazol



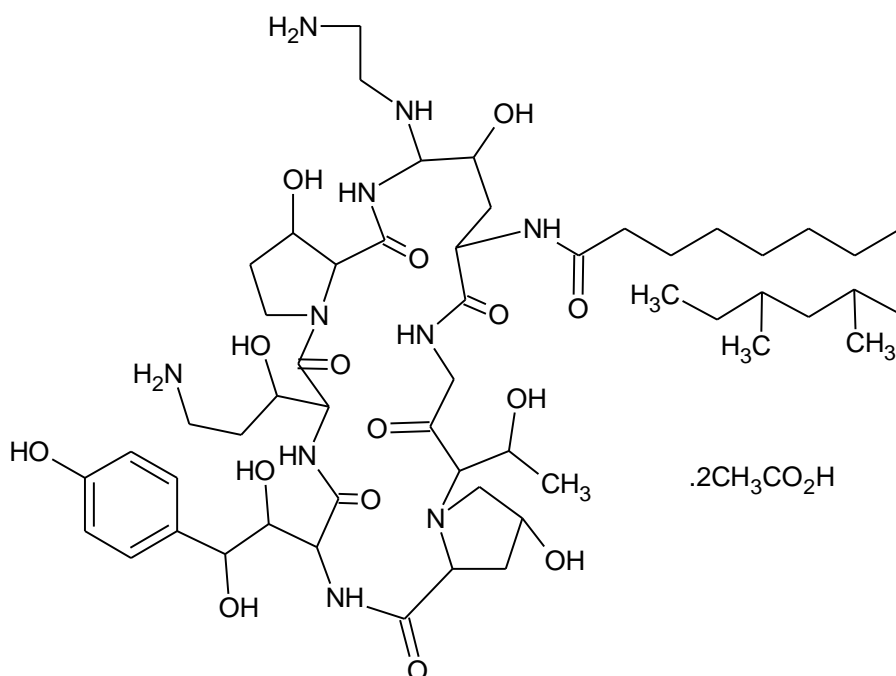
➤ **Echinokandiny:**

Chemicky jde o lipopeptidy o velké molekulové hmotnosti se zcela odlišným mechanismem účinku od ostatních skupin antimykotik, cestou biotransformace mimo enzymatický systém cytochromu P-450, což umožňuje jejich použití v kombinaci prakticky se všemi ostatními antimykotiky a také s tím souvisí minimum lékových interakcí. Echinokandiny mají široké spektrum účinku, mezi něž patří kandidy a aspergily, histoplazmata a cystická forma *Pneumocystis jiroveci* (dříve *P.carinii*) (Haber, 2005).

• Kasprofungin:

Jde o parenterální přípravek používaný jako alternativní léčba těžkých orgánových nebo systémových mykóz v případě intolerance amfotericinu B. Je zaznamenán aditivní nebo synegetický účinek s amfotericinem B nebo azoly (Lincová, 2007).

Obr. 25 Kasprofungin



V roce 2008 byl registrován přípravek Ecalta s obsahem anidulafunginu a počítá se s registrací mikafunginu (Haber, 2005).

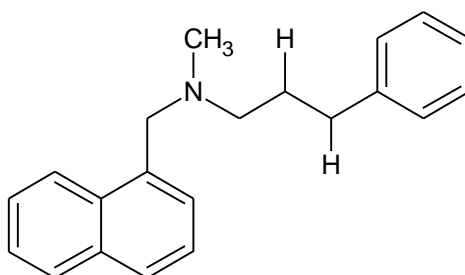
➤ **Allylaminová antimykotika:**

Tato skupina látek je po lokální aplikaci účinná proti dermatofytům, ale ve srovnání s azolovými antimykotiky je méně účinná proti kvasinkám.

- Naftifin:

Naftifin je širokospektré fungicidní antimykotikum, které je účinné proti dermatofytům, kvasinkám (včetně *Pityrosporum spp.*), *Aspergillus spp.*, působí také na některé grampozitivní a gramnegativní mikroorganismy. Má protizánětlivý účinek. Hlavními indikacemi jsou dermatomykózy (kožní kandidózy, tinea corporis, tinea pedis, pityriasis versicolor), smíšené (mykotické a bakteriální) infekce kůže. Používá se také jako doplněk perorální terapie onychomykóz. Nežádoucí účinky jsou vzácné, ojediněle se může vyskytnout pálení, svědění, zarudnutí a suchost kůže v místě aplikace. Vzácné jsou alergické kožní reakce (Haber, Suchopár, 1999).

Obr.26 Naftifin

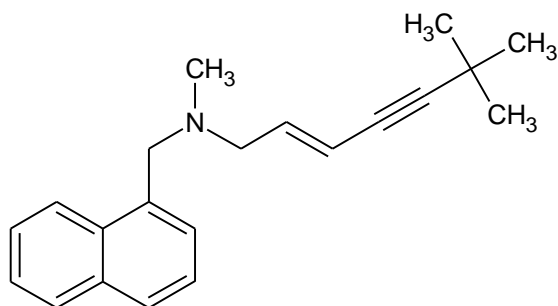


- Terbinafin:

Fungicidní antimykotikum se širokým antifungálním spektrem zahrnující dermatofyty, kvasinky a dimorfní houby. Na terbinafin je méně citlivý *Aspergillus spp.* Látka působí také na některé grampozitivní mikroorganismy (stafylokoky, streptokoky, *Propionibacterium acnes*) a gramnegativní mikroorganismy (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Dermatomykózy (kožní kandidózy, tinea cruris, tinea corporis, tinea pedis, pityriasis versicolor) jsou hlavními klinickými indikacemi. Nežádoucí účinky jsou ojedinělé a stejné jako u naftifinu (Haber, Suchopár, 1999).



Obr.27 Terbinafin



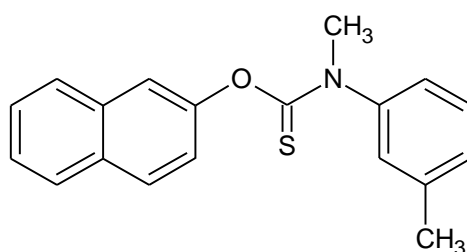
➤ **Thiokarbamáty:**

• Tolnaftát:

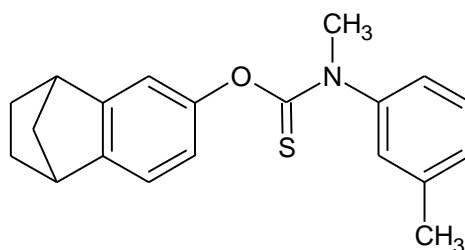
Tolnaftát je antimykotikum indikováno k léčbě onychomykóz a mykóz vlasů a vousů.

Další antimykotikum ze skupiny thiokarbamátů tolciklát je hydrogenovaným analogem tolnaftátu. V roce 2000 byl do praxe zaveden liranaftát (Hartl et al., 2006).

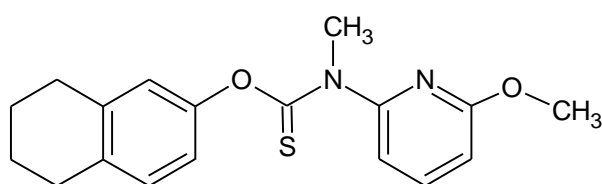
Obr.28 Tolnaftát



Obr.29 Tolciklát



Obr.30 Liranaftát



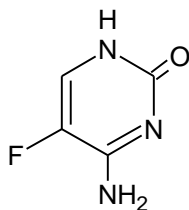
➤ **Antimetabolity:**

• Flucytosin (5-fluorcytosin):

Léčivo bylo objeveno při hledání nových kancerostatik. Nepůsobí sice protinádorově, ale ukázalo se, že má antimykotické účinky. Po chemické stránce se jedná o pyrimidinový analog příbuzný chemoterapeutiku fluorouracilu. Nežádoucí účinky jsou dány metabolickou přeměnou na toxické cytostatikum fluorouracil. Nejčastější nežádoucí účinky jsou toxické ovlivnění kostní dřeně s anémií, leukopenií a trombocytopenií. Může se rozvinout forma toxické enterokolitidy. Látka má úzké terapeutické rozmezí se zvýšeným rizikem toxicity při vyšších hladinách látky a s rezistencí, která se rychle vyvíjí při subterapeutických koncentracích.

Klinické využití flucytosinu zahrnuje *Cryptococcus neoformans*, některé druhy kandid a kožní plísně vyvolávající chromoblastomykózu. Flucytosin se nepoužívá v monoterapii, aby se zabránilo vzniku sekundární rezistence. Je známé také jeho synergické působení s ostatními antimykotiky. V současné době se kombinuje flucytosin s amfotericinem B k terapii kryptokokové meningitidy a s itraconazolem při chromoblastomykóze (Katzung, 2001).

Obr.31 Flucytosin



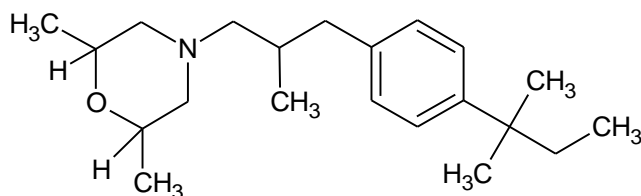
➤ **Ostatní specifická antimykotika:**

Používají se k lokální terapii dermatomykóz a některá z nich k terapii onychomykóz. Mají různé mechanismy účinku. Působí fungistaticky až fungicidně.

- Amorolfin:

Amorolfin je morfolinové širokospektré fungistatické až fungicidní antimykotikum, které je účinné proti dermatofytům, kvasinkám a dimorfním houbám. *Aspergillus spp.* je méně citlivý. Mechanismus účinku spočívá v inhibici některých enzymových systémů, čímž brání tvorbě důležité složky buněčné stěny hub ergosterolu. Hlavními indikacemi jsou onychomykózy a dermatomykózy (kožní kandidózy, tinea cruris, tinea corporis, tinea pedis, pityriasis versicolor). Nežádoucí účinky zahrnující místní podráždění jsou ojedinělé (*Haber, Suchopár, 1999*).

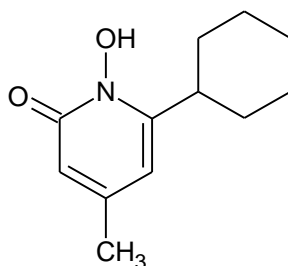
Obr.32 Amorolfin



- Ciklopirox:

Široké antifungální spektrum pyridinového fungistatického až fungicidního antimykotika zahrnuje kvasinky, dermatofyty, vláknité a dimorfní houby. Působí také na některé grampozitivní i gramnegativní mikroorganismy (*Haber, Suchopár, 1999*). Ciklopirox dobře adhezuje ke keratinu, proniká snadno nehtovou ploténkou a vytváří účinné koncentrace i v nehtovém lůžku (*Korting, 1995*). Mezi klinické indikace této látky patří onychomykózy, dermatomykózy (kožní kandidózy, tinea corporis, tinea pedis, pityriasis versicolor), seboroická dermatitida, mykotické infekce zevních genitálií, smíšené mykotické a bakteriální kožní infekce. Používá se také jako doplněk perorální terapie onychomykóz (*Haber, Suchopár, 1999*).

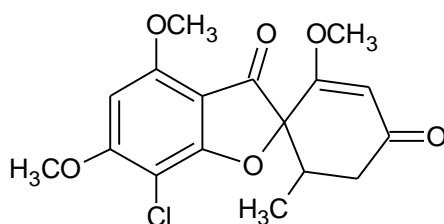
Obr.33 Ciklopirox



- Griseofulvin:

Antimykotikum, odvozené od produktu plísně *Penicillium griseofulvens*, zasahuje do intracelulárních mikrotubulů a brání tvorbě mitotického vřeténka. Působí na řadu dermatofyt. Lze jej použít v léčbě tinea capitis způsobené rodem *Microsporum* (Rozsypal, 2008).

Obr.34 Griseofulvin



➤ **Vyvíjená antimykotika:**

Vývoj systémových antimykotik neustále pokračuje. V současné době je studován účinek nových skupin - pradimycinů (benanomycin A), nikkomycinů (nikkomycin Z) a derivátů sordarinu (Rozsypal, 2008).

### 5.5.2 Nespecifická antimykotika:

Nespecifická antimykotika se používají obvykle jako doplněk specifické terapie. Jsou vhodná k občasnému prostrídání terapie, jehož cílem je snížení rizika vzniku rezistence na specifická antimykotika. Do skupiny těchto antimykotik patří různé kyseliny (*acidum salicylicum*, *acidum boricum*, *acidum benzoicum*, *acidum undecylenicum*) a jejich deriváty, jako některé aldehydy (*formaldehyd*), organická barviva (*viride nitens*, *methylrosanilini chloridum*, *Solutio Castelani*), deriváty fenolů (*resorcinol*, *2-chlor-4-nitrophenol*,

*hexachlorophen*) a 8-chinolinolu (*cloroxin*), jód a jeho sloučeniny, sloučeniny rtuti (*phenylhydrargyri boras*), síra a její deriváty (*Haber, Suchopár, 1999*).

Podle způsobu podání se antimykotika dostupná v dnešní době dělí do několika skupin:

- ✓ **Celkově** (perorálně nebo parenterálně) podávaná antimykotika pro terapii systémových infekcí: amfotericin B, flucytosin, azoly (mikonazol, vorikonazol, itrakonazol, ketokonazol, flukonazol)
- ✓ **Perorálně** podávaná antimykotika pro terapii mukokutánních infekcí: griseofulvin, terbinafin
- ✓ **Lokálně** podávaná antimykotika pro terapii mukokutánních infekcí: nystatin, lokální azoly (klotrimazol, mikonazol), lokální allylaminy (terbinafin, naftifin) (*Katzung, 2001*).

## **5.6 Testování antifungální aktivity *in vitro***

Laboratorní sledování citlivosti původců mykóz k antimykotikům se v současnosti stává nezbytností. Se vzrůstajícím počtem mykotických onemocnění rostou také snahy o vývoj nových antifungálních látek, u kterých je třeba porovnat jejich účinek ještě před klinickým použitím. Také zvyšující se výskyt rezistentních kmenů některých hub nutí lékaře k výběru látky, která si ještě zachovala *in vitro* účinnost. Laboratorní testování citlivosti umožňuje také racionálnější přístup k léčení mykóz. Vede lékaře k diferencovanému, často zvýšenému dávkování systémových antimykotik u onemocnění, jejichž původci jsou k dané antifungální látce jen slabě citliví. V těchto případech se mohou hranice mezi účinností a toxicitou velmi přibližovat. U některých antimykotik, která mají hodnoty terapeutických a toxických sérových koncentrací velmi blízké, je laboratorní posouzení jejich aktivity velmi výhodné. Metody testování antifungálních látek *in vitro* lze využít také při stanovení hladin antimykotik v tělních tekutinách. Získané výsledky testování však vedou jen k relativním, nikoliv absolutním závěrům o klinické použitelnosti daného preparátu.

Při laboratorním testování citlivosti antimykotik *in vitro* mohou být výsledky ovlivněny mnoha faktory, např. velikostí inokula (se vzrůstající velikostí inokula roste stupeň rezistence), pH (např. ve výrazně kyselém prostředí dochází ke ztrátě aktivity azolových antimykotik), prodlužování doby inkubace snižuje citlivost kmenů k většině antimykotik (Otčenášek *et al.*, 1990).

K metodám pro testování citlivosti k antifungálním látkám *in vitro* patří:

- Difúzní disková metoda
- Testy stanovení minimální inhibiční koncentrace (diluční metody)
  - Zkumavková diluční metoda (bujónová makrodiluce)
  - Agarová diluční metoda (plotnová modifikace)
  - Diluční mikrometoda (bujónová mikrodiluce)

#### **5.6.1 Difúzní disková metoda:**

Tato metoda stanovuje citlivost, resp. rezistenci agens podle velikosti zóny růstové inhibice kolem disků obsahujících určité koncentrace antimykotik. Výhodou této metody je snadnost a rychlost provedení, nevýhodou pak ne zcela přesná interpretace výsledků, která je ovlivněna různým koncentračním spádem antimykotik v agaru, způsobeným variabilní rozpustností, schopností difúze a stabilitou těchto látek.

#### **5.6.2 Diluční metody:**

Diluční metody pro stanovení minimální inhibiční koncentrace existují ve třech modifikacích:

##### a) Zkumavková diluční metoda (makrodiluční bujónová metoda)

Inhibice růstu testované houby se sleduje v řadě zkumavek s tekutým médiem obsahujícím různé koncentrace antimykotika. Koncentrace antifungální látky ve zkumavkách klesá dvojnásobně geometrickou řadou. Jako MIC se hodnotí nejnižší koncentrace antimykotika, při které nedochází k makroskopicky pozorovanému růstu houby. U některých preparátů dochází při určité koncentraci pouze k částečné růstové inhibici a hranice pro odečítání jsou

neostré, je třeba srovnání s růstem organismu v kontrolní zkumavce, která neobsahuje antimykotikum.

b) Agarová diluční metoda

Tato pracná a málo úsporná metoda se nehodí pro rutinní testování. Její výhodou je snadnost odečítání a nevýhodou je nemožnost stanovení MFC (koncentrace antimykotika potřebná k usmrcení testovaných agens) a závislost výsledku na rozpustnosti a disperzitě antimykotika v agaru.

c) Diluční bujónová mikrometoda

Metoda, při které se používá polyetylenových mikrotitračních destiček, umožňuje rutinní stanovení MIC u většího počtu antimykotik a v celých souborech kmenů (*Otčenášek et al., 1990*).

Mikrotitrační destičky jsou naplněny médiem obsahujícím stoupající koncentrace antimykotik. Z vyšetřovaného kmene se předepsaným způsobem připraví standardní inokulum, naředěná suspenze bujónové kultury, a naočkuje se do jamek mikrodestiček. Podle růstu mikroba se po určité době odečítá, zda bujón v jamkách zůstal čirý nebo vykazuje známky růstu mikroba (zákal nebo sediment). Za MIC se považuje nejnižší koncentrace antimykotika, která byla ještě schopna potlačit růst mikroba (*Votava, 2005*).

Hlavní výhodou této metody je snížení finančních nákladů na kultivační půdy i antimykotika, jednoduchost, vysoká standardnost provedení a možnost automatizace (*Otčenášek et al., 1990*).

d) Agarová difúzní metoda – E-test

E-test je kvantitativní difúzní metoda, umožňující stanovení MIC antibiotik i antimykotik. Na proužek porézního papíru jsou nanášeny klesající koncentrace látky ([www.uzs.tul.cz](http://www.uzs.tul.cz)). Proužek je umístěn do Petriho misky obsahující kulturu mikroorganismů, která má být otestována. Destička se inkubuje a po určité době se odečítají výsledky. Kolem proužku se vytvoří zóna inhibice růstu mikroorganismu oválného tvaru. Proužek obsahuje stupnici, která v místě, kde inhibiční zóna protíná proužek, udává hodnotu MIC ([www.de.wikipedia.org](http://www.de.wikipedia.org)). Tato metoda je pro rutinní používání poměrně nákladná, neboť samotná patentovaná metoda přípravy gradientu na proužku papíru je pracná ([www.uzs.tul.cz](http://www.uzs.tul.cz)).

## **5.7 Laboratorní diagnostika kvasinek a plísní**

Většina mikrobiologických laboratoří slouží jako diagnostické laboratoře zajišťující mikrobiologické vyšetření zaslaného vzorku. Účelem tohoto vyšetření je zjistit ve vzorku, který pochází obvykle z nemocného, etiologické agens, tedy původce infekce.

Etiologické agens lze v infikovaném organismu prokázat buď přímo, nebo nepřímo.

**Přímý průkaz** spočívá v nálezu mikroba ve vyšetřovaném vzorku. Mikroba můžeme pozorovat pod mikroskopem (mikroskopický průkaz) nebo vykultivovat (izolace mikroba) např. na kultivačních půdách. Dokazuje se také přítomnost typických mikrobiálních složek ve vzorku (průkaz mikrobiálních antigenů nebo nukleových kyselin). Při kultivaci mikroba se zjišťuje jeho citlivost na antibiotika, antimykotika, chemoterapeutika.

**Nepřímý průkaz** infekčního agens se zakládá na průkazu specifických stop, které mikrob v organismu zanechal (průkaz protilátek a průkaz antigenů) (Votava, 2005).

### **5.7.1 Mikroskopická vyšetření:**

V preparátu hledáme houbové elementy, hodnotíme jejich počet a morfologii: výskyt samostatných, pučících nebo dělených buněk, všímáme si zda jsou vlákna široká nebo úzká, septovaná nebo neseptovaná, charakteru větvení vláken.

U tekutých materiálů (sputum, hnis, výtěry...) používáme barvení podle Grama (příp. Giemsy) a také fluorescenční mikroskopii.

U kožních materiálů se používají louhové preparáty (10-20 % KOH nebo NaOH) přibarvované Parkerovým inkoustem a fluorescenční mikroskopická metoda barvením blankophorem (Haber, 1995).

- **Mikroskopické preparáty z biologického materiálu :**

Tento průkaz je málo citlivý, ale rychlý a levný. Vzorek se vyšetřuje v podobě fixovaného a barveného preparátu.



- Mikroskopické preparáty z kultur :

Mezi tyto metody řadíme např. nativní preparát (z izolované kolonie nebo ze souvislého nárůstu na agarové půdě se vyjme kličkou malá část i s kouskem agaru a vloží se na podložní sklo) a mikrokultury na podložním skle (kulturou naočkovaný bloček agaru na podložním skle se zakryje krycím sklíčkem, po 2-4 denní kultivaci ve vlhké komůrce se prohlíží pod mikroskopem) (*Fragner, 1984*).

### **5.7.2 Kultivační vyšetření :**

- Živné půdy:

Existuje spousta druhů živných půd lišících se svým složením. Pro jednotlivé mikromycety jsou vhodné různé půdy. Kultivuje se na selektivně diagnostických půdách: Sabouraudův agar (univerzální kultivační půda pro mikromycety, pro potlačení růstu nežádoucí bakteriální flóry se přidává chloramfenikol a pro potlačení růstu vzdušných plísní cykloheximid), Czapek-Dox agar, žlučový agar, vaječné půdy, kukuřičný agar... Většina kvasinek narůstá za 48 hod při 35°C, kultury vláknitých mikromycet za 5 až 7 dní a dermatofyty za 1 až 3 týdny při 26°C (*Haber, 1995*).

- Primokultury:

Asepticky odebraný infekční materiál (sputum, hnis, šupiny kůže nebo nehtů, vlasy, výtěry dutin, stěry) se naočkuje na povrch agarů na plotně či ve zkumavkách a inkubuje se. Po určité době se zjišťuje přítomnost houby (*Fragner, 1984*).

### **5.7.3 Další možnosti diagnostiky :**

- Makromorfologie – hodnotí se zevní vzhled kolonií (hlavně u vláknitých mikromycet)
- Cukerné auxanogramy – slouží k druhové identifikaci kvasinek a ukazují, které cukry je daný druh kvasinky schopen asimilovat, což se projeví mléčně zakalenou zónou růstu v okolí cukerného disku. Zastoupení utilizovaných cukrů je pro jednotlivé druhy kvasinek charakteristické.

- Dusíkové auxanogramy – ukazují, který zdroj dusíku (dusičnan draselný, síran amonný) je kultura schopna asimilovat.
- Zymogramy – zjišťují kvasné schopnosti kultur. Zkvašení se projeví změnou pH půdy, pozoruje se změna zbarvení pH indikátoru. Při kvašení se uvolňuje oxid uhličitý, který se dá zachytit (*Fragner, 1984*).

#### **5.7.4 Komerční identifikační soupravy:**

- CANDIDAtest 21 (Lachema, Česká republika) – souprava určená pro rutinní identifikaci kvasinek především z klinického materiálu, umožňuje provést identifikaci čtyřiatřiceti druhů kvasinek pomocí jedenadvaceti biochemických testů (chromogenní substráty, dekarboxyláza a asimilační reakce). Pro každou skupinu reakcí je v soupravě umístěna negativní kontrola usnadňující vizuální odečet pozitivní reakce. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky, vždy tři řady po osmi jamkách obsahujících testy pro identifikaci jednoho kmene (*www.lachema.com*).
- AUXACOLOR systém (Sanofi Diagnostics Pasteur, Francie) – identifikační souprava založená na principu asimilace cukrů. Výhodou je snadné provedení testu a jednoduchá interpretace výsledků, je vhodný pro počáteční screening v laboratořích, souprava je složena z umělohmotných destiček se šestnácti jamkami, obsahuje negativní i pozitivní kontrolu, růst mikroorganismu v jamkách signalizuje vznik zákalu nebo barevný přechod z modré barvy na žlutou (pH indikátorem je zde bromkresolová červeň) (*Davey et al., 1995*).
- ID 32 C (BioMerieux, Francie) – Nejpoužívanější rychlá metoda vhodná k identifikaci klinicky významných aerobních mikromycet (*Muir, 1997*). Souprava, skládající se z jednorázově používaných plastových pásů s jamkami, umožňuje provést 29 asimilačních reakcí. Obsahuje také negativní kontrolu, jamky pro testování citlivosti mikroorganismů (obsahují cykloheximid pro potlačení růstu nežádoucích plísní) a kolorimetrický test. Systém má databázi zahrnující 63 různých druhů kvasinek. Výsledky lze odečíst již po 48 hod při teplotě inkubace 30°C (*Fricker-Hidalgo, 1996*).
- VITEK systém (BioMerieux, Francie) – plně automatizovaný mikrobiologický systém, který identifikuje mikroorganismy a zároveň určí stupeň jejich citlivosti k různým druhům antibiotik a antimykotik, výsledky

jsou dostupné již za několik hodin, optický skener automaticky čte růst mikroorganismů na základě redukce světla způsobené nárůstem mikroorganismu a vznikem zákalu nebo biochemické reakce ([www.findarticles.com](http://www.findarticles.com)).

#### **5.7.5 Chromogenní půdy:**

Slouží k rychlé diagnostice kvasinek. Chromogenní směs podporuje vznik barevných sloučenin, které vznikají v závislosti na degradaci specifickými enzymy produkovány jednotlivými druhy kandid, různě zbarvené kolonie umožňují identifikaci a diferenciaci jednotlivých druhů kvasinek rodu *Candida* (zejména *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. glabrata*) podle barvy i morfologie kolonií. Agary obsahují speciální látky podporující růst kandid, bakteriální kontaminanty jsou inhibovány např. přidáním chloramfenikolu ([www.pmlmicro.com](http://www.pmlmicro.com)).

Příkladem chromogenních půd je:

- CHROMAGAR Candida
- COLOREX Candida agar
- CANDISELECT

## 6. Experimentální část

(testování látek mikrodiluční bujónovou metodou)

### 6.1 Pomůcky a přístroje:

Sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem s víčky, mikropipety, sterilní špičky, 12ti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky, Búrkerovy komůrky

Laminární box, termostat, mikroskop, vortex

### 6.2 Chemikálie:

RPMI 1640, MOPS (3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina), glukóza, dimethylsulfoxid (DMSO), NaOH, sterilní voda

### 6.3 Použitá média:

**Tkáňové médium RPMI 1640 SEVAC 5x koncentrované:**

Tab. 1 Složení média RPMI 1640  
1000ml média obsahuje v g :

Dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5	L- prolin	0,1
Chlorid draselný	2,0	L- serin	0,15
Hydrogen fosforečnan sodný .2H <sub>2</sub> O	5,015	L-treonin	0,1
Síran hořečnatý heptahydrát	0,5	L- tryptofan	0,025
Chlorid sodný	30,0	L- tyrosin	0,1
L- arginin hydrochlorid	1,21	L- valin	0,1
L- asparagin monohydrát	0,27	Biotin	0,001
L- cystin	0,25	Cyanocobalamin	0,000025
L- glutamin	1,5	Cholin chlorid	0,015
Glutathion	0,005	I- inositol	0,175
Glycin	0,05	Kyselina listová	0,005
L- histidin HCl H <sub>2</sub> O	0,102	Kyselina p - aminobenzová	0,005
L- hydroxyprolin	0,1	Nikotinamid	0,005
L- isoleucin	0,25	D- Ca- Pantothenát	0,00125
Kyselina L- asparagová	0,1	Pyridoxin hydrochlorid	0,005
Kyselina L- glutamová	0,1	Riboflavin	0,001
L- leucin	0,25	Thiamid hydrochlorid	0,005
L-lysin hydrochlorid	0,2	Glukóza	10,0
L- methionin	0,075	Fenolčerveň	0,05
L- phenylalanin	0,075		

### **Sabouraudův agar:**

Složení:	Pepton	10g/l
	Dextróza	40g/l
	Agar	15g/l

Navážka je 65.0g přípravku na 1000ml destil. vody – sterilizace probíhá v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

### **6.4 Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub:**

*Candida albicans* **CA** ATCC 44859

*Candida tropicalis* **CT** 156

*Candida krusei* **CK** E28

*Candida glabrata* **CG** 20/l

*Trichosporon beigelii* **TB** 1188

*Aspergillus fumigatus* **AF** 231

*Absidia corymbifera* **AC** 272

*Trichophyton mentagrophytes* **TM** 445

Před vlastním pokusem byly připravovány čerstvé kultury těchto kvasinek a vláknitých hub na Sabouraudově agaru. Inkubace probíhala 24h při 35°C u kvasinek resp. 2-4 dny při 26°C u plísní.

Suspenze hub byly připraveny ve sterilní vodě v den pokusu. Pro lepší dispergaci spór vláknitých hub bylo do sterilní vody přidáno malé množství Tweenu 80. Hustota inokula vhodná k testování byla nastavena pomocí Búrkerovy komůrky na  $1,0 - 2,5 \times 10^5$  cfu/ml.

### **6.5 Metodika:**

#### **Příprava růstového média:**

1. Ke 4 dílům MOPS s 1% glukózy byl přidán 1 díl RPMI 1640 (např. 80ml MOPS + 20ml RPMI – celkový objem záleží na spotřebě, resp. na počtu testovaných kmenů).
2. pH bylo upraveno přidávkem několika kapek NaOH do rozmezí 6,5-7,9 (původně žlutý roztok změnil barvu na oranžovo-červenou).

### **Příprava suspenzí testovacích kmenů hub:**

1. Do 8 sterilních zkumavek bylo napipetováno 3 ml sterilní vody. Z kultury kvasinek narostlých na Sabouraudově agaru byla odebrána malá část kolonie a resuspendována se do sterilní vody ve zkumavce.
2. Za použití Bürkerovy komůrky byla nastavena hustota inokula na  $1,0 - 2,5 \times 10^5$  cfu/ml.
3. Takto připravená inokula lze použít k testování 14 dnů.

### **Příprava ředící řady testované látky:**

1. Navážka látky byla rozpuštěna v příslušném objemu DMSO tak, aby první testovaná koncentrace byla  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1%.
2. V případě, že se látka nerozpustila ani po přidání dalšího 2. příp. 3. ekvivalentu rozpouštědla, v dalších krocích se již nepoužívala.
3. Do sterilní zkumavky bylo napipetováno růstové médium RPMI a přidána rozpuštěná testovaná látka. Pokud se látka v RPMI vysrážela, přidal se další 2. příp. 3. ekvivalent růstového média. Tím se posunula první testovaná koncentrace vždy o jedno ředění dozadu. Použila se nejvyšší dosažená koncentrace, při které se látka nevysrážela.
4. Takto získaný pracovní roztok první testované koncentrace byl sterilně přemístěn do první jamky 12ti jamkového rezervoáru.
5. Ve sterilních zkumavkách byly připraveny dvojkovou ředící řadou testované látky v DMSO.
6. Naředěné testované látky byly přemístěny do 12ti jamkového rezervoáru, kde v každé jamce již bylo napipetováno růstové médium. Do poslední 12. jamky, která sloužila jako kontrola při odečtu výsledků, bylo napipetováno pouze DMSO.

### **Pipetování do mikrotitrační destičky:**

1. Pomocí 12ti kanálové pipety byl napipetován příslušný zásobní roztok do sedmi řádků první mikrotitrační destičky a do tolika řádků druhé destičky (extra destička pro *T. mentagrophytes*), kolik bylo testovaných látek.
2. Postupně byly do jednotlivých řádků první destičky napipetovány připravené suspenze CA, CT, CK, CG, TB, AF a AC.
3. Do každé jamky druhé destičky byly napipetovány připravené suspenze TM.
4. Destičky byly přiklopeny víčkem a inkubovány v termostatu při 35°C: první destičku 48 hodin (odečet výsledků za 24hod a 48hod) druhou destičku s dermatofytem 120 hodin (odečet za 72hod a 120hod).

### **Vyhodnocení (MIC):**

Po uplynutí inkubační doby byl vyhodnocen nárůst kolonií v jamkách s nárůstem v kontrole. Koncentrace látky inhibující růst houby odpovídala v našem případě jamce, ve které došlo k 80% potlačení růstu kvasinky resp. plísně (IC<sub>80</sub>=MIC). To znamená, že jako účinná byla ještě považována jamka s 20% nárůstem houby oproti kontrole.

### **Výpočet objemu DMSO, ve kterém se jednotlivé látky rozpouštějí:**

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

m...navážka (g)

c...první testovaná koncentrace = 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$

M...molární hmotnost

## **6.6 Testované látky:**

Testovali jsme v koncentracích: (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488)  $\mu\text{mol.l}^{-1}$

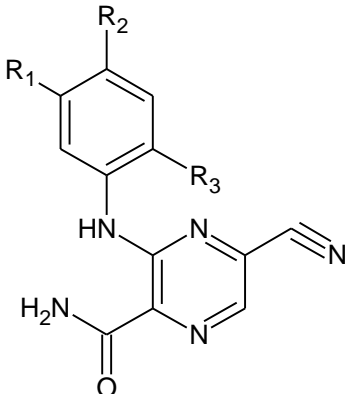
K pokusům byly použity sloučeniny syntetizované na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (Doc. Doležal, Ing. Skála, Mgr. Doležel) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.



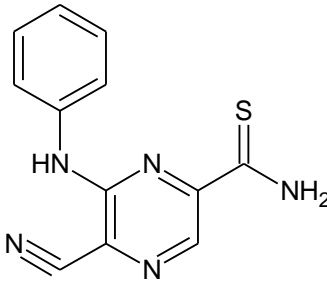
Tab. 2 Přehled skupin testovaných látek

Deriváty pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu
Deriváty pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu
Deriváty pyrazinu - anilidy
Deriváty pyrazin-2-aminu
Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-dikarbonitrilu
Deriváty pyrazol-1-karboxylátu
Deriváty hydrazinkarboxylátu
Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu
Deriváty cyklohexanonu
Deriváty benzamidu (anilidy) a benzenkarbothioamidu
Deriváty thiazolidin-4-onu

Tab. 3 Deriváty pyrazinkarboxamidu

Deriváty pyrazinkarboxamidu				
				
Kód	R1	R2	R3	M.h.
DK 16-1	-Br	-F	-CH <sub>3</sub>	350,15
MD 446/II	-Br	-I	-CH <sub>3</sub>	458,06

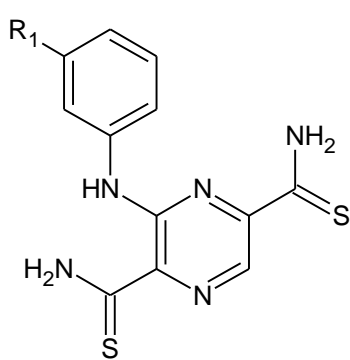
Tab. 4 Deriváty pyrazinkarbothioamidu

Derivát pyrazinkarbothioamidu	
	
Kód	M.h.
DK 12	255,30

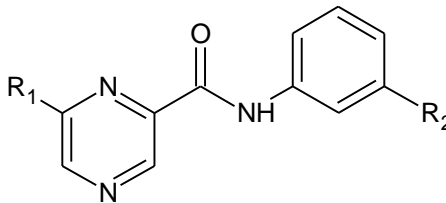
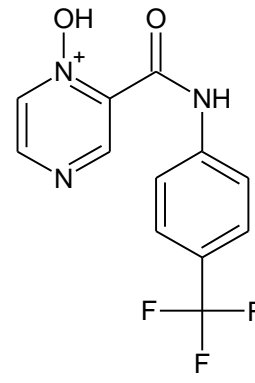
Tab. 5 Deriváty pyrazindikarboxamidu

Deriváty pyrazindikarboxamidu					
Kód	R1	R2	R3	R4	M.h.
MD 483/II			-CF <sub>3</sub>		235,25
MD 484/II			-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>		299,34
MD 485/II		-C <sub>2</sub> H			281,28
MD 486/II		-CN			282,26
MD 488/II	-O-CH <sub>3</sub>		-O-CH <sub>3</sub>		317,31
MD 490/II	-Cl			-CH <sub>3</sub>	305,73
MD 491/II	-Cl		-CF <sub>3</sub>		359,70
MD 492/II	-O-CF <sub>3</sub>		-Br		420,15
MD 493/II	-Br		-O-CF <sub>3</sub>		401,15

Tab. 6 Deriváty pyrazindikarbothioamidu

Deriváty pyrazindikarbothioamidu		
		
Kód	R1	M.h.
MD 456/II	-CS-NH <sub>2</sub>	348,47
MD 460/II	-C <sub>2</sub> H	313,41

Tab. 7 Deriváty pyrazinu-anilidy

Deriváty pyrazinu-anilidy			
			
Kód	R1	R2	M.h.
MD 473/II	-Cl	-CN	258,67
MD 474/II	-Cl	-C <sub>2</sub> H	257,68
MD 480/II		-C <sub>2</sub> H	223,24
MD 481/II		-CN	224,22
			
Kód		M.h.	
MD 508/II		285,23	

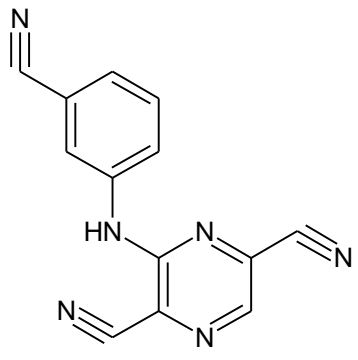
Tab. 8 Deriváty pyrazin-2-aminu

Deriváty pyrazin-2-aminu				
Kód	R1	R2	R3	M.h.
MD 498/II			-Br	294,15
MD 521/II		-CH <sub>3</sub>	-I	355,18
MD 523/II	-CH <sub>3</sub>	-F	-Br	326,17

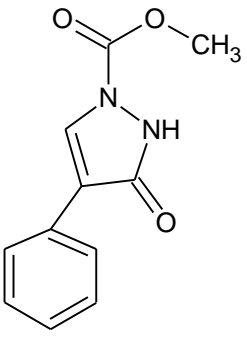
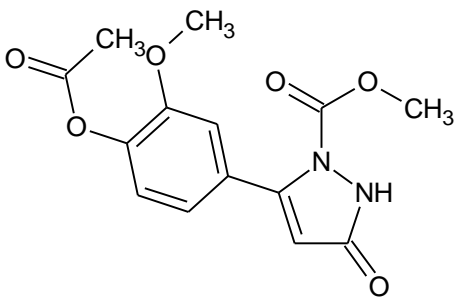
Tab.9 Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu

Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu			
Kód	R1	R2	M.h.
MD 536/II	-Cl		248,67
MD 538/II		-Cl	248,67

Tab. 10 Deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

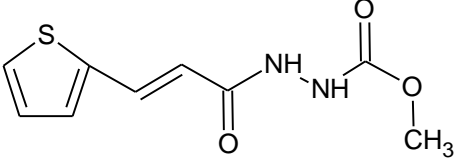
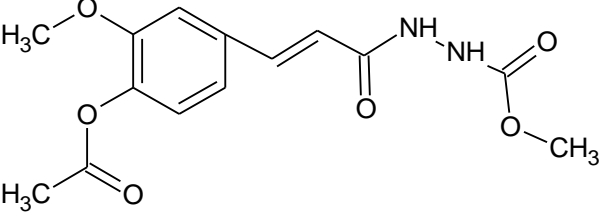
Deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu	
 <chem>N#CC=C1N=C(NC2=CC=C(C=C2)C#N)N=C1C#N</chem>	
Kód	M.h.
MD 455/II	246,23

Tab. 11 Deriváty pyrazol-1-karboxylátu

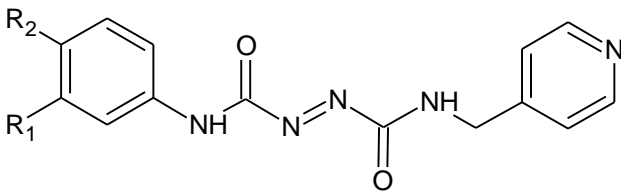
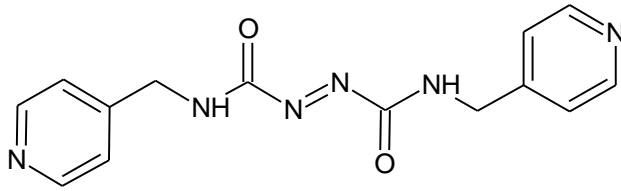
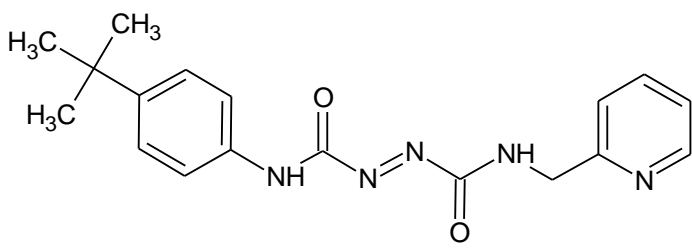
Deriváty pyrazol-1-karboxylátu	
	
<b>Kód</b>	<b>M.h.</b>
<b>BB-275-P</b>	218,07
	
<b>Kód</b>	<b>M.h.</b>
<b>BB-258</b>	306,09



Tab. 12 Deriváty hydrazinkarboxylátu

Deriváty hydrazinkarboxylátu	
	
<b>Kód</b>	<b>M.h.</b>
<b>BB-265</b>	226,04
	
<b>Kód</b>	<b>M.h.</b>
<b>BB-240</b>	308,10

Tab. 13 Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu

Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu			
			
Kód	R1	R2	M.h.
VM-16			283,11
VM-19	-Cl		317,07
VM-22		-F	301,10
			
Kód		M.h.	
VM-26		298,12	
			
Kód		M.h.	
VM-47		339,17	

Tab. 14 Deriváty cyklohexanonu

Deriváty cyklohexanonu	
Kód	M.h.
RL-B-12	252,11

Tab. 15 Deriváty benzamidu (anilidy)

Deriváty benzamidu					
Kód	R1	R2	R3	R4	M.h.
RAM 328	-CH <sub>3</sub>	-OH		-OH	243,26
RAM 332	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-OH		-OH	271,32
RAM 339		-OH		-OH	229,24
RAM 341	-OCH <sub>3</sub>	-OH		-OH	259,26
RAM 342	-OCH <sub>3</sub>		-OH	-OH	256,26

Tab. 16 Deriváty benzenkarbothioamidu

Deriváty benzenkarbothioamidu						
Kód	R1	R2	R3	R4	R5	M.h.
RAM 326	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-OH			-OH	301,41
RAM 327	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		-OH		-OH	273,36
RAM 333	-CH <sub>3</sub>			-OH	-OH	259,33
RAM 334	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>			-OH	-OH	287,38
RAM 336	-OCH <sub>3</sub>	-OH			-OH	259,26
RAM 350	-OCH <sub>3</sub>		-OH		-OH	259,26

Tab. 17 Deriváty thiazolidin-4-onu

Deriváty thiazolidin-4-onu						
Kód	R1	R2	R3	R4	R5	M.h.
ED 3	-CH <sub>2</sub> COOH	N			N	280,32
ED 4	-CH <sub>2</sub> COOH		N			280,32
ED 5	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	N				266,34
ED 6	-CH <sub>2</sub> COOH			N		280,32
ED 7	-CH <sub>2</sub> COOH					279,33

## 7. Výsledky

### 7.1 Deriváty pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu

V této skupině jsme testovali 3 látky. Látka MD 446/II se vysrážela v RPMI 1640, proto jsme ji pro další testování již nepoužívali. Látka DK 16-1 jevila slabý antimykotický účinek po 24h na *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *A. fumigatus*. Středně silný antimykotický účinek vykazovala látka DK 16-1 na *T. mentagrophytes*. Vzorek DK-12 se v koncentraci 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  vysrážel v RPMI 1640, proto jsme použili jako výchozí koncentraci 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Tab. 17).

### 7.2 Deriváty pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu

Skupina zahrnující 11 testovaných látek neprojevila v testovaném rozmezí koncentrací žádnou antimykotickou účinnost proti všem kmenům. Látky MD 483/II, MD 484/II, MD 485/II, MD 486/II a MD 488/II se v tkáňovém médiu vysrážely, proto byla použita jako počáteční testovaná koncentrace 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Pouze malá citlivost byla zjištěna u kmene *T. mentagrophytes* na látky MD 490/II, MD 491/II a MD 493/II po 72h (Tab. 18).

### 7.3 Deriváty pyrazinu-anilidy

Těchto 5 látek se jevilo jako látky neúčinné. Jen u kmene *C. krusei* (v obou časech) a *C. albicans* (po 24h) vykazovala látka MD 473/II středně silný antimykotický účinek (Tab. 19).

### 7.4 Deriváty pyrazin-2-aminu

Derivát MD 521/II působil na *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. glabrata* (MIC=125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) po odečtu výsledků po 24h i 48h. Slabou antimycetární účinnost měla látka 523/II na kmen *C. albicans* a *T. mentagrophytes* (Tab. 20). U sloučenin MD 498/II a MD 521/II jsme za počáteční koncentraci zvolili 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , protože látky byly neúplně rozpustné v DMSO.

## **7.5 Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-dikarbonitrilu**

Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu (látky MD 536/II a 538/II) lze považovat za skupinu dobře účinnou proti všem testovaným kmenům. Nejcitlivější na obě látky byly kmeny *C. albicans*, *C. krusei*, *T. mentagrophytes*. Na látku MD 538/II byly dále hodně citlivé kmeny *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *T. beigelii* (Tab. 21).

Derivát pyrazin-2,5-dikarbonitrilu prokázal slabý účinek proti kmenům *C. tropicalis* a *C. glabrata* (MIC 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) po 24h.

## **7.6 Deriváty pyrazol-1-karboxylátu**

Tato skupina dvou látek se jevila jako neúčinná (Tab. 22).

## **7.7 Deriváty hydrazinkarboxylátu**

Obě látky neprokázaly také žádnou antimykotickou účinnost (Tab. 23).

## **7.8 Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu**

Všech 5 testovaných sloučenin bylo neaktivních (Tab. 24).

## **7.9 Deriváty cyklohexanonu**

Jediný zástupce této skupiny neprokázal žádný účinek (Tab. 25).

## **7.10 Deriváty benzamidu a benzenkarbothioamidu**

Těchto 11 látek prokazovalo, kromě jedné sloučeniny, dobrou antimykotickou účinnost proti všem testovaným kmenům.

Nejcitlivější byly kmeny *C. albicans*, *T. beigelii* a *T. mentagrophytes*. Relativně silný účinek jevíly látky RAM 342 a RAM 326 proti všem kmenům a RAM 327 proti *A. corymbifera* a *T. metagrophytes*. Sloučeniny RAM 328, RAM 332 a RAM 336 projevily slabou až středně silnou účinnost vůči všem kmenům. Látka RAM 350 byla jako jediná neúčinná. Byla také nestabilní v RPMI 1640, proto testované rozmezí koncentrací začíná na 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Tab. 26).

### **7.11 Deriváty thiazolidin-4-onu**

Tuto skupinu látek zastupuje 5 derivátů. Látky ED 5, ED 6 a ED 7 byly neúčinné. Ovšem silný antimykotický účinek prokazovala látka ED 3 na kmeny *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* a *T. beigeli* (MIC=1,95). Látka ED 4 slabě inhibovala růst kmene *C. glabrata* (Tab 27).

### **7.12 Tabulkový přehled výsledků**

Tučně jsou znázorněny hodnoty MIC=IC<sub>80</sub> v rámci testovaného rozmezí.



Tab. 18 Stanovení MIC derivátů pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC80 ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		
		DK 16-1	MD 446/II	DK 12
CA	24h	250	NT *	<b>250</b>
	48h	<b>500</b>	NT	>250
CT	24h	<b>500</b>	NT	125
	48h	>500	NT	>250
CK	24h	>500	NT	125
	48h	>500	NT	>250
CG	24h	<b>500</b>	NT	125
	48h	>500	NT	>250
TB	24h	>500	NT	125
	48h	>500	NT	>250
AF	24h	<b>500</b>	NT	>250
	48h	>500	NT	>250
AC	24h	>500	NT	>250
	48h	>500	NT	>250
TM	72h	<b>62,5</b>	NT	>250
	120h	<b>250</b>	NT	>250

\*netestováno z důvodu vysrážení v RPMI

Tab. 19 Stanovení MIC derivátů pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )										
		MD 483/II	MD 484/II	MD 485/II	MD 486/II	MD 488/II	MD 490/II	MD 491/II	MD 492/II	MD 493/II	MD 456/II	MD 460/II
CA	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TB	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>125	>125	>125	>125	>125	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	<b>500</b>	>500	>500
	120h	>125	>125	>125	>125	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tab. 20 Stanovení MIC derivátů pyrazinu-anilidy

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
Kód		MD473/II	MD474/II	MD480/II	MD481/II	MD 508/II
CA	24h	<b>62,5</b>	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
CK	24h	<b>62,5</b>	>500	>500	>500	>500
	48h	<b>125</b>	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
TB	24h	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>125	>500	>500	>500	>500
	48h	>125	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>125	>500	>500	>500	>500
	120h	>125	>500	>500	>500	>500

Tab. 21 Stanovení MIC derivátů pyrazin-2-aminu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )		
		MD 498/II	MD 521/II	MD 523/II
Kód				
CA	24h	>125	>125	<b>250</b>
	48h	>125	>125	<b>500</b>
CT	24h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>500</b>
	48h	>125	<b>125</b>	>500
CK	24h	>125	<b>125</b>	<b>250</b>
	48h	>125	<b>125</b>	>500
CG	24h	>125	<b>125</b>	<b>250</b>
	48h	>125	<b>125</b>	>500
TB	24h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>250</b>
	48h	>125	>125	>500
AF	24h	>125	<b>125</b>	>500
	48h	>125	>125	>500
AC	24h	>125	>125	>500
	48h	>125	>125	>500
TM	72h	>125	<b>125</b>	<b>500</b>
	120h	>125	>125	<b>500</b>

Tab. 22 Stanovení MIC derivátů pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )		
		MD 536/II	MD 538/II	MD 455/II
CA	24h	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	>250
	48h	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	>250
CT	24h	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>250</b>
	48h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	>250
CK	24h	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	>250
	48h	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	>250
CG	24h	<b>250</b>	<b>15,62</b>	<b>250</b>
	48h	<b>250</b>	<b>62,5</b>	>250
TB	24h	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>250
	48h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	>250
AF	24h	<b>250</b>	<b>500</b>	>250
	48h	>500	>500	>250
AC	24h	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>250
	48h	<b>62,5</b>	<b>250</b>	>250
TM	24h	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	>250
	48h	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	>250

Tab. 23 Stanovení MIC derivátů pyrazol-1-karboxylátu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	
		BB-275-P	BB-258
CA	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
CT	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
CK	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
CG	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
TB	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
AF	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
AC	24h	>250	>500
	48h	>250	>500
TM	72h	>250	>500
	120h	>250	>500

Tab. 24 Stanovení MIC derivátů hydrazinkarboxylátu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	
		BB-265	BB-240
CA	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CT	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CK	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CG	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
TB	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
AF	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
AC	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
TM	72h	>500	>500
	120h	>500	>500

Tab. 25 Stanovení MIC derivátů diazen-1,2-dikarboxamidu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
Kód		VM-16	VM-19	VM-22	VM-26	VM-47
CA	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
CT	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
CK	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
CG	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
TB	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
AF	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
AC	24h	>500	>250	>250	>500	>250
	48h	>500	>250	>250	>500	>250
TM	72h	>500	>250	>250	>500	>250
	120h	>500	>250	>250	>500	>250



Tab. 26 Stanovení MIC derivátu cyklohexanonu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )
Kód		RL-B-12
CA	24h	>250
	48h	>250
CT	24h	>250
	48h	>250
CK	24h	>250
	48h	>250
CG	24h	>250
	48h	>250
TB	24h	>250
	48h	>250
AF	24h	>250
	48h	>250
AC	24h	>250
	48h	>250
TM	72h	>250
	120h	>250

Tab. 27 Stanovení MIC derivátů benzamidů a benzenkarbothioamidů

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )										
		RAM 328	RAM 332	RAM 339	RAM 341	RAM 342	RAM 326	RAM 327	RAM 333	RAM 334	RAM 336	RAM 350
CA	24h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>125
	48h	<b>500</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	>125
CT	24h	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	>500	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	>125
	48h	>500	<b>250</b>	>500	>500	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>500</b>	>125
CK	24h	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	>500	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>125</b>	>125
	48h	>500	<b>250</b>	>500	>500	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	>500	>125	<b>250</b>	>125
CG	24h	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	<b>500</b>	<b>7,81</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>250</b>	>125
	48h	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	>500	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>250</b>	>125
TB	24h	<b>500</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>500</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	>125	<b>125</b>	>125
	48h	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>500</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>250</b>	>125
AF	24h	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>125	<b>125</b>	>125
	48h	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	>125	<b>250</b>	>125
AC	24h	<b>500</b>	<b>125</b>	>500	>500	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>125
	48h	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	>500	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>125
TM	72h	<b>500</b>	<b>125</b>	<b>500</b>	>500	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	>125
	120h	<b>500</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	>125

Tab. 28 Stanovení MIC derivátů thiazolidin-4-onu

Kmen		Testovaná látka (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
Kód		ED 3	ED 4	ED 5	ED 6	ED 7
CA	24h	<b>500</b>	>500	>250	>500	>500
	48h	<b>500</b>	>500	>250	>500	>500
CT	24h	<b>0,98</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500
	48h	<b>1,95</b>	>500	>250	>500	>500
CK	24h	<b>1,95</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500
	48h	<b>1,95</b>	>500	>250	>500	>500
CG	24h	<b>0,98</b>	<b>250</b>	>250	>500	>500
	48h	<b>1,95</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500
TB	24h	<b>1,95</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500
	48h	<b>1,95</b>	>500	>250	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>250	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>250	>500	>500
	48h	>500	>500	>250	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>250	>500	>500
	120h	>500	>500	>250	>500	>500

## 8. Diskuze

V současné době neustále narůstá počet případů mykotických infekcí současně s rostoucím počtem vnímavých jedinců v populaci. Stále častěji se také setkáváme se vzácnými mykotickými patogeny, často obtížně diagnostikovatelnými a rezistentními na dostupná antimykotika (Ráčil, 2005). Cílem vývoje nových antifungálních látek je nalézt účinnější a méně toxická antimykotika.

Většina dosud známých antifungálních látek používaných v terapii mykotických onemocnění je lipofilní povahy, i naše testované látky měly lipofilní charakter.

Testování antifungální aktivity *in vitro* může být ovlivněno několika faktory. Jsou to metodologické faktory, faktory podmíněné testovacím systémem, faktory podmíněné testovanou látkou a faktory podmíněné vlastnostmi testované houby.

Metodologické faktory jsou dány technickou náročností metody. Důležitý je také výběr parametru hodnotícího antifungální aktivitu. Často je problém stanovit hodnoty MIC. Mezi hraničními hodnotami jsou přechodná stadia s částečně potlačeným růstem. Proto se volí relativní parametr IC<sub>80</sub>. Získané výsledky jsou subjektivní a odečet výsledků provádí jedna osoba.

Faktory podmíněné testovacím systémem: Získané výsledky jsou závislé na složení a pH použitého kultivačního média i na typu použitého pufru, na délce a teplotě inkubace.

Hlavním limitujícím faktorem podmíněným testovanou látkou je rozpustnost testovaného antimykotika, jeho stabilita a lipofilita. V naší práci se vyskytly zejména problémy s rozpustností některých látek.

Mezi faktory podmíněné vlastnostmi testované houby patří zejména velikost inokula, dále také v jaké růstové fázi se organismus nachází a morfologická forma houby (houba vláknitá, kvasinková forma) (Toužimská, 2000).

S rozšiřující se paletou antifungálních léčiv nabývá na významu stanovení citlivosti hub *in vitro*. Byly vypracovány standardizované postupy a stanovena interpretační kritéria pro jednotlivá antimykotika.

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

Standard CLSI pro kvasinky (Dokument CLSI M27-A2) určuje postup při testování citlivosti kvasinek *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*. Jedná se o metodu mikrodiluční s použitím media RPMI –1640 s glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené 0,2 % glukózy, hustota inokula  $0.5 \times 10^5$  až  $2.5 \times 10^5$  CFU/ml, inkubace při 35°C 24 hodin pro *Candida* spp. a 48-72 hodin pro *Cryptococcus neoformans*. Hodnotí se stupeň zákalu dle daných kritérií.

Standard CLSI pro vláknité mikromycety (Dokument CLSI M38-A) popisuje metodiku pro stanovení citlivosti vláknitých mikromycet včetně *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pseudoallescheria (Scedosporium)* spp., i zygomycet. Je použito obdobné medium jako pro testování kvasinek, avšak je kladen důraz na přípravu inokula s kontrolou density pomocí spektrofotometru rozdílně pro jednotlivé druhy. I doba inkubace se liší v závislosti na druhu (např. *Rhizopus* 24 hodin, *Aspergillus* a *Fusarium* 48 hodin) (Mallátová, 2007).

Testování jsme prováděli na pěti kmenech kvasinek a třech kmenech vláknitých hub, které jsou v našich podmínkách nejčastějšími původci mykóz: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Trichosporon beigellii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Naše metoda se od používaného standardu lišila v hustotě testovaného inokula:  $1,0$  až  $2,5 \times 10^5$  CFU/ml x  $0,5$  až  $2,5 \times 10^5$  CFU/ml.

Námi testovaná skupina derivátů pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu nejeví zavedením halogenů (bromu do polohy 5 fenylu a fluoru do polohy 4 fenylu) do své struktury žádné výrazné antimykotické působení. Látka MD 446/II, která má ve své struktuře v poloze 4 fenylu jód a 5 fenylu brom se vysrážela v médiu RPMI 1640. Záměna funkční skupiny karboxamidu za karbothioamid nezpůsobí změnu v účinnosti proti houbám.

Na základní strukturu derivátů pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu je v poloze 6 navázán přes amino skupinu fenyl, na kterém jsou navěšeny různé zbytky. Látky neprokázali antifungální účinek. Pouze zavedení halogenu, chloru u látky MD 490/II a MD 491/II a bromu u MD 493/II vedlo k tomu, že látky projevily nízký antimykotický účinek po odečtu výsledků po 72h u *T. mentagrophytes*. Avšak po 120h houba již účinek prokázán nebyl. To svědčí o slabém fungistatickém účinku látky. Záměna dikarboxamidu za dikarbothioamid ani zavěšení karbamothioyl a ethynyl zbytku na fenyl se neukázalo jako efektivní.

Pět testovaných sloučenin ze skupiny derivátů pyrazinu-anilidů neinhibovalo růst kmenů hub. Na základní strukturu pyrazinanilidu se navěsil chlor, ethynyl nebo kyano skupina. Pouze zavedení chloru do polohy 6 pyrazinu a kyano skupiny do polohy 3 fenylu u látky MD 473/II vedlo k mírnému antimykotickému účinku u kmene *C. krusei*. Hodnota MIC se dvojnásobně snížila v čase 48h, což ukazuje na slabý fungistatický účinek látky. Zavedení trifluormethyl skupiny do polohy 4 fenylu nevedlo k lepšímu výsledku.

Na základní strukturu derivátů pyrazin-2-aminu je zavěšen fenyl halogenovaný bromem, jódem nebo fluórem. Zavedení bromu do polohy 3 a methylu do polohy 4 fenylu se projevilo jako výhodné vzhledem k střednímu antimykotickému účinku na kmeny *C. tropicalis*, *C. krusei* a *C. glabrata*. U látky MD 523/II byl přidán ještě fluor, což posílilo antifungální účinek proti *C. albicans*, ale oslabilo účinek u zmíněných kmenů. Látky MD 498/II a MD 521/II byly neúplně rozpustné v DMSO, což se projevilo tak, že počáteční koncentrace testovaných látek je 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Deriváty pyrazin-2-karbohydrazidu lze považovat za účinnou skupinu. Na pyrazin-2-karbohydrazidu je zavěšen fenyl substituovaný v poloze 2 nebo 4 chlorem. Obě sloučeniny vykazují dobrý antimykotický účinek na všechny

testované kmeny. Zavedení chloru do polohy 2 vedlo k větší inhibici růstu kmene *C. krusei* a *A. corymbifera*. Naopak substituce v poloze 4 inhibovala více růst kmene *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *T. beigellii* a *T. mentagrophytes* a jeví se tak jako prospěšnější. Otestovaný derivát pyrazin-2,5-dikarbonitrilu neprokázal účinnost.

Zavedení 4-acetoxy-3-methoxyfenylu a fenylu na pyrazol-1-karboxylát nevedlo k žádnému efektu.

Otestované deriváty hydrazinkarboxylátu se neprojeví jako účinné.

Zavedení pyridinu, fenylu substituovaného halogeny ani *terc*-butylfenylu na diazen-1,2-dikarboxamid neinhibovalo růst žádného z kmenů.

Taktéž nevedlo k žádnému antimykotickému účinku zavedení (difluoruboryloxy)(fenyl)methylu na cyklohexanon.

Deriváty benzamidu a benzenkarbothioamidu jsou skupiny antifungálně účinných látek. Ze struktur látek vychází poznatky, že zavedení hydroxy skupin se projevilo na účinku pozitivně. Záleží také na postavení hydroxy skupin. U látek RAM 341 a RAM 342, které mají stejné složení, ale liší se v postavení právě –OH skupin, se jeví jednoznačně účinnější látka RAM 342, která má –OH skupiny v poloze 2,3 fenylu (oproti polohám 2,4 u RAM 341). U látky RAM 336, která má –OH v poloze 2,6 fenylu, se prokázal vyšší účinek, než u látky RAM 350 s –OH v polohách 2,5 fenylu.

Odstraněním methoxy skupiny z látky RAM 341 vznikla sloučenina RAM 339 a zvýšil se tak antimykotický účinek na kmeny *C. albicans*, *T. beigellii* a projevil se nízký, ale dříve neexistující účinek na *T. mentagrophytes*.

Látky RAM 328 a RAM 332 se liší pouze v délce alkyly v poloze 4 benzenového jádra. S délkou řetězce se citlivost kmenů na antifungální látku zvyšuje. Totéž platí pro RAM 333 a RAM 334. Se zvyšující se délkou řetězce se však u těchto látek projevil problém s vysrážením látek v RPMI a zároveň se ztratil účinek na *C. krusei*, *C. glabrata*, *T. beigellii* a *A. corymbifera*.

Vyšší inhibici růstu prokázalo zavedení alkylového řetězce do struktury než methoxy skupiny (viz látky RAM 326/RAM 336 a RAM 327/RAM 350) a opět platí, že s délkou alkylového řetězce se účinek zvyšuje.

Dvě látky z derivátů thiazolidin-4-onu projeví antimykotickou účinnost. Základ tvoří 5-benziliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on-3-octová kyselina. Záměnou benzilidenu za (pyrid-2-yl)methyliden se projeví silný inhibiční účinek

na růst kmene *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* a *T. beigeli*. Záměna benzilidenu za (pyrid-3-yl)methyliden již nemá takový efekt. Projeví se jen slabý antifungální účinek na kmen *C. glabrata*.



## 9. Závěr

1. Na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub jsme otestovali mikrodiluční bujónovou metodou 51 potencionálně antifungálních látek rozdělených do 11 skupin.
2. Nejvyšší antimykotickou aktivitu jsme zaznamenali u derivátů pyrazin-2-karbohydrazidu a derivátů benzamidu a benzenkarbothioamidu.
3. Nejméně účinné byly naopak deriváty pyrazindikarboxamidu a pyrazindikarbothioamidu, pyrazinu-anilidy, pyrazol-1-karboxylátu, hydrazinkarboxylátu a diazen-1,2-dikarboxamidu.
4. Nejcitlivější byly kmeny *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans*. Nejméně citlivý byl kmen *Absidia corymbifera*.
5. U derivátů benzamidu a benzenkarbothioamidu se projevilo, že s délkou alkylového řetězce se inhibice růstu kvasinek a vláknitých hub zvyšuje.
6. Abychom mohli vyvodit nějaké závěry z výsledků u sloučenin, kteréjevily antimykotickou aktivitu, bylo by třeba provést rozsáhlejší testování.

## 10. Seznam literatury:

1. Buchta V. a kol., Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty 1998.
2. Davey K G et al. Evaluation of the AUXACOLOR system, a new method of clinical yeast identification. *J Clin Pathol.* 1995; 48(9): 807–809.
3. Fagner P. Malá lékařská mykologie, Avicenum, Praha 1984, str. 61.
4. Fricker-Hidalgo H. et al. Comparison of the New API Candida System to the ID 32C System for Identification of Clinically Important Yeast Species. *J Clin Microbiol* 1996; 7(34): 1846–1848.
5. Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF et al. Lékařská mikrobiologie, Grada Publishing 1999, str. 566-582.
6. Haber J. Nová antimykotika - jaká jsou a co přinášejí. *Remedia* 2005; 3: 247-258.
7. Haber J. et al. Systémové mykózy a jejich léčba, Galén 1995, str. 82-94.
8. Haber J., Suchopár J., Remedia compendium, třetí vydání, Panax Co, spol. s.r.o., 1999.
9. Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P. Farmaceutická chemie IV., Karolinum 2006, str. 46.
10. Katzung BG, Základní a klinická farmakologie, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division 2001, Nakladatelství H&H Vyšehradská, s.r.o. 2006.
11. Korting H. CH. et al. Results of German Multicenter Study of Antimicrobial Susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* Strains Causing Tinea Unguium. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1995; 5(39): 1206–1208.
12. Lincová D., Farghali H et al. Základní a aplikovaná farmakologie, Druhé doplněné a přepracované vydání, Galén 2007.
13. Mallátová N. Stanovení citlivosti mikromycet k antimykotikům a interpretace výsledků. *Klin mikrobiol Inf Léč* 2007;13(4):151-155.
14. Muir DB. et al. Use of the BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *J Clin Microbiol* 1997; 12(35): 3240-3243.

15. Ostrý V. Mykotoxiny a mykotoxikózy, CHPŘ Brno, SZÚ Praha. *Zprávy centra* 1997; 6(3), str. 15-18.
16. Otčenášek M. et al. Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních, Avicenum, Praha 1990, str. 113-121.
17. Pfaller M. A., Diekema D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-163.
18. Pohanka M. Aflatoxiny, *Toxicology – Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc* 2008  
dostupné z [www.toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177%20-%2031k](http://www.toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177%20-%2031k)
19. Ráčil Z. et al. Léčba invazivních mykotických infekcí u onkologických nemocných. *Farmakoterapie* 2005, 9.  
dostupné z [www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/878](http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/878)
20. Rozsypal H. Systémová antimykotika. *Klin Farmakol Farm* 2008; 22(1): 40–44.
21. Toužimská K., Standardizace metodiky stanovení antifungální aktivity *in vitro* pro mikrodiluční bujónovou a agarovou difúzní metodu, diplomová práce, Hradec Králové 2000.
22. Votava M., Lékařská mikrobiologie obecná, 2.přepracované vydání, Neptun 2005.
23. Vyštejnová S., Hodnocení látek s potencionální antifungální aktivitou *in vitro* V., diplomová práce, Hradec Králové 1999.
24. [www.bd.com/ds/productCenter/254093.asp](http://www.bd.com/ds/productCenter/254093.asp)
25. [www.biomikro.vscht.cz/documents/hygklinmik/klinika7.pdf](http://www.biomikro.vscht.cz/documents/hygklinmik/klinika7.pdf)
26. [www.blackwellpublishing.com/eccmid15/abstract.asp?id=38008](http://www.blackwellpublishing.com/eccmid15/abstract.asp?id=38008)
27. [www.commons.wikimedia.org/wiki/File:070522-aspergillus\\_009.jpg](http://www.commons.wikimedia.org/wiki/File:070522-aspergillus_009.jpg)
28. [www.de.wikipedia.org/wiki/E-Test](http://www.de.wikipedia.org/wiki/E-Test)
29. [www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org)  
[/imageban/ib\\_res2.pl?cur\\_page=1&image\\_counter=11&genus=Trichosporon](http://www.doctorfungus.org/imageban/ib_res2.pl?cur_page=1&image_counter=11&genus=Trichosporon)
30. [www.doctorfungus.org/thedrugs/Ravuconazole.htm](http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Ravuconazole.htm)
31. [www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/878](http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/878) - 58k
32. [www.farmakoterapie.cz/document/pdf/994.pdf](http://www.farmakoterapie.cz/document/pdf/994.pdf)
33. [www.findarticles.com/p/articles/mi\\_qa3874/is\\_200001/ai\\_n8888840](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3874/is_200001/ai_n8888840)
34. [www.lachema.com/prilohy/CANDIDAtest%2021-CZ.pdf](http://www.lachema.com/prilohy/CANDIDAtest%2021-CZ.pdf)

35. [www.metabolickety.py.com/ruzne\\_4.htm](http://www.metabolickety.py.com/ruzne_4.htm)
36. [www.microbes.blogfa.com/post-6.aspx](http://www.microbes.blogfa.com/post-6.aspx)
37. [www.mycolog.com](http://www.mycolog.com)
38. [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au)  
    /[Fungal\\_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/mentagrophytes.html)
39. [www.pmlmicro.com/assets/TDS/2001.pdf](http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/2001.pdf)
40. [www.tolweb.org/Basidiomycota/20520](http://www.tolweb.org/Basidiomycota/20520) - 61k
41. [www.uzs.tul.cz/lekarska\\_mikrobiologie/ucebnicemikrobiologiepdf/antibiotika.pdf](http://www.uzs.tul.cz/lekarska_mikrobiologie/ucebnicemikrobiologiepdf/antibiotika.pdf)

## 11. Seznam obrázků a tabulek:

- Obr. 1 Dozrálé sporangium rodu *Mucor*
- Obr. 2 Plodnice stopkovýtrusných hub
- Obr. 3 Kolonie *Candida albicans* na Sabouraudově agaru
- Obr. 4 Kolonie *Candida tropicalis* na Sabouraudově agaru
- Obr. 5 Kolonie *Candida krusei* na Sabouraudově agaru
- Obr. 6 Kolonie *Candida glabrata* na Sabouraudově agaru
- Obr. 7 Kolonie *Trichosporon beigellii* na Sabouraudově agaru
- Obr. 8 Kolonie *Aspergillus fumigatus* na Sabouraudově agaru
- Obr. 9 Kolonie *Absidia corymbifera* na Sabouraudově agaru
- Obr. 10 Kolonie *Trichophyton mentagrophytes* na Sabouraudově agaru
- Obr. 11 Amfotericin B
- Obr. 12 Nystatin
- Obr. 13 Natamycin
- Obr. 14 Mikonazol
- Obr. 15 Ketokonazol
- Obr. 16 Flukonazol
- Obr. 17 Itrakonazol
- Obr. 18 Vorikonazol
- Obr. 19 Posakonazol
- Obr. 20 Ravukonazol
- Obr. 21 Ekonazol
- Obr. 22 Klotrimazol
- Obr. 23 Fentikonazol
- Obr. 24 Tiokonazol
- Obr. 25 Kaspofungin
- Obr. 26 Naftifin
- Obr. 27 Terbinafin
- Obr. 28 Tolnaftát
- Obr. 29 Tolciklát
- Obr. 30 Liranaftát
- Obr. 31 Flucytosin
- Obr. 32 Amorolfín

Obr. 33 Ciklopirox

Obr. 34 Griseofulvin

Tab. 1 Složení média RPMI 1640

Tab. 2 Přehled skupin testovaných látek

Tab. 3 Deriváty pyrazinkarboxamidu

Tab. 4 Deriváty pyrazinkarbothioamidu

Tab. 5 Deriváty pyrazindikarboxamidu

Tab. 6 Deriváty pyrazindikarbothioamidu

Tab. 7 Deriváty pyrazinu-anilidy

Tab. 8 Deriváty pyrazin-2-aminu

Tab. 9 Deriváty pyrazin-2-karbohadrazidu

Tab. 10 Deriváty pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

Tab. 11 Deriváty pyrazol-1-karboxylátu

Tab. 12 Deriváty hydrazinkarboxylátu

Tab. 13 Deriváty diazen-1,2-dikarboxamidu

Tab. 14 Deriváty cyklohexanonu

Tab. 15 Deriváty benzamidu (anilidy)

Tab. 16 Deriváty benzenkarbothioamidu

Tab. 17 Deriváty thiazolidin-4- onu

Tab. 18 Stanovení MIC derivátů pyrazinkarboxamidu a pyrazinkarbothioamidu

Tab. 19 Stanovení MIC derivátů pyrazindikarboxamidu a  
pyrazindikarbothioamidu

Tab. 20 Stanovení MIC derivátů pyrazinu-anilidy

Tab. 21 Stanovení MIC derivátů pyrazin-2-aminu

Tab. 22 Stanovení MIC derivátů pyrazin-2-karbohydrazidu a pyrazin-2,5-  
dikarbonitrilu

Tab. 23 Stanovení MIC derivátů pyrazol-1-karboxylátu

Tab. 24 Stanovení MIC derivátů hydrazinkarboxylátu

Tab. 25 Stanovení MIC derivátů diazen-1,2-dikarboxamidu

Tab. 26 Stanovení MIC derivátu cyklohexanonu

Tab. 27 Stanovení MIC deriváty benzamidu a benzenkarbothioamidu

Tab. 28 Stanovení MIC derivátů thiazolidin-4- onu

