UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYHODNOCENÍ AKTIVITY POTENCIÁLNĚ ANTIMYKOTICKÝCH LÁTEK POMOCÍ MIKRODILUČNÍ BUJÓNOVÉ METODY IV

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové, 2015 Barbora Pašková

Prohlášení

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

V Hradci Králové 24. 04. 2015 ……..

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Kláře Konečné, Ph.D. za pomoc a cenné připomínky při sepisování práce, paní Idě Dufkové za poradenství při práci v laboratoři a také prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. za odborné zhodnocení nejen chemických struktur, ale i výzkumu syntetizovaných sloučenin.

ABSTRAKT

Barbora Pašková

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykotických látek pomocí mikrodiluční bujónové metody IV

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Farmacie

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo stanovit antimykotickou aktivitu 34 látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

Metody: Všechny látky byly testovány kvantitativní mikrodiluční bujónovou metodou na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub. Podle chemické struktury byly testované látky rozděleny do pěti skupin: benzylamino substituované deriváty pyrazin-2-karboxamidu, alifatické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, cyklické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, alifatické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu a cyklické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu.

Výsledky: Nejvyšší antimykotickou aktivitu projevily látky ze skupiny cyklických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu, a to konkrétně vzorky OJ101 a OJ103, které vykazovaly antimykotickou aktivitu ke všem kmenům kvasinek a vláknitých hub. Naopak látky ze skupiny benzylamino substituovaných derivátů pyrazin-2-karboxamidu neprojevily žádnou aktivitu. Nejcitlivějším kmenem se stal *Trichophyton mentagrophytes*, a naopak nejrezistentnějšími kmeny byly *Candida tropicalis* a *Absidia corymbifera*.

Závěry: Aby mohly být námi testované látky s prokázaným antimykotickým účinkem využity v klinické praxi, bylo by zapotřebí provést ještě řadu dalších testů a klinických studií.

Klíčová slova: kvasinky, vláknité houby, antimykotická léčiva, rezistence, minimální inhibiční koncentrace

ABSTRACT

Barbora Pašková

Evaluation of the activity of potentional antimycotic substances through the use of microdilution broth method IV

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Pharmacy

Background: The aim of this diploma thesis was to evaluate the antimycotic activity of 34 substances prepared at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové of the Charles University in Prague.

Methods: The substances were tested by the microdilution broth method at eight strains of yeasts and filamentous fungi. The tested substances were divided into five groups according to their chemical structure: benzylamino substituted derivates of pyrazine-2-carboxamide, aliphatic aminoderivates of pyrazine-2,3-dicarbonitrile, cyclic aminoderivates of pyrazine-2,3-dicarbonitrile, aliphatic aminoderivates of pyrazine -2-carboxamide, cyclic aminoderivates of pyrazine-2-carboxamide.

Results: The highest antimycotic activity was discovered in group of cyclic aminoderivates of pyrazine-2-carboxamide, especially in tested substances OJ101 and OJ103, which showed antimycotic activity to all of strains of yeast and filamentous fungi. On the other hand, substances of group of benzylamino substituted derivates of pyrazine-2-carboxamide showed no antimycotic activity. The most susceptible strain was *Trichophyton mentagrophytes* and the most resistant were strains *Candida tropicalis* and *Absidia corymbifera*.

Conclusions: To utilize our tested substances in a clinical practise, it is necessary to perform any other tests and studies to prove suficcient antimycotic effect.

Key words: yeast, filamentous fungi, antimycotic drugs, resistance, minimal inhibitory concentration

SEZNAM ZKRATEK

5-FC – 5-fluorocytosin (flucytosin)
ABC – ATP-binding cassette, transmembránový transportní mechanismus využívající ATP
AC – *Absidia corymbifera*
AF – *Aspergillus fumigatus*
AIDS – acquired immune deficiency syndrome, syndrom získaného selhání imunity
ATCC – American testing culture collection, Americká sbírka typových kultur
ATP – adenosine triphosphate, adenosintrifosfát
CA – *Candida albicans*
CDR – *Candida* drug resistence, rezistentní kmen kvasinky rodu *Candida*
cfu – colony forming unit, kolonie tvořící jednotka
CG – *Candida glabrata*
CK – *Candida krusei*
CLSI – Clinical laboratory standards institute, Ústav laboratorních a klinických standardů
CT – *Candida tropicalis*
CYP51 – gen kódující enzym z rodiny cytochromu P-450
DMSO – dimethylsulfoxid
DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
ECDC – The European centre for disease prevention and control, Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
ERG3 / *ERG6* / *ERG11 – ETS (erytroblast transformation-specific) related gene,* geny z genové rodiny *ERG*
ESCMID - European society for clinical microbiology and infectious diseases, Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci
EUCAST – The European commitee of antimicrobial susceptibility testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
FKS1 / *FKS2* – geny kódující β-1,3-glukan syntetázu
HIV – human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
I – intermediate, intermediátně citlivý
MDR – multi-drug resistance, mnohočetné lékové rezistence
MFS – major facilitator superfamily, rodina membránových transportérů
MHA – Mueller-Hintonův agar
MIC – minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

MIC_{50} / MIC_{80} / MIC_{90} / MIC_{95} – koncentrace antimykotika, která vede k inhibici růstu mikroorganismu z 50 % (resp. 80 %, 90 %, 95 %) v porovnání s pozitivní kontrolou růstu

MOPS – 3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina

NaOH – hydroxid sodný

NCCLS – National commitee of clinical laboratory standard, Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy

R – resistant, rezistentní

RNA – ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

RPMI – chemicky definované růstové médium

S – susceptible, citlivý

TA – *Trichosporon asahii*

TM – *Trichophyton mentagrophytes*

USA – United States of America, Spojené státy americké

OBSAH

1. ÚVOD ..... - 10 -
2. ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE ..... - 11 -
3. TEORETICKÁ ČÁST ..... - 12 -
3.1. Základní charakteristika klinicky významných hub ..... - 12 -
3.2. Klinicky významné druhy hub ..... - 14 -
3.3. Onemocnění vyvolaná klinicky významnými houbami ..... - 15 -
3.4. Terapie houbových infekcí antimykotiky ..... - 19 -
3.4.1. Polyenová antimykotika ..... - 22 -
3.4.2. Azolová antimykotika ..... - 24 -
3.4.3. Allylaminy ..... - 27 -
3.4.4. Morfoliny ..... - 28 -
3.4.5. Flucytosin ..... - 28 -
3.4.6. Echinokandiny ..... - 30 -
3.4.7. Ostatní antimykotika – griseofulvin, ciclopirox ..... - 31 -
3.4.8. Nespecifická antimykotika – antiseptika ..... - 33 -
3.5. Rezistence k antimykotikům ..... - 34 -
3.5.1. Faktory přispívající k antimykotické rezistenci ..... - 35 -
3.5.2. Buněčné mechanismy rezistence vůči antimykotikům ..... - 36 -
3.5.3. Molekulární mechanismy rezistence vůči antimykotikům ..... - 36 -
3.6. Testování antimykotické citlivosti *in vitro* ..... - 38 -
3.6.1. Hodnocení citlivosti - klinické breakpointy ..... - 40 -
3. 7. Metody stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům *in vitro* ..... - 41 -
3.7.1. Agarové difúzní metody ..... - 41 -
3.7.1.1. Diskový difúzní test ..... - 41 -
3.7.1.2. E-test ..... - 43 -
3.7.2. Agarová diluční metoda ..... - 44 -
3.7.3. Bujónová diluční metoda ..... - 45 -
3.7.4. Testování citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům pomocí komerčně dostupných souprav ..... - 46 -
3.7.4.1. Kvalitativní metody ..... - 47 -
3.7.4.2. Kvantitativní metody ..... - 48 -

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ..... - 51 -
4.1. Materiál ..... - 51 -
4.1.1. Pomůcky ..... - 51 -
4.1.2. Přístroje ..... - 51 -
4.1.3. Chemikálie ..... - 51 -
4.2. Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub ..... - 52 -
4.3. Metodika ..... - 52 -
4.3.1. Příprava růstového média ..... - 52 -
4.3.2. Příprava suspenzí testovaných kmenů kvasinek a vláknitých hub ..... - 52 -
4.3.3. Příprava dvojkové ředící řady testované látky ..... - 53 -
4.3.4. Pipetování do mikrotitrační destičky ..... - 54 -
4.3.5. Vyhodnocení ..... - 55 -
4.4. Testované potenciální látky s antimykotickou aktivitou ..... - 56 -
5. VÝSLEDKY ..... - 63 -
6. DISKUZE ..... - 71 -
7. ZÁVĚR ..... - 74 -
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... - 75 -

1. ÚVOD

Vývoj nových antimykotických látek se začal rozšiřovat až po dramatickém nárůstu počtu nemocných systémovými mykotickými infekcemi. I přes velké pokroky v prevenci, diagnóze a terapii, invazivní mykotické infekce stále způsobují vysokou morbiditu a mortalitu převážně u imunokompromitovaných pacientů, kteří jsou k mykotickým infekcím mnohem náchylnější než zdraví jedinci [1, 2]. Aby se však nová léčiva mohla dostat k pacientům, je potřeba projít mnohým testováním a následnými klinickými studiemi, aby se vyloučila toxicita léčiva pro člověka. U vývoje nových antimykotických látek je důležité dbát právě na vyloučení toxicity, jelikož patogenní houba je stejně jako člověk eukaryotním organismem.

Velký problém u pacientů s invazivními mykotickými infekcemi tvoří antimykotická rezistence, protože právě rezistentní kmeny způsobují tyto závažné infekce. Aby byla zahájena antimykotická léčba rychle a účinně, je nezbytné, aby byly pochopeny mechanismy rezistence a její klinický význam.

V současné době již existují standardizované metody pro testování citlivosti mikromycet k antimykotikům [2]. Vývoj standardních metodik pro testování citlivosti mikromycet k antimykotikům však zaostával za vývojem a zavedením standardních metod pro testování citlivosti bakterií k antibiotikům, protože bakteriální infekce jsou mnohem častější. K rozvoji a standardizaci metodik určených pro testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub došlo nejen tím, že nastoupila nová generace antimykotických látek, ale hlavně také z důvodu fenoménu šířící se rezistence vůči běžně používaným antimykotikům [3].

2. ZADÁNÍ - CÍL PRÁCE

- Rešerše odborné literatury
- Zvládnutí technik v mykologické laboratoři
- Vypracování pracovních postupů
- Vlastní experimenty – praktické provedení daných úkolů
- Zpracování a vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze

Hlavním cílem této práce bylo stanovit možnou antimykotickou aktivitu 34 testovaných látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze za pomoci kvantitativní mikrodiluční bujónové metody. Testování bylo prováděno na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub v mykologické laboratoři Katedry biologických a lékařských věd pod vedením paní Idy Dufkové.

3. TEORETICKÁ ČÁST

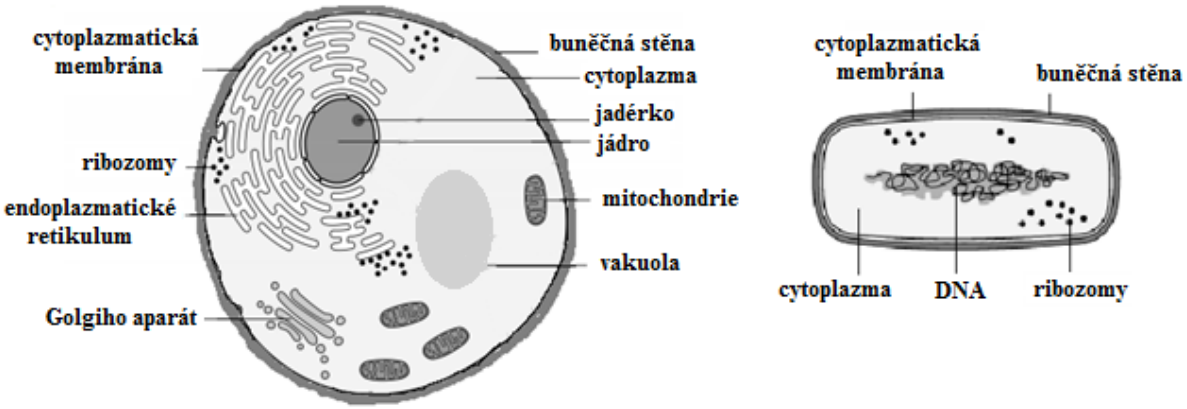
3.1. Základní charakteristika klinicky významných hub

Houby tvoří samostatnou říši živých organismů latinského označení *Fungi*. Jedná se o jednobuněčné i mnohobuněčné eukaryotické mikroorganismy, které přijímají živiny absorpcí a jejichž metabolismus je uzpůsoben k získávání energie a intermediálních sloučenin z látek organického původu. Kromě primárního metabolismu je pro houby charakteristický sekundární metabolismus, kdy dochází k produkci a sekreci různorodých látek [4].

Eumycota (pravé houby) tvoří skupinu, do které patří prakticky všechny patogenní druhy hub, pouze dva druhy (*Pythium insidiosum, Rhinosporidium seeberi*) se řadí do skupiny *Chromista*. Patogenní houby se rozdělují na tři hlavní skupiny, které se mezi sebou liší. První skupinu tvoří dermatofyty, parazité napadající hlavně lidskou kůži, nehty a vlasy. Druhou skupinu tvoří dimorfní saprofyti, pro něž je charakteristické, že se vyskytují ve dvojí formě, vláknité, či kvasinkové v závislosti na podmínkách prostředí (hostitel vs. životní prostředí). Nejpočetnější je třetí skupina oportunních saprofytů, kteří napadají lidský imunitní systém, který je nějakým způsobem deficientní nebo uměle potlačen [4, 5].

Stěžejní rozdíl mezi bakteriálními a mykotickými původci infekčních onemocnění vychází ze skutečnosti, že základní stavební jednotkou mykotických agens, na rozdíl od bakterií, je eukaryotická buňka (viz *Obrázek č. 1*). Bakteriální prokaryotická buňka neobsahuje jádro, jadernou membránu a organely (endoplazmatické retikulum, ribozomy, Golgiho aparát, mitochondrie, vakuoly). Za společný rys lze považovat přítomnost rigidní buněčné stěny, s tím rozdílem, že chemická skladba komponent, které tvoří základ buněčné stěny hub je rozdílná. Přítomnost buněčné stěny u hub je také základním odlišovacím rysem mezi klinicky významnými houbami a jejich hostiteli, protože živočišná buňka buněčnou stěnu neobsahuje. Právě na základě této odlišnosti, mykotický patogen vs. hostitel, je založena antimykotická terapie s využitím antimykotik zavedených do klinické praxe [6, 7].

Obrázek č. 1: Porovnání houbové eukaryotické a bakteriální prokaryotické buňky. Převzato z [8] *a upraveno.*



Legenda: DNA – deoxyribonukleová kyselina.

Klinicky významné houby jsou obecně děleny do dvou hlavních významných skupin, do kterých se dělí především podle jejich struktury. První skupinu tvoří plísně (vláknité mikromycety), jejichž základní strukturou je vlákno (hyfa). Tato vlákna se dále mohou složitě skládat a vytvářet spletitou hmotu zvanou mycelium. Plísně se rozmnožují buď nepohlavním dělením buňky produkcí nepohlavních spór (konidií), nebo sexuální reprodukcí pomocí spór [4, 6, 9, 10]. Mezi klinicky významné plísně patří zástupci rodu *Aspergillus, Penicillium* nebo rodu *Trichophyton, Microsporum* a *Epidermatophyton* [4, 11].

Druhou klinicky významnou skupinu hub tvoří kvasinky. Jsou to jednobuněčné mikroorganismy, které se množí nepohlavním pučení, při kterém se na mateřské buňce vytváří nový výrůstek, který se zvětšuje, až se oddělí. Některé kvasinky vytváří i tzv. pseudomycelium, což jsou v podstatě prodloužené kvasinkové buňky (blastokonidie) spojené v řetízky. Jinými slovy se jedná o protáhlé dceřinné buňky, které se neoddělily od mateřské buňky [4, 9, 10]. Mezi kvasinky lze zařadit například zástupce rodu *Candida*, či *Cryptococcus* [11].

Některé druhy hub lze zařadit do samostatné skupiny. Jedná se tzv. dimorfní houby (bifázické), které jsou unikátní v tom, že podle růstových podmínek jsou schopny přecházet z kvasinkové formy do formy vláknité a naopak. Důležitý faktor pro jejich dimorfismus hraje teplota. Nepatogenní stádium je zastoupeno vláknitou formou, naproti tomu kvasinková forma

je patogenní. [4, 9, 10, 12]. Jako klinicky významné dimorfní houby lze jmenovat například druh *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* nebo *Sporothrix schenckii* [5, 11, 13].

Na houby nelze pohlížet striktně pouze jako na mikroorganismy, které spolu s bakteriemi patří mezi hlavní původce infekčního onemocnění u lidí, a to hlavně u imunokompromitovaných jedinců, ale také jako na nepostradatelné půdní destruenty organické hmoty, nebo průmyslové tvůrce potravin a antibiotik. Velký význam houby sehrávají také při vědeckém a biomedicínském výzkumu, protože vytváří dokonale charakterizovaný eukaryotní modelový systém [14].

3.2. Klinicky významné druhy hub

Jak již bylo řečeno, prakticky všechny druhy patogenních hub patří mezi *Eumycota* (pravé houby). Jejich stélka je tvořena hyfami, pseudomyceliem nebo blastosporami. Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně a jejich buněčná stěna je složena z chitinu a glukanů. Na základě rozdílů ve způsobu rozmnožování, morfologie reprodukčních orgánů, spor a jiných buněčných struktur, u kvasinek například na základě biochemických vlastností, se rozděluje říše *Fungi* do tří kmenů (*Zygomycetes*, *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*) a uměle vytvořeného kmene *Deuteromycetes* [4].

Zygomycetes (houby spájivé) mají většinu druhů saprofytických a jejich mycelium je tvořené hyfami bez přehrádek. Při pohlavním rozmnožování vznikají zygospory, které jsou výsledkem fúze pohlavních orgánů. Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí endogenně vzniklých sporangiospor. Identifikace zygomycet na Petriho misce je velmi jednoduchá, protože jejich kolonie jsou tvořeny typickým vzdušným myceliem. *Zygomycetes* se rozdělují na dvě klinicky významné třídy, *Mucorales* a *Entomophthorales*. Do třídy *Mucorales* se řadí rody *Mucor*, *Rhizopus* a *Absidia*. Z třídy Entomophthorales jsou pro člověka patogenní druhy *Basidiobolus ranarum* a *Conidiobolus coronatus* [4, 5, 7].

Ascomycetes (houby vřeckovýtrusé) tvoří největší skupinu hub (80 % z nich je patogenních). Jejich mycelium je septované, tedy s přehrádkami a jejich pohlavní rozmnožování je charakterizované tvorbou askospór, které vznikají v tzv. asku (vřecku), po spojení specializovaných hyf (samčí anteridium a samičí askogonium). Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí exogenních konidií. Mezi klinicky významné patří rody

Saccharomyces, *Claviceps*, *Talaromyces*, *Arthroderma*, nebo druhy *Pneumocystis carinii*, *Pseudallescheria boydii*, *Sporothrix schenckii*, *Ophiostoma stenoceras* [4, 5].

Basidiomycetes (houby stopkovýtrusé) jsou houby, jejichž mycelium s přehrádkami se splétá do typicky bílého podhoubí tvořeného dvoujadernými buňkami. Charakteristické je pro ně převážně pohlavní rozmnožování, které vzniká spojením dvou geneticky kompatibilních hyf s následnou tvorbou basidií s exogenními basidiospórami. Typické jsou pro tuto skupinu basidiokarpy, tedy plodnice, které v některých případech vyvolávají mycetismus, tedy jedno z houbových onemocnění. Do klinicky významné třídy Agaricales se řadí rody *Amanita*, *Boletus*, *Inocybe* a *Tricholoma*. Rody *Schizophyllum* a *Filobasidiella* jsou specifické tím, že parazitují na člověku [4, 5].

Specifickou, uměle vytvořenou skupinu tvoří *Deuteromycetes* (*Fungi Imperfecti*, houby mitosporické), někdy také označované za houby nedokonalé. *Fungi Imperfecti* zahrnují nepohlavní (imperfektní) stádia hub tzv. anamorfa, která se rozmnožují výhradně pomocí konidií nebo vegetují jen jako sterilní mycelium. U některých druhů je popsané i pohlavní stádium tzv. teleomorfa, a většina těchto teleomorf patří mezi *Ascomycetes*. Patogenní *Deuteromycetes* se rozdělují na *Blastomycetes* a *Hyphomycetes*. *Blastomycetes* jsou imperfektní kvasinky a můžeme mezi ně zařadit rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula* a *Trichosporon*. Mezi Hyphomycetes se řadí vláknité houby, které se rozmnožují konidiemi, například *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Microsporum*, *Trichophyton* [4, 5].

3.3. Onemocnění vyvolaná klinicky významnými houbami

Houby mohou vyvolávat širokou škálu onemocnění. Obecně lze tato onemocnění rozdělit do čtyř skupin, tedy na mycetismy, mykotoxikózy, mykoalergózy a mykózy. Rozlišují se celkem tři základní způsoby přenosu houbového onemocnění, tedy inhalací (vdechnutím), přímým nebo nepřímým kontaktem, poraněním [4, 12].

Mycetismy jsou v podstatě alimentární otravy z požití plodnic hub, makromycet, zejména z oddělení *Basidiomycetes* (houby stopkovýtrusé). Jde o otravy vyvolané toxiny, které tyto houby produkují. Tyto toxiny dělíme do dvou skupin na cytotoxiny (amanitotoxiny, phallotoxiny) a neurotoxiny (muskarin). Příkladem původců mycetismů jsou *Amanita*

phalloides (muchomůrka zelená), *Amanita pantherida* (muchomůrka tygrovaná) nebo *Boletus satanas* (hřib satan) [4, 12].

Mykotoxikózy jsou vyvolané sekundárními metabolity (alfatoxiny, námelové alkaloidy, patulin, ochratoxiny, trichoteceny, zearalenon), které jsou součástí kontaminované potravy. Hlavními producenty mykotoxinů jsou vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Mezi nejznámější onemocnění patří ergotismus a alfatoxikózy [4, 12].

Mykoalergózy jsou hypersenzitivní reakcí imunitního systému na přítomnost antigenních podnětů, v tomto případě na přítomnost spor plísní a jejich metabolitů. Typickým projevem může být zánět spojivek, alergická rýma, bronchitida až bronchiální astma. Mnohá z těchto onemocnění jsou nazývána jako „nemoci z povolání“. Jedním takovým jsou například tzv. farmářské plíce [4, 10, 12].

Zatímco za účelem eliminace nebo vzniku příznaků a rozvoje výše uvedených onemocnění je potřeba se zaměřit například na sanaci budov a tím eliminaci původce (mykoalergózy), nebo vyhnutí se požití plísněmi kontaminované potravy (správné skladování, konzervace potravin – mykotoxikózy), nebo vyhnutí se požití plodnic jedovatých hub (sběr pouze dostatečně známých plodnic – mycetismy), v případě mykóz, tedy infekcí vyvolaných houbami (mikromycetami), spočívá terapie v podávání antimykotik.

Mykózy (mykotické infekce) lze charakterizovat kolonizací, proliferací, resp. diferenciací a sporulací houby, což vede k poškození tkání hostitele. Mykotické infekce mohou být lokální (viz *Tabulka č. 1*), či systémové (viz *Tabulka č. 2*). V rámci skupiny lokálních infekcí lze dále rozlišit povrchové (superficiální) infekce, kožní (kutánní) infekce a podkožní (subkutánní) infekce. Systémové infekce mohou být vyvolány primárně patogenními houbami, zejména ze skupiny dimorfních hub, nebo oportunně patogenními houbami, které vyvolávají systémové infekce zejména u imunokompromitovaných osob [4, 9, 12, 13, 15].

Mezi imunokompromitované jedince lze zařadit pacienty s velmi závažným onemocněním, jako jsou například hematologické malignity, solidní tumory, AIDS (acquired immune deficiency syndrome, syndrom získaného selhání imunity), nebo pacienty po transplantaci krvetvorných i solidních orgánů. Tato skupina osob je velmi výrazně

predisponována právě k mykotickým infekcím, které mají často systémový ráz a vyznačují se vysokou morbiditou a mortalitou [3].

Do první skupiny lokálních infekcí patří povrchové (superficiální) mykózy, které jsou lokalizovány ve *stratum corneum*, tedy nejsvrchnější vrstvě kůže a kutikule vlasů. Tyto mykózy nevyvolávají žádné patologické změny, jsou tedy spíše kosmetickým problémem a často jsou tak nenápadné, že o nich sám pacient ani neví [4, 13].

Dále se jedná o kožní (kutánní) mykózy, což jsou infekce známé také jako dermatomykózy, které postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehtové lůžko. Onemocnění je doprovázeno imunitní reakcí, která se projevuje patologickými změnami hlubších částí kůže. Označují se jako *dermatofytózy*, nebo *tinea*, ke kterým se přidává přídomek, který udává lokalizaci infekce, jako například *tinea pedis* je infekce lokalizovaná v meziprstních prostorech až na chodidlech, nebo *tinea capitis* je infekce vlasové části hlavy. K infekci dochází buď přímým, nebo nepřímým přenosem na koupalištích, ve sprchách, nebo používáním totožného ručníku [4, 9]. Jako poslední v rámci první skupiny lokálních infekcí jsou podkožní (subkutánní) mykózy. Jedná se o houbová onemocnění vyskytující se hlavně v tropických oblastech, která jsou podmíněna traumatickou implantací mykotického agens. Jedná se o infekce, při kterých jsou postiženy hlubší vrstvy dermis, subkutánní tkáně, dokonce v některých případech i kosti [4, 13].

Druhou skupinu tvoří systémové infekce, jinak také nazývané jako hluboké (viscerální, orgánové) mykózy. Jedná se o onemocnění postihující jeden nebo více orgánů, které může diseminovat a přejít do septického stavu. Rozdělují se na primární mykózy a sekundární (oportunní) mykózy, které se považují za nozokomiální nákazy tzv. hospitalismy. [4]. Mezi nejčastější patogeny, které způsobují systémové mykózy, patří rody *Candida, Pneumocystis, Histoplasma, Aspergillus, Cryptococcus, Mucor, Rhizopus* a *Coccidioidomyces* [15].

Tabulka č. 1: Přehled lokálních mykóz zahrnující jejich původce, incidenci a terapii. Převzato z [4, 13] *a upraveno.*

Onemocnění	Původce	Incidence	Terapie
POVRCHOVÉ			
Pityriasis versicolor	*Malassezia furfur*	častá	imidazol, ketokonazol
Seborrhoická dermatitida			
Pityriasis folliculitis			
Tinea nigra	*Exophiala werneckii*	vzácná	Whitfieldovo mazání obsahující kyselinu benzoovou a salicylovou
Bílá piedra	*Trichosporon beigelii*	častá	vyholení a imidazol k prevenci reinfekce
Černá piedra	*Piedraia hortae*	vzácná	terbinafin
KOŽNÍ			
Dermatofytózy	*Microsporum* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp.	častá	onychomykóza - terbinafin tinea (t. capitis, t. pedis) - griseofulvin, azoly, amorolfin
Kandidózy (kůže, sliznice, nehty)	*Candida albicans* a příbuzné druhy	častá	flukonazol, imidazoly, nystatin
Dermatomykózy způsobené non-dermatofyty	*Hendersonula toruloidea, Scytalidium hyalium, Scopulariopsis brevicaulis*	vzácná	přesná terapie není známa
PODKOŽNÍ			
Sporotrichóza	*Sporothrix schenckii*	vzácná	k vyléčení je obvykle potřebný chirurgický zákrok
Chromoblastomykóza	*Fonsecaea* sp., *Phialophora* sp., *Cladosporium* sp.		
Feohyfomykóza	*Cladosporium* sp., *Exophiala* sp., *Bipolaris* sp.		
Mycetom	*Pseudallescheria* sp., *Madurella* sp., *Acremonium* sp.		
Zygomykóza	*Basidiobolus ranarum, Conidiobolus coronatus, Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Absidia* sp.		
Rhinosporidióza	*Rhinosporidium seeberi*		
Lobomykóza	*Loboa loboi*		

Tabulka č. 2: Přehled systémových mykóz zahrnující jejich původce, incidenci a terapii. Převzato z [4, 13] *a upraveno.*

Onemocnění	Původce	Incidence	Terapie
PRIMÁRNÍ			
Histoplasmóza	*Histoplasma capsulatum*	vzácná (častější v Americe)	amfotericin B u infekcí ohrožující život, u mírnějších forem itrakonazol
Kokcidioidomykóza	*Coccidioides immitis*		
Blastomykóza	*Blastomyces dermatitidis*		
Parakokcidioidomykóza	*Paracoccidioides brasiliensis*		
Kryptokokóza	*Cryptococcus neoformans*	spíše vzácná	flukonazol nebo amfotericin B + flucytosin
SEKUNDÁRNÍ			
Kandidóza	*Candida albicans* a příbuzné druhy	častá	flukonazol, amfotericin B + flucytosin (itrakonazol)
Aspergilóza	*Aspergillus fumigatus*	vzácná	amfotericin B (samotný nebo v kombinaci), itrakonazol, prednison na alergické projevy
Pseudallescheriáza	*Pseudallescheria boydii*		léčba podle sestavených směrnic – tzv. „guidelinů“
Zygomykóza	*Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp., *Absidia* sp.		
Hyalohyfomykóza	*Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp., *Scopulariopsis* sp.		
Feohyfomykóza	*Cladosporium* sp., *Exophiala* sp., *Wangiella* sp., *Bipolaris* sp.		

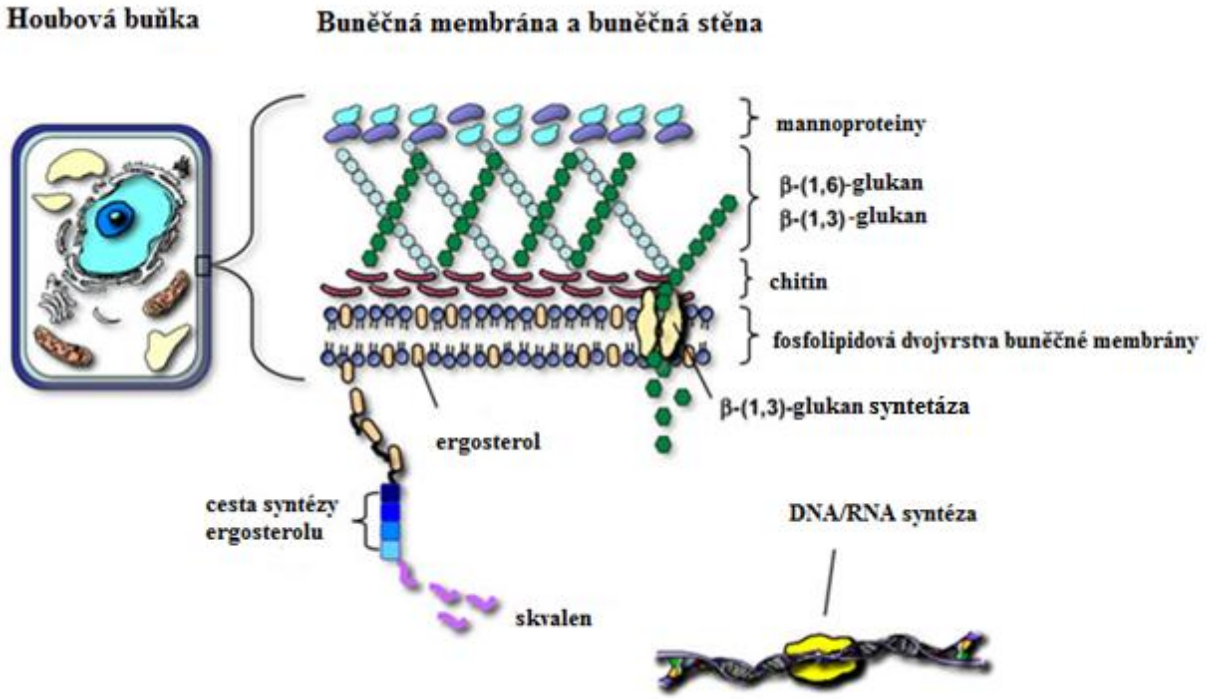
3.4. Terapie houbových infekcí antimykotiky

Jelikož jsou houby eukaryotními organismy, mají blízký evoluční vztah s lidským hostitelem. Tím vzniká terapeutický problém a minimalizuje se počet cílů, jak lékově zapůsobit, aby byl zabit pouze patogen a aby lék nepůsobil toxicky i na člověka [14].

Drtivá většina antimykotik využívaných v klinické praxi působí na buněčnou stěnu, jejíž hlavní součástí je ergosterol, nebo na buněčnou membránu (viz *Obrázek č. 2*). Mechanismus působení může spočívat například v tom, že dané antimykotikum se váže na ergosterol a následně vytváří v buněčné stěně póry, kterými prosakuje obsah cytoplazmy, což má za následek buněčnou destabilizaci a buněčnou smrt (příkladem jsou polyenová antimykotika). Další mechanismus spočívá v inhibici biosyntézy ergosterolu, který je,

jak je výše zmíněno, klíčová komponenta cytoplazmatické membrány hub (příkladem jsou azolová antimykotika). Jiný mechanismus je založen na působení na buněčnou stěnu hub a spočívá v blokaci syntézy β-1,3-glukanu (princip působení echinokandinů). Výjimečný mechanismus účinku má například flucytosin (antimetabolit), který ve výsledku inhibuje syntézu nukleových kyselin a griseofulvin, který blokuje proliferaci hyf denaturací mikrotubulárního aparátu buňky [16, 17, 18, 19].

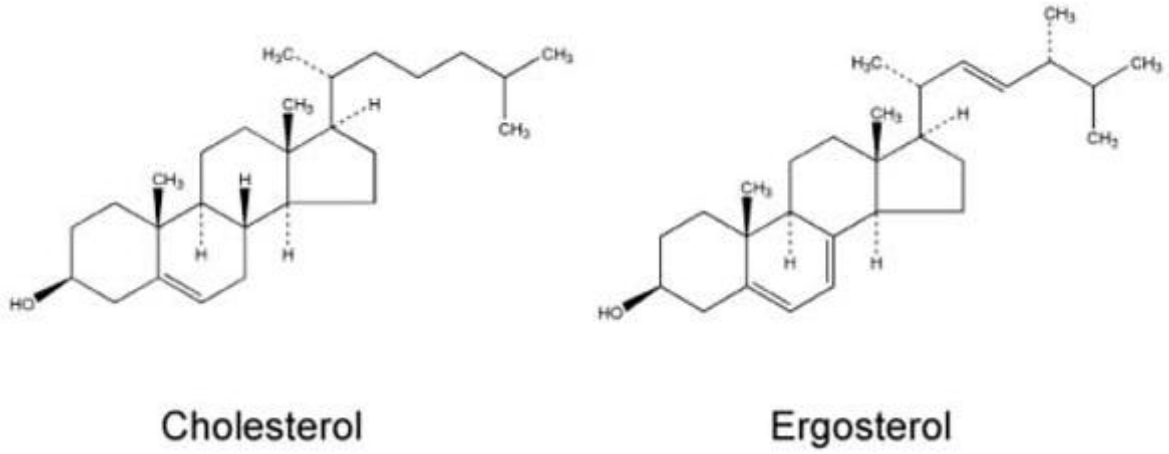
Obrázek č. 2: Cílové struktury pro působení antimykotik na houbové buňky. Převzato z [20] *a upraveno.*



Legenda: DNA – deoxyribonukleová kyselina, RNA – ribonukleová kyselina.

Ergosterol je steroidní struktura, chemicky velmi příbuzná lidskému cholesterolu (viz *Obrázek č. 3*). Ergosterol zajišťuje správné funkce lipidické membrány, jako je například její fluidita, a v cytosolu se podílí na procesech látkové výměny. Fyziologicky se ergosterol účastní regulace proteinkinázy, která je potřebná pro iniciaci růstu [21].

Obrázek č. 3: Podobnost molekuly lidského cholesterolu a houbového ergosterolu. Převzato z [20].

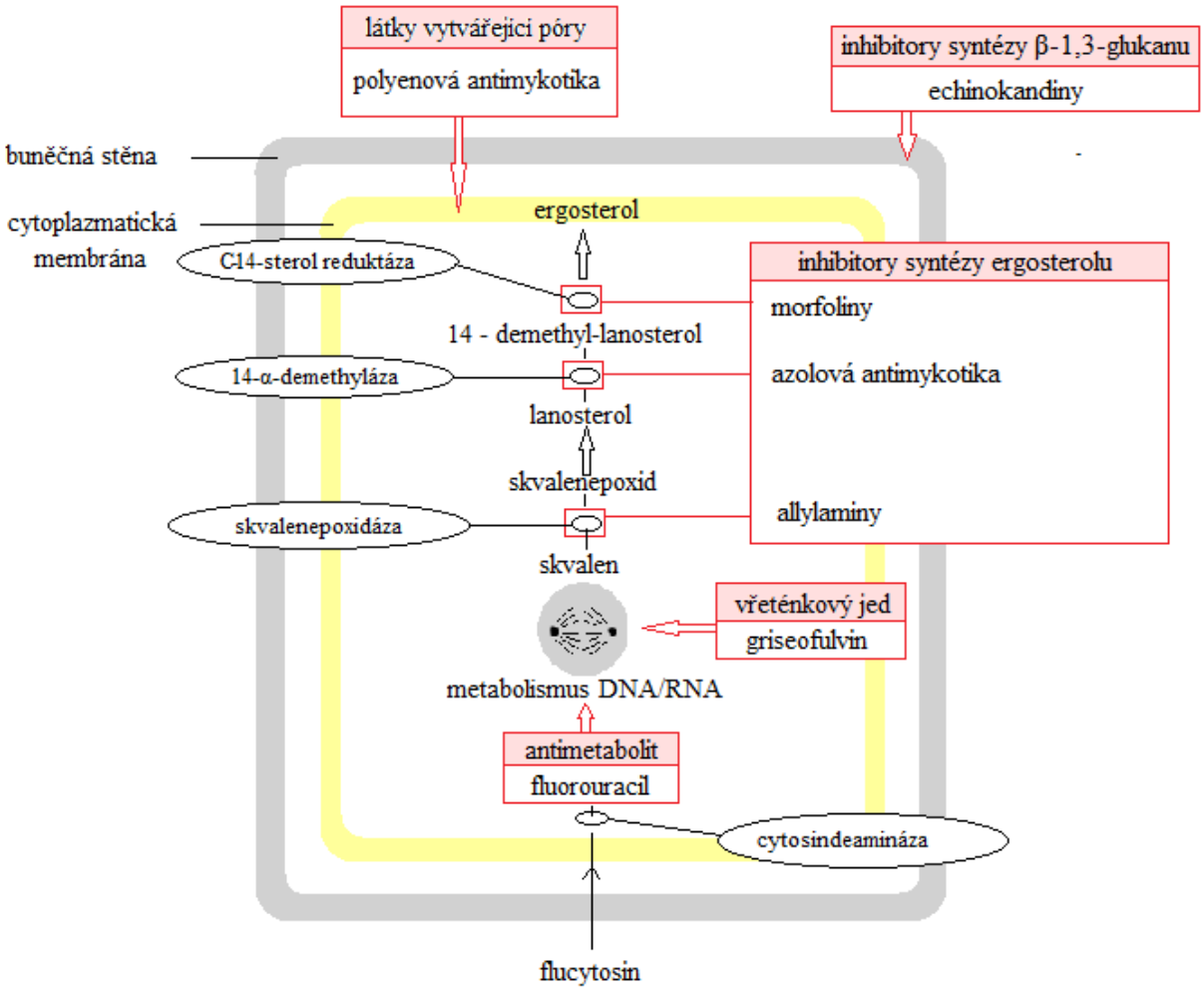


Antimykotika obecně lze třídit do skupin na základě více kritérií. Jedním kritériem je zohlednění mechanismu účinku daného antimykotika (viz *Obrázek č. 4*), na základě tohoto kritéria jsou antimykotika dělena do čtyř skupin:

- látky schopné vytvářet póry v membráně cílové mykotické buňky – polyenová antimykotika, na
- inhibitory syntézy ergosterolu – azoly, allylaminy, morfoliny, na
- látky zasahující do funkce buněčného jádra – flucytosin, griseofulvin, ciklopirox a
- látky inhibující syntézu buněčné stěny – echinokandiny.

Jiné kritérium, na základě kterého jsou antimykotika tříděna do skupin, zohledňuje způsob podávání, nebo způsob působení na mikroorganismy obecně. Podle způsobu podávání lze antimykotika dělit na systémová a lokální a podle působení na mikroorganismy lze rozlišovat mezi specificky a nespecificky působícími antimykotiky. Za nespecificky působící antimykotika jsou označována antimykoticky působící antiseptika, jejichž spektrum účinku není vymezeno výhradně na mykotická agens, ale zahrnuje také bakterie [4, 16, 18, 22].

Obrázek č. 4: Přehled mechanismů účinku u antimykotických léčiv. Převzato z [18] *a upraveno.*



Legenda: DNA – deoxyribonukleová kyselina, RNA – ribonukleová kyselina.

3.4.1. Polyenová antimykotika

Skupina polyenových antimykotik je reprezentována především dvěma antimykotiky, amfotericinem B a nystatinem. Tyto látky mají vlastnost ionoforů [18], jejichž molekuly obsahují jak hydrofobní část, která jim zajišťuje rozpustnost v lipidové dvojvrstvě, tak hydrofilní část, která umožňuje vazbu iontů [23].

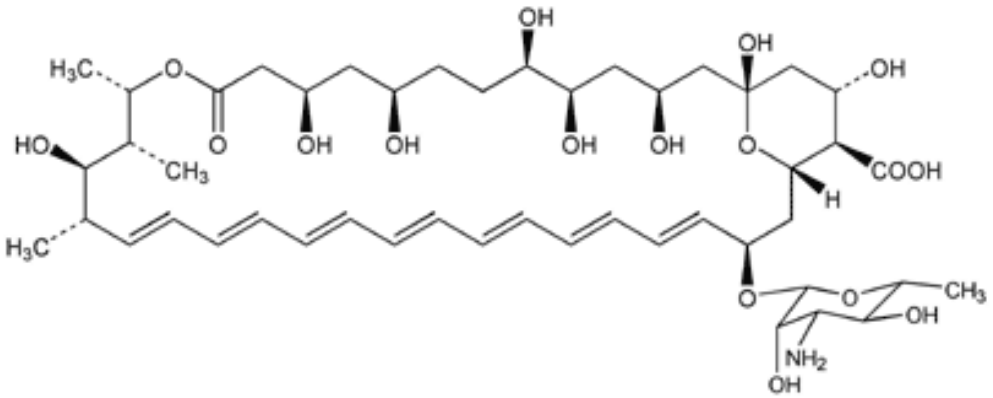
Fungicidní efekt je podmíněn přítomností 26-40ti členného makrocyklického laktonového kruhu [24]. Polyeny mají schopnost zabudovat se společně s ergosterolem do membrány hub a spojením většího počtu komplexů polyen-ergosterol vzniká netěsnost

ve formě pórů, kterými unikají ionty z prostoru buněčné cytoplasmy [11, 16, 18].
Jsou to látky, které se podávají systémově jen výjimečně kvůli jejich toxicitě [22].

Amfotericin B byl prvně izolován z vláknité plísně *Streptomyces nodosus,* a to v roce 1955. Spektrum účinku tohoto polyenového makrolidu (viz *Obrázek č. 5*) je široké a zahrnuje nejen antimykotický, ale také antiprotozoální efekt. Musí se podávat intravenózně, protože podání *per os* je systémově neúčinné [18]. Amfotericin B je standardní lék volby u život ohrožujících, invazivních mykóz, jako je např. aspergilóza nebo kryptokokóza [16]. Zároveň je to lék toxický se značnými nežádoucími účinky. Toxicita bývá jak akutní, která je způsobená především uvolněním eikosanoidů a doprovázená slabostí, horečkou, třesavkou, hypokalémií, tak chronická s poškozením ledvin a jater [25]. Za účelem snížení nefrotoxicity a dalších nežádoucích účinků, byly vyvinuty léčivé přípravky ve formě suspenzí lipozomů. [18].

Amfotericin B působí efektivně na širokou škálu kvasinek a vláknitých mikromycet, včetně dimorfních hub (*Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Rhodotorula* sp.*, Cryptococcus neoformans, Sporothrix schenckii*). Primárně rezistentní jsou však například: *Aspergillus terreus, Trichophyton beiglelii, Fusarium* spp.*, Pseudoallerscheria boydii, Malassezia furfur* a také některé izoláty kvasinky rodu *Candida*. [26, 27, 28].

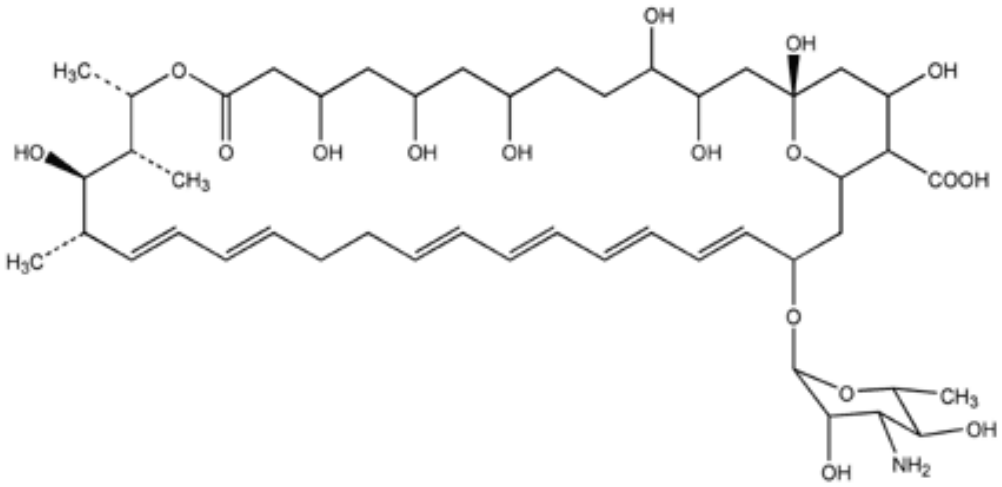
Obrázek č. 5: Chemická struktura molekuly amfotericinu B. Převzato z [28] *a upraveno*.



Dalšími látkami ze skupiny polyenových antimykotik jsou nystatin (viz *Obrázek č. 6*) nebo natamycin. Jsou to topicky účinné látky využívané k terapii kvasinkových slizničních infekcí. Natamycin je vhodný i k léčbě keratomykóz a otomykóz [16]. Jelikož nedochází

po perorálním podání k jejich resorbci [18], mohou být také použity k dekontaminaci střevního traktu [17, 24]. Spektrum účinku nystatinu zahrnuje především mikroorganismy rodu *Candida, Rhodotorula, Torulopsis* a *Trichosporon*. Dobře působí na mikromycety rodu *Aspergillus* a naopak není účinný na bakterie, aktinomycety a viry. Natamycin je účinný proti kvasinkám, dermatofytům, plísním a dimorfním houbám [17]. V současné době je v klinických studiích lipozomální nystatin, který se podává intravenózně. Jako vedlejší efekty se projevily hypokalémie a nefrotoxicita, ale detaily těchto nežádoucích účinků nejsou prozkoumány. Obecně ale nežádoucí účinky topického nystatinu jsou vzácné a vyskytují se minimálně [29].

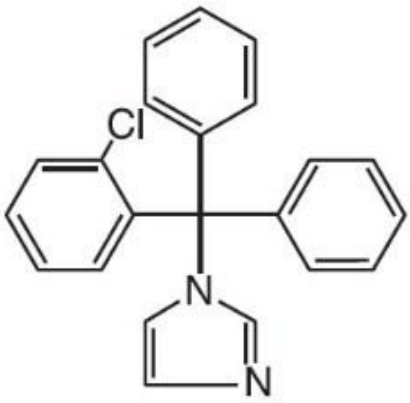
Obrázek č. 6: Chemická struktura molekuly nystatinu. Převzato z [29] *a upraveno.*



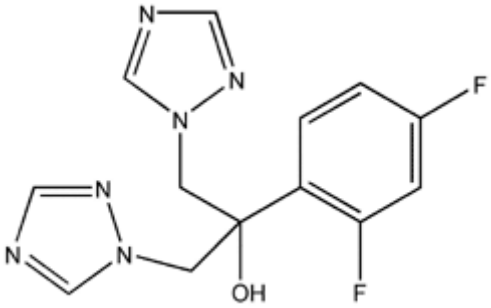
3.4.2. Azolová antimykotika

Azolová antimykotika tvoří širokou skupinu syntetických sloučenin, jejichž antimykotický účinek byl prvně objeven v šedesátých letech minulého století. Prvními azoly využívanými za účelem antimikrobní terapie byly imidazol, klotrimazol (viz *Obrázek č. 7*), mikonazol a ketokonazol, což jsou heterocyklické sloučeniny, které obsahují jako aktivní skupinu imidazolový kruh se dvěma atomy dusíku, a poté následovalo zavedení dalších sloučenin jako je flukonazol (viz *Obrázek č. 8*), nebo itrakonazol, jejichž základem je triazolový kruh se třemi atomy dusíku. Jedná se o nejrozšířenější antimykotika za posledních 20 let [19, 30].

Obrázek č. 7: Chemická struktura imidazolového derivátu klotrimazolu. Převzato z [31].

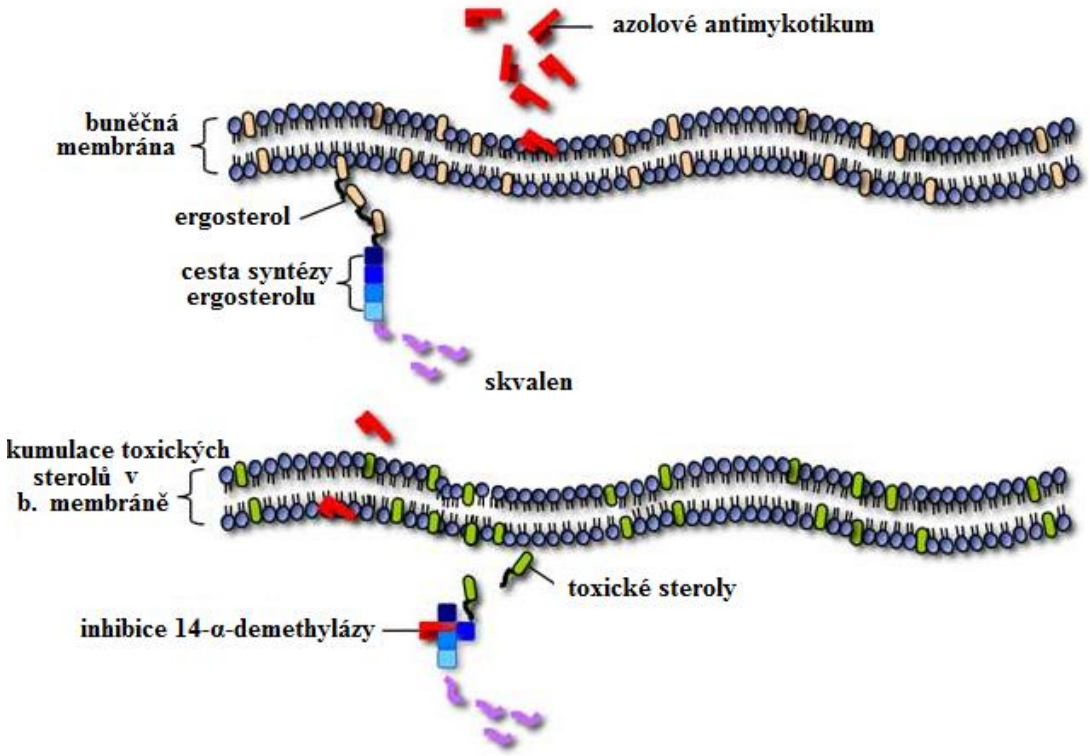


Obrázek č. 8: Chemická struktura triazolového derivátu flukonazolu. Převzato z [32] *a upraveno.*



Azoly působí fungistaticky a mají široké spektrum účinku. Jejich mechanismus účinku je dán inhibicí syntézy ergosterolu (viz *Obrázek č. 9*). Azoly brání přeměně lanosterolu na ergosterol tím, že se navážou v cytochromu P-450 na železo hemu, které je nutné pro funkci 14-α-demethylázy. Tento enzym se podílí na přeměně lanosterolu na ergosterol [18]. Tím dojde k zabránění aktivace kyslíku, který je nezbytný pro demethylaci a začnou se hromadit toxické steroly, které způsobí zvýšenou permeabilitu buněčné membrány a inhibici růstu hub [15, 20, 30, 33].

Obrázek č. 9: Mechanismus účinku azolových antimykotik. Převzato z [20] *a upraveno.*



Postupným vývojem od azolů k triazolům první (flukonazol, itrakonazol) i druhé generace (vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) se zvyšuje antimykotická specificita. To znamená, že u vyšších generací triazolů je ovlivnění cytochromu P-450 v lidské buňce (hepatocytu) nevýznamné [34].

Jelikož azoly ovlivňují syntézu steroidních hormonů (kortizolu a androgenů), způsobují například po dlouhodobém podávání ketokonazolu, významný antiandrogenní efekt projevující se jako gynekomastie, oligospermie a impotence. Vysoké dávky ketokonazolu (400 mg denně) ohrožují závažným poškozením játra, v extrému může však dojít až k nekróze hepatocytů [30].

Všechna imidazolová antimykotika (klotrimazol, ketokonazol, mikonazol, ekonazol, krokonazol, sertakonazol) se užívají lokálně, s výjimkou ketokonazolu, a to převážně jednou denně k terapii jasně ohraničených ložisek, nebo dále jako doplněk systémové terapie u nemocí s častým relapsem, např. onychomykózy, nebo chronické vaginální kandidózy [16].

Novější triazolové deriváty mají v porovnání k imidazolům širší spektrum účinku, protože působí i na kryptokoky a mají výhodnější farmakokinetické vlastnosti, jako je dobrý průnik do tkání a dlouhý biologický poločas [22]. Enterálně se resorbují, proto se mohou použít i u systémové terapie [18].

Obecně jsou tedy azoly využívány k terapii infekcí vyvolaných mikromycetami jako je *Candida albicans, Candida neoformans, Candida immitis, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis.* Některé druhy vláknitých mikromycet rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Candida glabrata* a zástupci kmene *Zygomycetes* jsou k dostupným azolovým antimykotikům rezistentní [26]. A právě vzrůstající rezistence se stává problémem, který je zapříčiněn stále vyšším využíváním azolových antimykotik [17].

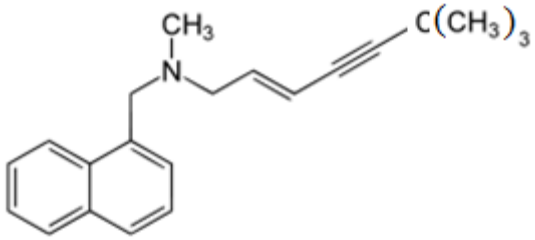
3.4.3. Allylaminy

Allylaminy jsou syntetické fungicidní látky, které působí jako nekompetitivní inhibitory skvalenepoxidázy, tedy enzymu, který spolu se skvalencyklázou konvertuje skvalen na lanosterol. Inhibice v produkci lanosterolu se následně projeví ve snížené konverzi lanosterolu na ergosterol a dojde ke kumulaci toxického skvalenu ve fungální buňce [11, 26]. Jedná se tedy o sloučeniny inhibující biosyntézu ergosterolu v časnější fázi než azoly [24].

K antimykotickým allylaminům se řadí naftifin a terbinafin. Naftifin (viz *Obrázek č. 10*) působí fungicidně a užívá se topicky při léčbě kožních infekcí vyvolaných dermatofyty [26] [16]. Naftifin vykazuje také antiflogistické účinky [18].

Druhý zástupce jmenované skupiny, terbinafin, je systémově působícím antimykotikem a má fungistatické až fungicidní účinky. Proniká do kůže a hromadí se nejen v ní, ale i v jejich adnexech, jako jsou např. nehty [7]. Mezi mykotická agens citlivá na terbinafin patří zástupci rodu *Aspergillus, Fusarium* a řada dalších vláknitých mikromycet. Efektivita tohoto antimykotika je však variabilní, v případě kvasinkových infekcí a v případě systémových infekcí se zdá být terbinafin neúčinný [26]. Terbinafin se nejčastěji užívá při léčbě kožních mykóz i kožní leishmaniózy [22].

Obrázek č. 10: Chemická struktura terbinafinu. Převzato z [35] *a upraveno.*

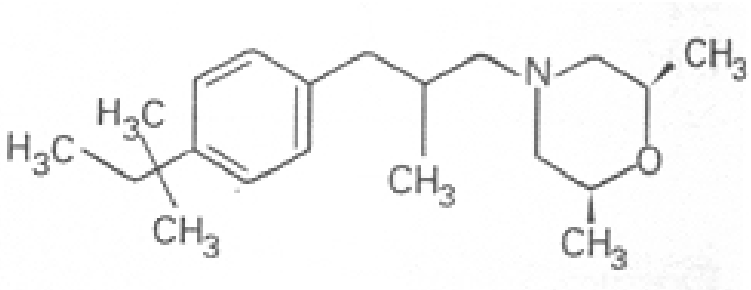


3.4.4. Morfoliny

Morfoliny jsou sloučeniny inhibující 2 enzymy, které se účastní biosyntézy ergosterolu, a to C-14 sterol reduktázy a C-8 sterol izomerázy [15, 16].

Amorolfin (viz *Obrázek č. 11*) je fungicidně působící, jediný zástupce této skupiny antimykotik využívaný v klinické praxi. Jde o topicky aktivní antimykotickou látku, která se používá k léčbě kožních a slizničních infekcí vyvolaných především dermatofyty a kvasinkami, jako je onychomykóza nebo vulvovaginální kandidóza [16, 24]. Amorolfin je velmi dobře snášen, jen zřídka byly pozorovány menší lokální nežádoucí účinky jako je pálení, suchost, svědění, zarudnutí nebo mokvání kůže [36].

Obrázek č. 11: Chemická struktura amorolfinu . Převzato z [36] *a upraveno.*

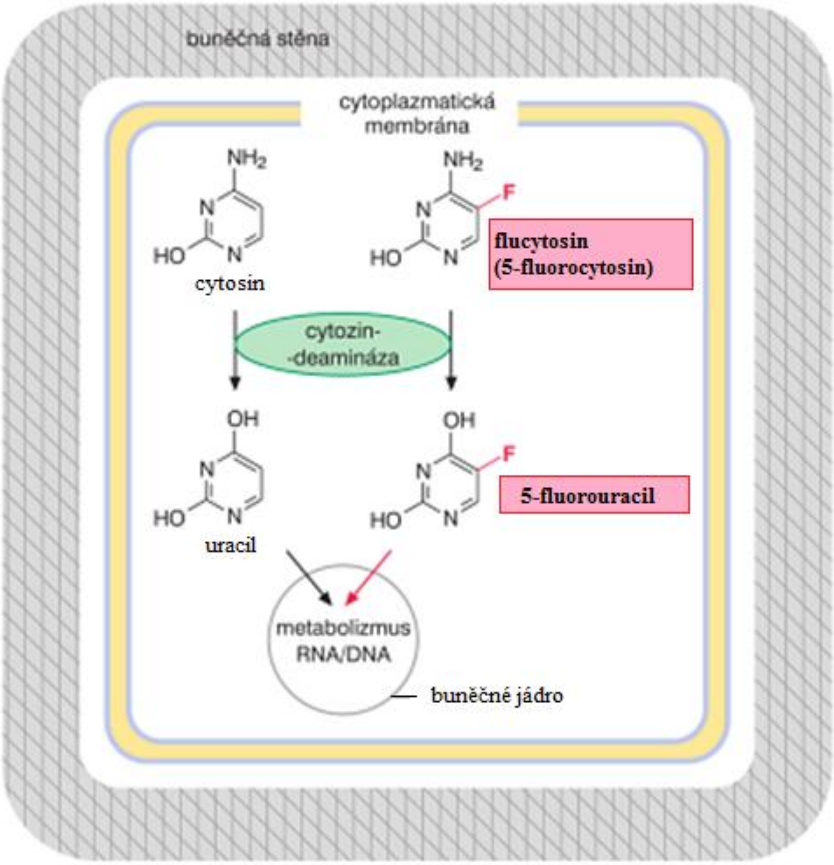


3.4.5. Flucytosin

Flucytosin, neboli 5-fluorocytosin (5-FC) (viz *Obrázek č. 13*), je fungistatický lék zasahující do funkce buněčného jádra s úzkým spektrem účinnosti. Jedná se o antimetabolit a po chemické stránce jde o fluorovaný analog pyrimidinové báze cytosinu [22, 26].

5-FC sám o sobě nemá antifungální aktivitu [15]. Mechanismus jeho účinku spočívá v aktivním transportu 5-FC do buněk mikromycet pomocí cytosin-permeázy a následné deaminaci cytosin-deaminázou na účinnou látku 5-fluorouracil (viz *Obrázek č. 12*) [17]. 5-fluorouracil soutěží s uracilem o zabudování do RNA a tím dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin [18].

Obrázek č. 12: Mechanismus účinku flucytosinu. Převzato z [18] *a upraveno.*



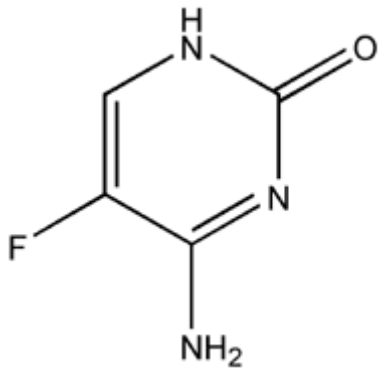
Legenda: RNA – ribonukleová kyselina, DNA – deoxyribonukleová kyselina.

Příčinou úzkého spektra účinku 5-FC je nutnost intracelulární deaminace, aby vzniklo účinné léčivo. Spektrum zahrnuje kvasinky rodu *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, nebo vláknité mikromycety rodu *Aspergillus*. Proti aspergilům je účinný pouze v kombinaci. Nejvýznamnější kombinací je synergická interakce s amfotericinem B v léčbě aspergilózy a těžkých forem kandidózy, kde flucytosin umožňuje snížit dávku amfotericinu B [17, 26].

Při terapii flucytosinem je potřeba sledovat hladiny léku v séru pacienta, protože již byly prokázány toxicita kostní dřeně a hepatotoxicita. Z méně častých nežádoucích účinků

se vyskytují gastrointestinální intolerance, vyrážka, zmatenost, halucinace, útlum a euforie [37, 38]. Kvůli běžnému výskytu primární rezistence je flucytosin v monoterapii kontraindikován a taktéž se na něj rychle vyvíjí sekundární rezistence [24].

Obrázek č. 13: Chemická struktura flucytosinu. Převzato z [38] *a upraveno.*

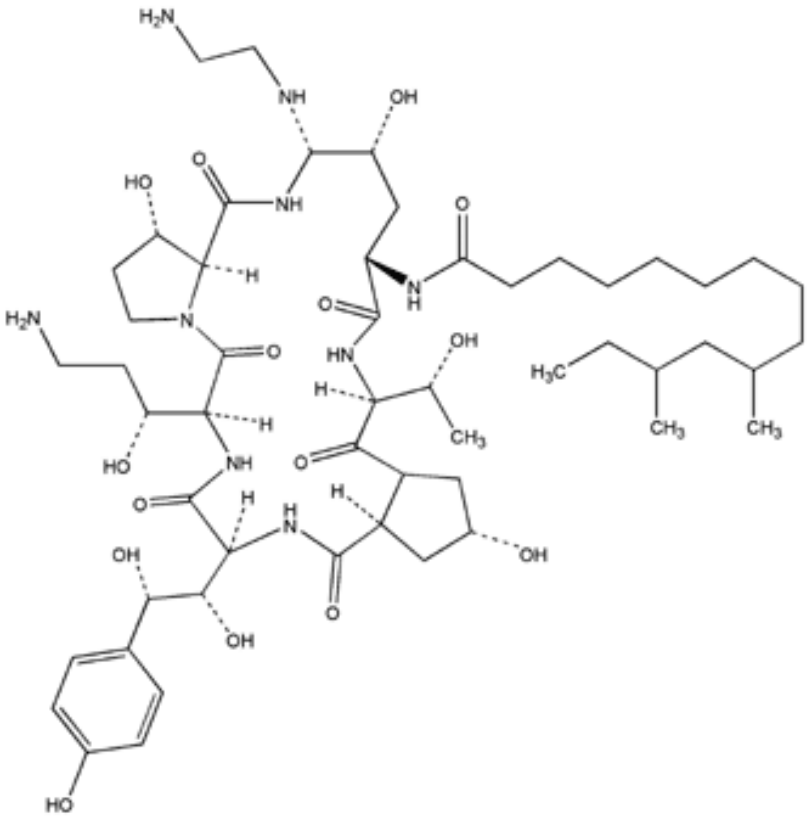


3.4.6. Echinokandiny

Echinokandiny jsou nejnovější antimykotika určená k léčbě závažných systémových mykóz [39]. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny [17]. Do této skupiny léčiv zařazujeme kaspofungin, mikafungin a anidulafungin. Jde o velké polypeptidy, které nekompetitivně inhibují syntézu (1,3)-β-D-glukanu, který je důležitou součástí buněčné stěny hub. Díky jejich prozatím malému využití v klinické praxi není známa rezistence vůči nim [19]. Vzhledem ke specifickému působení těchto antimykotik na buněčnou stěnu, která u živočišné buňky chybí, je toxicita spojená s echinokandiny málo častá [37].

Kaspofungin (viz *Obrázek č. 14*) je semisyntetický polycyklický polypeptid se širokým spektrem účinku, které zahrnuje druhy rodu *Candida* a *Aspergillus* [18] a je také účinný na *Saccharomyces cerevisiae* a na cysty *Pneumocystis jiroveci*. Kaspofungin se podává intravenózně a patří mezi léky první volby především v léčbě invazivní kandidózy a kandidémie [30]. Naopak kaspofungin postrádá aktivitu vůči kryptokokům, stejně tak jako ostatní echinokandiny [26]. Sloučenina má velkou molekulu, čímž není resorbována z gastrointestinálního traktu a je velmi dobře tolerována [30].

Obrázek č. 14: Chemická struktura kaspofunginu. Převzato z [40] *a upraveno.*



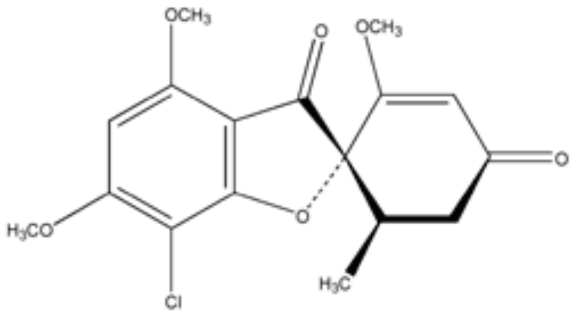
3.4.7. Ostatní antimykotika – griseofulvin, ciclopirox

Griseofulvin (viz *Obrázek č. 15*) je jedním z nejdéle známých antimykotik. Prvně byl izolován v roce 1939, ale komerčně byl užit až v druhé polovině padesátých let dvacátého století [16, 41]. Griseofulvin je antibiotikum s antimykotickým účinkem na dermatofyty. Mechanismus účinku spočívá v denaturaci mikrotubulárního aparátu buňky, po jehož dezintegraci se buňka nemůže dělit (jde o tzv. mikrotubulární jed). Tímto dochází k blokádě proliferace vláknitých výběžků a hyf, nebo k jejich deformaci a nefunkčnosti, pokud se vytvoří. Jeho spektrum účinku je velmi úzké, zaměřené pouze na dermatofyty. Rezistence na griseofulvin vzniká velmi vzácně [17].

Terapie griseofulvinem trvá týdny, při postižení nehtů i několik měsíců. Je to proto, že proniká pouze do nově se tvořícího keratinu. V dnešní době je griseofulvin nahrazován výhodnějšími antimykotiky, protože má spousty nevýhod, jako je například dlouhodobé podání *per os* a úzké spektrum účinku, které je zaměřené pouze na dermatofyty [16, 18].

Nežádoucí účinky nejsou u griseofulvinu moc časté, může se však objevit bolest hlavy, nauzea, gastrointestinální dyskomfort, fotosenzitivita nebo kožní vyrážka [16].

Obrázek č. 15: Chemická struktura griseofulvinu. Převzato z [41] *a upraveno.*

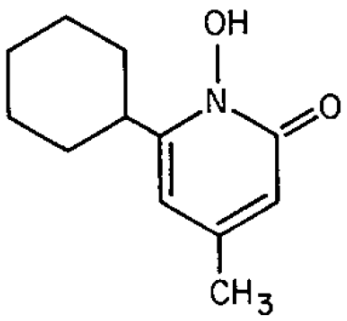


Ciclopirox (viz *Obrázek č. 16*) je topickým antimykotikem ze skupiny hydroxypyridonů. Jeho mechanismus působení je odlišný od ostatních antimykotik, protože neovlivňuje biosyntézu sterolů, není však zcela objasněn. Ciclopirox má vysokou afinitu k trojvazným kovovým kationtům. Vazbou na tyto kovy dochází k inhibici na kovech dependentních enzymů, které jsou odpovědné za degradaci peroxidů uvnitř buňky [42]. Dochází tak ke změně permeability membrány, a tím k narušení transportu bílkovin do nitra buněk. Ciclopirox má široké spektrum účinku zahrnující jak dermatofyty, kvasinky, plísně, tak je účinný i na některé bakterie. Dobře proniká do hlubších vrstev kůže a nehtů a používá se ve formě soli s olaminem [24, 42].

Tato sloučenina má také významný účinek i na některé bakterie, a proto je vhodný k léčbě chorob s prokázanou smíšenou etiologií jako je tomu například u paronychia [16].

Jelikož se jedná o topické léčivo, po kožní nebo vaginální aplikaci se mohou objevit pouze lokální reakce, a to pálení pokožky, podráždění, zarudnutí, bolest nebo svědění. Nejčastěji vyskytujícím se nežádoucím účinkem ciclopiroxu po aplikaci na nehty je mírné zarudnutí [42]. Lze také zmínit vzácný nežádoucí účinek ciclopiroxu, a to diskoloraci vlasů, či alopecii [1].

Obrázek č. 16: Chemická struktura ciclopiroxu . Převzato z [43].



3.4.8. Nespecifická antimykotika – antiseptika

Jak již bylo zmíněno, existují i nespecifická antimykotika, která působí jako antiseptika. Jedná se o látky s fungistatickým, a velmi často s bakteriostatickým účinkem. Tyto látky se používají k léčbě nebo profylaxi mykóz kůže a nehtů, dále k dekontaminaci infikované obuvi nebo oděvů. Jejich účinek je podmíněn ovlivněním propustnosti buněčné membrány, změnou pH nebo denaturací proteinů [11, 44]. Do této skupiny antimykotik můžeme zařadit následující látky: kyselina undecylenová a její sůl s aminotridekanem, kyselina dodecylbenzensulfonová v kombinaci s laurylsulfátem, chlornitrofenol s triglykolem, kyselinu salicylovou nebo boritou, sloučeniny jódu, síry nebo fuchsin [11, 22]. Mezi rozšířené látky této skupiny používané jako antimykotika lze jmenovat také tetraboritan sodný, který je hojně využívaný hlavně v gynekologii pro přípravu vaginálních kuliček *Globulus cum natrio tetraborico* na infekce vyvolané kandidami, nebo například chlorhexidin, který slouží k ošetřování infekcí dutiny ústní způsobených *Candida albicans,* a nebo fusafungin, který slouží jako přírodní volně prodejné antibiotikum ve formě roztoku k inhalaci [44].

Mezi nová potenciální antimykoticky působící léčiva patří skupiny pradimicinů, nikkomycinů a derivátů sordarinu, které jsou ve vývoji [16, 26, 30].

3.5. Rezistence k antimykotikům

V současnosti se klade velký důraz na pochopení evolučních mechanismů, které řídí vznik lékové rezistence, protože právě rezistence předbíhá vývoj nových antimykotických látek. Jako klinicky lékově rezistentní mykotické onemocnění je definováno takové, které je nepoddajné k léčbě antimykotikem [19].

Je třeba rozlišovat klinickou a laboratorní rezistenci. Z klinického hlediska se jedná o přetrvávání nebo progresi mykotické infekce přes příslušné lékové terapie. V laboratorním prostředí je léková rezistence kvantifikována pomocí testování MIC (minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace), ve kterém je sledována interakce mezi patogenem a lékem v určité koncentraci po stanovenou dobu v souladu se standardními protokoly. Testování MIC však nezahrnuje působení farmakokinetiky, interakce hostitel-patogen, mikrobiální interakce a vliv environmentálních faktorů na lékovou rezistenci [19]. MIC je definována jako nejnižší koncentrace léčiva, která inhibuje růst mikroorganismu. Stanovuje se kvantitativními metodami testování citlivosti, a ačkoliv ověřuje rozsah, jak bude patogen reagovat na daný lék, tak ne vždy dokáže správně předpovědět odpověď *in vivo* [14].

In vitro je rezistence popisována jako primární nebo sekundární. Primární, neboli přirozená (vnitřní) rezistence je definována jako odolnost mikroorganismu vůči léku, ještě před tím, než dojde k expozici mikroorganismu léčivem. Příkladem primární rezistence je odolnost *Candida krusei* vůči flukonazolu nebo odolnost *Cryptococcus neoformans* k echinokandinům. Obecně lze říci, že primární rezistence je popsána například pokud chybí cílové struktura, ke které by se daný lék vázal. Naopak sekundární rezistence se vyvíjí až jako odpověď na expozici lékem, proto je jinak také nazývána jako získaná rezistence. Jako příklad sekundární rezistence lze uvést odolnost *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* k flukonazolu [2, 3, 33].

Vývoj rezistence lze sledovat v daném čase podle dvou hlavních experimentálních postupů. První z nich zkoumá houbové populace shromážděné od pacienta podstupující antimykotickou léčbu. Tento postup je klinicky významný v tom, že umožňuje identifikaci mutací, které se hromadí v patogenu po výběru léku *in vivo*. Druhý postup sleduje vývoj rezistence u umělých populací. Výhodou u této metody je to, že zde mohou být kontrolovány experimentální parametry a experimenty mohou být replikovány. Oba postupy mají důležité

a odlišné role při odhalování molekulárních mechanismů, které přispívají k rozvoji houbové lékové rezistence [33].

Velkou překážku v antimykotické léčbě představuje vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR, multi-drug resistance), což je rezistence patogenu vůči více druhům potenciálně účinných léků. MDR je široce se vyskytující fenomén, který není omezen pouze na patogenní houby, ale lze ho pozorovat i u jiných organismů [45].

3.5.1. Faktory přispívající k antimykotické rezistenci

Faktory, které přispívají k antimykotické rezistenci lze shrnout do tří úrovní. První z nich, jsou klinické faktory, které vedou k neschopnosti úspěšně léčit neústupné onemocnění. Mnoho klinických faktorů, které přispívají k rezistenci, jsou spojeny s imunitním stavem pacienta, farmakologií léků, nebo typem houbové infekce (viz *Tabulka č. 3*). Dalšími jsou faktory buněčné, které jsou spojeny s rezistentním houbovým kmenem. Na buněčné úrovni může být léková rezistence výsledkem nahrazení citlivého kmene více rezistentním kmenem, nebo výsledkem změny endogenního kmene mutací nebo genovou expresí na rezistentní fenotyp. Na poslední úrovni jsou molekulární faktory, které jsou v konečném důsledku zodpovědné za rezistenci fenotypu v buňce. [33].

Tabulka č. 3: Faktory podílející se na klinické antimykotické rezistenci. Převzato z [3, 33] *a upraveno.*

<table>
<tr><th>HOSTITEL</th><th colspan="2">ANTIMYKOTIKUM</th><th colspan="2">MIKROMYCETA</th></tr>
<tr><td>imunitní stav</td><td rowspan="3">farmakokinetika</td><td>absorbce</td><td rowspan="3">fenotypové vlastnosti</td><td>kvasinky / hyfy</td></tr>
<tr><td>celková kondice</td><td>distribuce</td><td>sérotyp</td></tr>
<tr><td>lokalizace infekce</td><td>metabolismus</td><td>biofilm</td></tr>
<tr><td>závažnost infekce</td><td rowspan="3">dávkování</td><td>frekvence</td><td>genetická variabilita</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">přítomnost cizích předmětů (zubní protézy, katetry)</td><td>režim přerušovaný vs. kontinuální</td><td>virulence</td></tr>
<tr><td>kumulativní dávka</td><td>velikost populace</td></tr>
<tr><td rowspan="2">nonkompliance</td><td>fungistatický efekt</td><td rowspan="2"></td><td colspan="2" rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>lékové interakce</td></tr>
</table>

3.5.2. Buněčné mechanismy rezistence vůči antimykotikům

Jak již bylo zmíněno, mykotické infekce se nejvíce objevují u imunokompromitovaných pacientů, kteří jsou k nim velice náchylní. Existují však endogenní kmeny, které jsou součástí (byť jen přechodné) vnitřní flóry a mohou být původcem infekčního procesu. Tyto kmeny pak mohou být ke stávající antimykotické terapii rezistentní z více důvodů. Jedním z nich může být primární rezistence endogenního kmene. Dále může jít o postupné nahrazování populace původně citlivé za populaci již rezistentní. Klinicky rezistentními jsou například *Candida krusei*, či *Candida glabrata*. Jejich vnitřní rezistence na azoly má za následek zvýšenou frekvenci těchto druhů v populaci pacientů, kteří jsou závislí na léčbě nebo prevenci azolovými antimykotiky [33].

Sekundární rezistence bývá indukována po delší expozici antimikrobním léčivem. Na rozvoji sekundární rezistence se mimo jiné podílejí genetické alterace, tedy specifické náhodné mutace, které vedou k vytvoření rezistentních buněk, které se nakonec stávají dominantním kmenem populace. [33].

Jiný mechanismus vedoucí k získání rezistence může spočívat ve změně genové exprese mykotických buněk, která může být jen přechodná a činí endogenní kmeny pouze dočasně rezistentními. Buňky v přítomnosti léčiva jsou schopny změnit svůj fenotyp a stávají se přechodně rezistentními. Po eliminaci léčiva však tyto buňky jsou schopny rychle se vrátit do původního stavu. Tento jev se nazývá epigenetická rezistence [33].

Zcela jedinečný fenomén u řady mykotických agens spočívá ve schopnosti procházet morfologickou přeměnou, tzv. fenotypovým přepnutím, kdy lze u daného druhu sledovat více buněčných forem. Tyto různé buněčné typy se pak odlišují v citlivosti k antimykotikům. Příkladem může být dimorfní kvasinka *Candida albicans*, u které může nastat přechod z kvasinkové formy do vláknité podoby a naopak. Změny fenotypu byly stejně tak zaznamenány i u jiných druhů kvasinek rodu *Candida*, kdy jsou sledovány makromorfologické odlišnosti různých fenotypů kolonií daného druhu a tento jev fenotypového přepnutí se pojí s unikátní sadou genů a genovou expresí [33].

3.5.3. Molekulární mechanismy rezistence vůči antimykotikům

Mykotická agens vyvinula mechanismy, kterými jsou schopné potlačit účinek jak fungistatických, tak fungicidních látek. V podstatě jde o tři hlavní mechanismy, jmenovitě

o redukci akumulace léčiv uvnitř cílové buňky, dále o snížení afinity léčiv vůči jejich cílům a také o modifikace metabolismu cílové buňky vedoucí k opačnému účinku léku [15].

Molekulární mechanismy rezistence mykotických agens vůči antimykotikům (viz *Tabulka č. 4*) mohou spočívat ve zvýšené expresi efluxních pump. U eukaryotické buňky existují hlavní dva typy efluxních pump, tedy transportních proteinů, které jsou také odpovědné za vývoj antimykotické rezistence, a to ABC transportéry (ATP-binding cassette) a MFS transportéry (major facilitator superfamily). ABC transportéry jsou primární aktivní transportéry, které používají jako zdroj energie pro transport léčiv energii z hydrolýzy ATP (adenosin triphosphate, adenosintrifosfát) a často jsou spojeny s aktivním vylučováním molekul toxických pro buňky, jako je tomu u azolových antimykotik. ABC transportéry jsou kódovány geny *CDR* (*Candida* drug resistance) a za rezistenci vůči azolům stojí zejména geny *CDR1* a *CDR2*. MFS transportéry jsou druhotné aktivní transportéry, které využívají jako zdroj energie elektrochemický gradient protonů přes membránu a jsou spojovány s relativně hydrofobními molekulami, jako je například tetracyklin. Příkladem genu kódujícího transportér tohoto typu je *MDR1* (multi-drug resistance), který je zodpovědný za azolovou rezistenci klinických izolátů *Candida albicans* [15, 33, 45].

Dále může docházet k alteraci cílového místa, například snížením afinity azolů vůči mutovanému enzymu lanosterol-14α-demethylázy. Stejně tak může docházet k deregulaci exprese cílového místa antimykotik, jako je tomu například u léčiv zaměřených na biosyntézu ergosterolu (azoly, terbinafin) a i jejich relativně krátká expozice může vést k přechodné up-regulaci genové rodiny *ERG Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* a *Candida krusei*. Posledním molekulárním mechanismem rezistence může být modifikace metabolismu, která je pozorována například u echinokandinů. Některé kvasinky a vláknité houby jsou schopny růst při zvýšených koncentracích echinokandinů, než je hodnota MIC. Tomuto jevu se říká paradoxní účinek, nebo také „eagle efekt“ a vzniká právě v důsledku metabolické adaptace mikroorganismu [15, 46].

Tabulka č. 4: Molekulární mechanismy rezistence vůči jednotlivým skupinám antimykotik. Převzato z [3, 15] *a upraveno.*

Antimykotikum	Mechanismus rezistence
Polyeny	změna ve struktuře ergosterolu - absence ergosterolu díky funkční mutaci v *ERG3* a *ERG6*
	kumulace nefunkčních sterolů v membráně - snížení množství ergosterolu
Azoly	aktivace efluxních pump multidrug-transportéry (geny *CDR*, *MDR*)
	snížení afinity k vazebným místům (mutace v genech *ERG11*, *CYP51*)
	změna regulace cílových enzymů (geny *ERG11* a *CYP51*)
	aktivace vedlejší cesty biosyntézy ergosterolu (gen *ERG3*)
Allylaminy	neznámý
Morfoliny	
Flucytosin	genově podmíněná enzymatická modifikace - defekt v cytosin-permeáze, deficience v enzymech zahrnutých v metabolismu flucytosinu, deregulace biosyntézy pyrimidinu
Echinokandiny	alterace v afinitě k β-1,3-glukan syntetáze - bodová mutace na genech *FKS1* a *FKS2*

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

3.6. Testování antimykotické citlivosti *in vitro*

Metody určené k testování citlivosti mykotických agens *in vitro* jsou nyní standardizované mezinárodně a výsledky z tohoto testování jsou zásadní pro určení vhodné léčby pacientů trpících mykotickými infekcemi. Tyto metody slouží obecně k určení citlivosti, nebo rezistence izolovaných klinických kmenů vůči standardně používaným antimykotikům.

Na základě určení mikrobiální citlivosti, resp. rezistence *in vitro* je volena vhodná racionální terapie, tedy jsou volena antimykotika, která by mohla být klinicky účinná [47].

Vzhledem ke zvýšenému výskytu závažných invazivních mykotických infekcí, především u imunokompromitovaných osob, spolu se skutečností, že za těmito infekcemi často stojí rezistentní kmeny, bylo zapotřebí vyvinout a zavést standardizované metody pro testování citlivosti klinických izolátů vůči antimykotickým látkám. Schvalování metodik určených pro testování citlivosti různých mikrobiálních agens vůči antimikrobním látkám má na starosti organizace, kterou je CLSI (Clinical laboratory standards institute, Ústav laboratorních a klinických standardů), dřívější NCCLS (National commitee of clinical laboratory standard, Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (The European committee of antimicrobial susceptibility testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti) [47].

Pod záštitou těchto organizací byly schváleny do této doby 4 dokumenty týkající se testování citlivosti mykotických agens. V roce 1982 vznikla v USA (United States of America, Spojené státy americké) v rámci CLSI subkomise pro testování citlivosti k antimykotikům. První dokument byl zveřejněn v roce 1992. Dokument M27-A3 obsahuje popis metodiky a doporučení v postupu při testování diluční bujónovou metodu pro testování citlivosti kvasinek. Dalšími dokumenty jsou M38-A2 pro testování vláknitých hub diluční metodou, M44-A a M51-P pro stanovení kvasinek, resp. hyfomycet (s výjimkou dermatofyt) difúzní diskovou metodou [3].

V Evropě došlo k harmonizaci metod až v roce 1997, kdy vznikla organizace EUCAST [33]. EUCAST je komise organizovaná ESCMID (European society for clinical microbiology and infectious diseases, Evropská společnost pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci), ECDC (The European centre for disease prevention and control, Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí) a European national breakpoint committees. Tato komise se zabývá především stanovením MIC breakpointů a technickými aspekty fenotypového testování citlivosti *in vitro* [48].

Dokumenty CLSI a EUCAST se principiálně v provádění dilučních metod shodují, ale i přesto se v některých aspektech liší (viz *Tabulka č. 5*) [3, 47].

Tabulka č. 5: Rozdíly v metodických krocích v rámci diluční metodiky určené pro testování citlivosti kvasinek in vitro k antimikrobním látkám schválenými organizacemi CLSI a EUCAST. Převzato z [3] *a upraveno.*

Metodický krok	CLSI	EUCAST
příprava inokula - denzita inokula (cfu/ml)	0,5 - 2,5 × 10^3	0,5 - 2,5 × 10^5
glukóza v médiu (%)	0,2	2
dno jamek mikrotitrační destičky	kulaté	rovné
inkubace (h)	24 a 48	24
hodnocení MIC	vizuálně	fotometricky

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

3.6.1. Hodnocení citlivosti - klinické breakpointy

Klinické breakpointy jsou v podstatě interpretační kritéria, na základě kterých lze určit, zda je testovaný klinický izolát, resp. patogen citlivý, intermediátně citlivý nebo rezistentní k testovanému léku. Aby mohla být tato interpretační kritéria validně využita k hodnocení citlivosti, je zcela nezbytné, aby byla k testování citlivosti použita pouze metodika vedená dle instrukcí EUCAST, tedy metodika, na kterou jsou tyto breakpointy validovány [49].

Tyto klinické breakpointy lze využít pro každodenní rutinní hodnocení testů citlivosti vůči antimikrobním látkám v klinických laboratořích za účelem vyhodnocení a doporučení terapie vhodné pro pacienty. Tabulky s breakpoint hodnotami jsou každoročně vždy ke dni 1. ledna „updateovány“ [50].

V rámci EUCAST systému metod určených pro testování citlivosti byly stanoveny následující definice a základní hodnotící kritéria: kmeny klinicky citlivé (S, susceptible) – kmeny vykazující citlivost k takové dávce antimikrobní látky, která zajišťuje s vysokou pravděpodobností terapeutický úspěch; kmeny klinicky intermediátně citlivé (I, intermediate) – kmeny vykazující citlivost k takové dávce antimikrobní látky, která nezajišťuje s jistotou terapeutický úspěch; kmeny klinicky rezistentní (R, resistant) – kmeny nevykazující citlivost

k testované dávce antimikrobní látky, není zajištěn terapeutický úspěch a je zde vysoká pravděpodobnost selhání léčby. Klinické hraniční hodnoty jsou prezentovány jako: S < x mg/l; I > x, < y mg/l a R > y mg/l [51].

3. 7. Metody stanovení citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům *in vitro*

K testování antimykotické citlivosti lze využít metod kvalitativních i kvantitativních. Kvalitativní metody rozdělují testované kmeny podle růstu v přítomnosti antimykotika s ohledem na jejich terapeutický účinek *in vivo* na citlivé, intermediátní a rezistentní. Mezi tyto metody lze především zařadit agarové difúzní metody, jako je diskový difúzní test. Kvantitativní testy poskytují konkrétní hodnotu, a to hodnotu MIC, tj. stupně citlivosti resp. rezistence daného testovaného kmene k příslušnému antimykotiku. MIC je definováno jako nejnižší koncentrace z testované škály, která již zastavuje růst testovaného mikrobiálního kmene viditelně pouhým okem [46]. K těmto metodám patří gradientový difúzní test (E-test) a bujónová diluční metoda.

3.7.1. Agarové difúzní metody

3.7.1.1. Diskový difúzní test

Disková difúzní metoda (viz *Obrázek č. 17*) je jednoduchá, rychlá a finančně nenáročná [3]. Princip této metody spočívá v tom, že testovaná látka difunduje z papírového disku, který je napuštěný antimikrobní látkou, položeného na povrch naočkované agarové půdy. Přítomné kmeny se množí do té doby, než začne působit antimykotikum. V určitém okamžiku a v určité vzdálenosti od disku však antimykotikum už nedokáže množení zastavit a zakládá se okraj inhibiční zóny, který se později zviditelní dalším růstem hub [52].

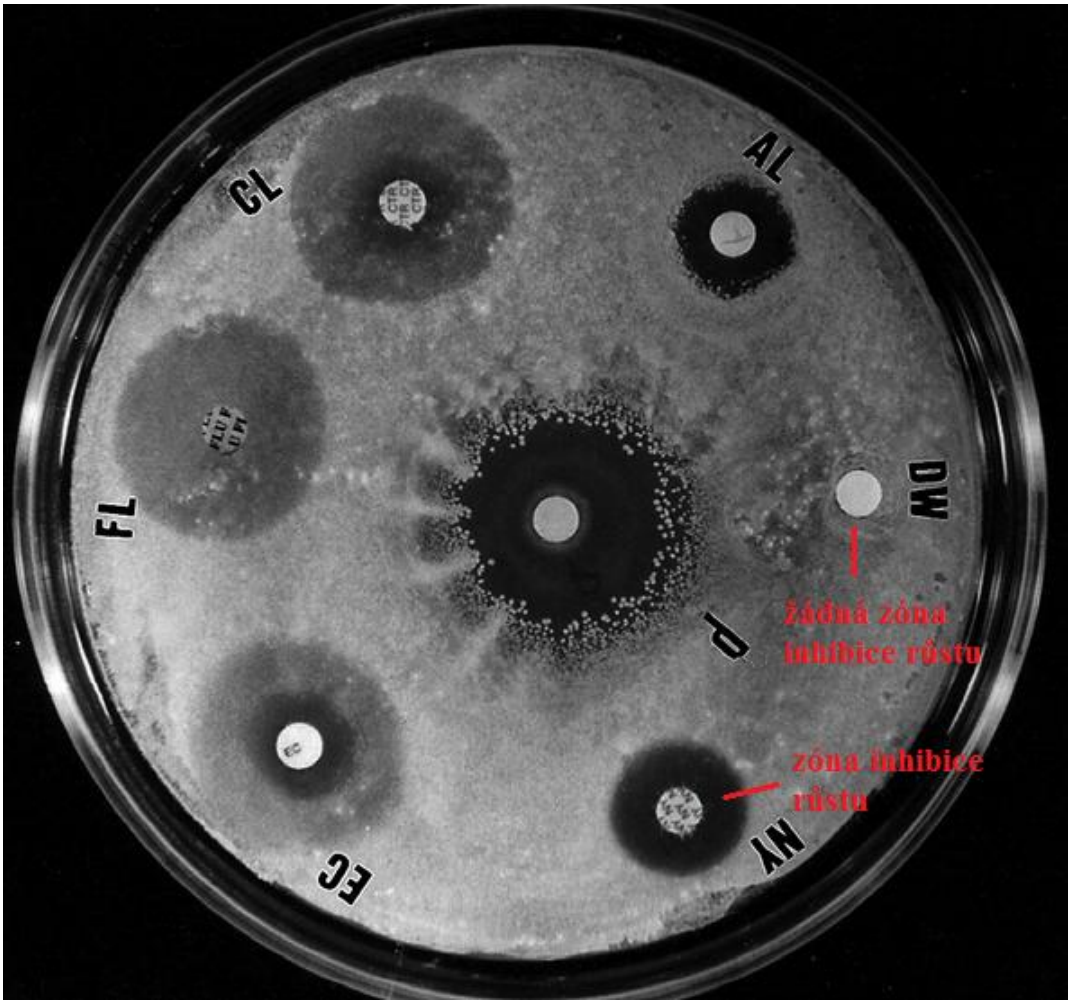
Popis standardizované validní metody pro testování mikromycet (kvasinky rodu *Candida*) je uveden v dokumentu CLSI M44-A a metodika vhodná pro testování citlivosti vláknitých hub s výjimkou dermatofyt je uvedena v dokumentu M51-P. Aby bylo testování úspěšné, je potřebné dodržení standardní metodiky, kdy CLSI doporučuje pro kultivaci použít MHA (Mueller-Hintonův agar), který je v případě kandid obohacený 2% glukózou

a metylénovou modří [3]. Dále je potřeba udržovat pH v rozmezí 7,2 – 7,4 [12] a vhodně zvolit disky s daným obsahem antimykotika, které jsou skladované podle pokynů výrobce [3].

U kandid se vytvoří inokulum z pěti náhodně vybraných kolonií, suspendovaných ve fyziologickém roztoku a upravuje se denzita na $1–5 \times 10^6$ cfu/ml. U vláknitých hub se suspendují spory a po 3–5 minutách se upraví denzita odebraného supernatantu naměřená spektrofotometrem tak, aby odpovídala $0,4–5 \times 10^6$ cfu/ml. Následně po 15 minutách je v obou případech provedena inokulace na testovací půdy pomocí vatového tampónu a po dalších 3-5 minutách jsou aplikovány disky. Média jsou inkubována při 35 °C po dobu 24–72 hodin podle druhu testované mikromycety a po inkubaci se hodnotí pomocí posuvného měřítka zóny inhibice růstu. K hodnocení je možné využívat i automatizované systémy (např. ADAGIO, firma BioRad Laboratories z Francie a BIOMIC, firma Giles Scientific z USA) [46]. Průměr inhibiční zóny závisí na hustotě inokula vyšetřovaného kmene a na výšce půdy v Petriho misce [22].

Diskový difúzní test je v porovnání s dilučními metodami technologicky mnohem jednodušší, protože odpadá obstarávání a manipulace se substancemi. Další výhodou tohoto testu je, že půdy a disky jsou velmi často komercionalizované, a tak se dají použít k běžné laboratorní diagnostice. Nevýhodou je pouze kvalitativní charakter diskového difúzního testu [3].

Obrázek č. 17: Diskový difúzní test znázorňující testování klinického izobátu kvasinky Candida albicans, získaného od HIV-pozitivního pacienta, testování citlivosti vůči různým antimykotikům a alternativní medicíně. Převzato z [53] *a upraveno.*



Legenda: Červeně jsou znázorněny příklady jak viditelné zóny inhibice růstu, tak naopak žádné zóny inhibice, která značí neschopnost dané látky inhibovat růst kvasinky.
P – propolisový ethanolický extrakt; CL – klotrimazol; FL – flukonazol; EC – ekonazol; NY – nystatin; AL – alkohol; DW – destilovaná voda.

3.7.1.2. E-test

E-test, neboli gradientový difúzní test je kvantitativní metoda stanovení MIC na agarové plotně od firmy bioMérieux z Francie, dříve AB BIODISK ze Švédska. Její nevýhodou je cenová náročnost [12]. E-test vychází z principu diskové difúzní metody, ale s možností stanovení MIC. Na agarovou plotnu se přikládá dlouhý kalibrovaný proužek, který má na jedné straně exponenciální gradient koncentrací stabilizované antimikrobní látky

v suchém stavu. Na druhé straně je kontinuální stupnice odpovídající patnácti ředěním testovaného přípravku. Proužek se přikládá na agar stranou s antimykotikem [3] a po přilnutí proužku ke kultivační půdě se difúzí vytvoří kontinuální koncentrační gradient antimykotika, a to podél proužku a kolmo směrem od něj. Na proužku je vyznačena stupnice s hodnotami MIC. Inhibiční zóna, která se vytvoří, má tvar protáhlé kapky, která svým ostrým koncem zasahuje právě do místa, kde je koncentrace antimikrobní látky rovna MIC (viz *Obrázek č. 18*) [12]. MIC se tedy odečítá v místě, kde okraj zóny protíná proužek [3].

Obrázek č. 18: E-test. Převzato a upraveno - foto: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.; pracoviště - Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Legenda: Šipka směřuje k místu, kde se odečítá hodnota MIC.

3.7.2. Agarová diluční metoda

Tato metoda nenachází v klinické praxi využití, především z důvodu náročnosti na přípravu půd s různými koncentracemi antimikrobních látek. Jde tedy spíše o metodu referenční, která nachází uplatnění ve výzkumných laboratořích. Je přesnější, lépe se tedy stanovuje inhibice růstu. Petriho misky se vylévají standardním objemem agarové půdy s různou koncentrací antimikrobní látky. Na jednu plotnu se bodově naočkuje jehlovým razidlem 30 – 40 kmenů najednou a po inkubaci se odečítá růst. Plotna, která obsahuje

nejnižší množství antibiotika, tedy tam, kde již není pozorován růst mikroba, představuje MIC [12, 46].

3.7.3. Bujónová diluční metoda

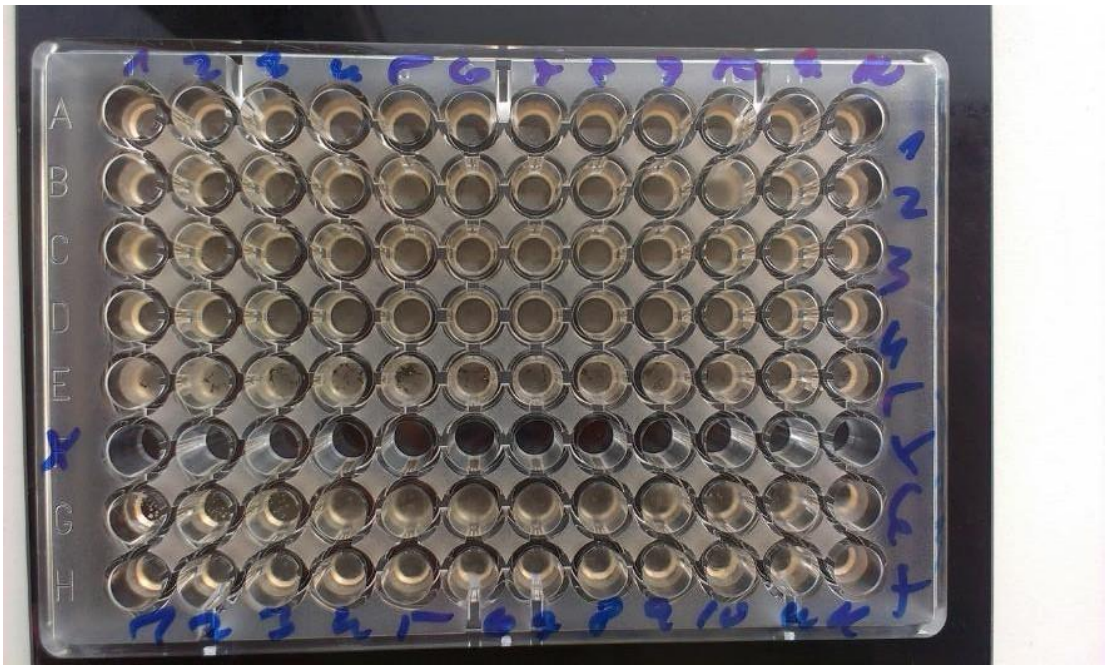
Bujónová diluční metoda umožňuje kvantitativní hodnocení účinnosti antimikrobní látky na testovaný kmen mikroorganismu. Rozlišují se dvě možnosti pracovního postupu, a to makrodiluční bujónový test ve zkumavkách nebo mikrodiluční bujónový test (viz *Obrázek č. 19*), který se provádí v polystyrenových mikrotitračních destičkách s dvanácti sloupci a osmi řádami jamek a který se stal součástí testování v této diplomové práci. Test je nazýván diluční právě proto, že se většinou pro jedno antimykotikum používá k testování osmi koncentrací dosažených dvojnásobným ředěním základního roztoku antimykotika. Dilučním testem lze zjistit hodnotu MIC, která přímo vyjadřuje míru citlivosti, nebo rezistence mikroorganismu vůči testované antimikrobní látce [12].

Doporučené techniky postupu a popis metodiky jsou pro testování citlivosti kvasinek bujónovou metodou vypracovány v dokumentu CLSI M27-A3. Pracovní postup mikrodiluční bujónové metody spočívá v případě roztoků antimikrobní látky v posloupném koncentračním sledu, tzv. dvojkové ředění, dále v přípravě homogenní suspenze testovaného mikroorganismu o vhodné denzitě. Následně jsou mikrotitrační destičky naplněny připravenými roztoky antimikrobní látky a zaočkovány testovanými kmeny mikroorganismů. Pro hodnocení výsledků je také důležité zavedení kontrol, jako je pozitivní kontrola, která je dána jamkou bez antimikrobní látky a slouží jako vzorová jamka značící růst mikroba. Po zaočkování testovaným mikroorganismem se mikrotitrační destička inkubuje v termostatu 48 hodin při 35 °C a odečet výsledků probíhá za 24 hodin a následně za 48 hodin proti kontrole. Hodnocení MIC se provádí vizuálně, tedy pouhým okem, nebo také instrumentálně za pomoci spektrofotometrů. Hodnotu MIC udává první nezakalená jamka, tedy bez viditelného růstu. [46].

U většiny antimykotik, která jsou fungistatická, není však vhodné odečítat citlivost pomocí MIC, která je definována jako 100% inhibice testovaného kmene, a proto jsou běžně v praxi stanovovány hodnoty jako je MIC_{50}, MIC_{80}, MIC_{90} nebo MIC_{95}. Jde o relativní inhibiční parametr růstu, tedy koncentraci antimykotika, která vede k inhibici růstu testovaného mikroorganismu z 50 %, 80 %, 90 %, či 95 % v porovnání s pozitivní kontrolou

růstu (tj. růst testovaného mikroorganismu bez působení antimykotika), a právě tyto hodnoty se hodnotí instrumentálně [46].

Obrázek č. 19: Mikrodiluční bujónová metoda - foto: Barbora Pašková, pracoviště – mykologická laboratoř, Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.



Legenda: Jeden řádek označuje suspenzi testovaného kmene kvasinky nebo vláknité houby a klesající koncentrace testované látky s antimykotickým účinkem, tedy například jamka A1 označuje nejvyšší koncentraci látky a jamka A11 obsahuje nejnižší koncentraci látky. Poslední sloupec K – kontrola růstu mikroba (jamky bez antimykotika); šestý řádek X – prázdné jamky, které oddělují kvasinky (nad prázdným řádkem) a vláknité houby (pod prázdným řádkem), aby nedošlo ke kontaminaci.

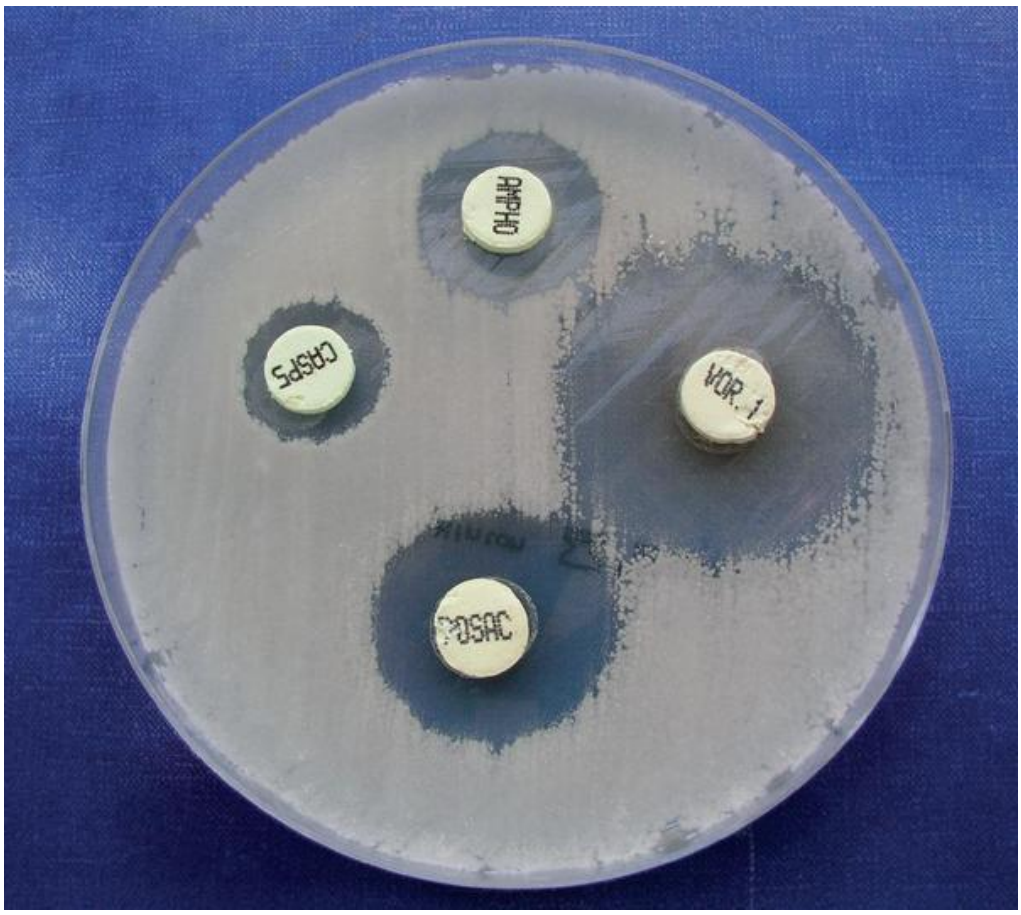
3.7.4. Testování citlivosti mykotických agens vůči antimykotikům pomocí komerčně dostupných souprav

Díky standardizaci referenčních postupů pro testování antimykotické citlivosti kvasinek a vláknitých hub zavedených CLSI a EUCAST došlo k rozvoji několika automatizovaných nebo poloautomatizovaných komerčních systémů, které umožňují jednoduché, flexibilní a cenově dostupné alternativní metody testování citlivosti pro použití v klinické laboratoři [54]. I komerční soupravy lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní.

3.7.4.1. Kvalitativní metody

Komerčně dostupným testem, který se nabízí jako varianta k diskové difúzní metody, je systém Neo-Sensitabs firmy Rosco Diagnostica z Dánska. Rozdíl oproti klasickému diskovému testu spočívá v použití tablet se standardizovaným obsahem antimykotika. (viz *Obrázek č. 20*) Od výrobce dostupné tablety obsahují amfotericin B, flucytosin, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol a kaspofungin. Firma má vypracované postupy, interpretační kritéria a systém kontroly kvality pro rozdílná testovací média. Tato komerčně dostupná metoda je celosvětově respektována a doporučována pro kvalitativní testování citlivosti k antimykotikům u kvasinek i vláknitých mikromycet [3].

Obrázek č. 20: Neo-Sensitabs systém znázorňující citlivost Candida krusei vůči zvoleným antimykotikům. Převzato z [3].

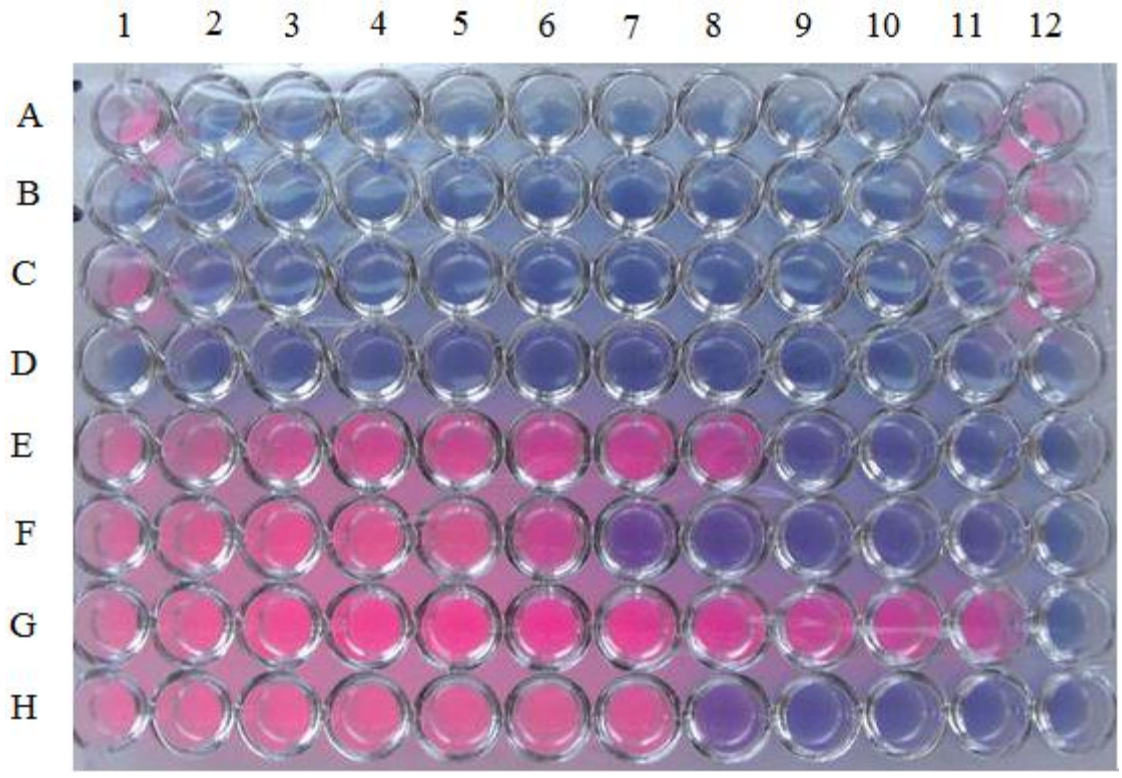


Legenda: AMPHO – tableta napuštěná amfotericinem B, CASP5 – tableta napuštěná kaspofunginem, POSAC – tableta napuštěná posakonazolem, VOR.1 – tableta napuštěná vorikonazolem.

3.7.4.2. Kvantitativní metody

Jedním z komerčně dostupných testů umožňujících kvantitativní hodnocení citlivosti studovaných mykotických agens k antimykotikům je test Sensititre YeastOne (firma TREK Diagnostic Systems z USA) (viz *Obrázek č. 21*). Tato metoda slouží pro rutinní stanovení MIC. Sensititre YeastOne je kolorimetrickým mikrodilučním testem, kde kromě toho, že jamky destičky obsahují antimykotika v ředění odpovídajícím standardu CLSI M27-A3, je v jednotlivých jamkách přítomen i kolorimetrický indikátor „Alamar blue“ ve vysušeném stavu. Rehydratace jak antimykotik, tak i chemického indikátoru, se provádí suspenzí kvasinek ($1{,}5 \times 10^3$ buněk/ ml) ve 100 µl RPMI média s 2% glukózou. Doporučená inkubace je 24 hodin pro kandidy, 72 hodin pro kryptokoky a 48–72 hodin pro aspergily, vždy při 35 °C. Růst mikromycet se projeví barevnou změnou v jamce, tedy dojde k přechodu z původní modré na růžovou barvu. MIC se stanoví jako nejnižší koncentrace antimykotika v jamce s modrým zbarvením. Sensititre YeastOne je jednoduchý, spolehlivý test a také test plně respektující standardní metodiku CLSI. Jeho výhodou je jednoznačnost při odečtu výsledků a jejich mezilaboratorní reprodukovatelnost [3].

Obrázek č. 21: Sensititre Yeast One značící zkříženou rezistenci Candida glabrata k azolovým derivátům. Převzato z [3] *a upraveno.*

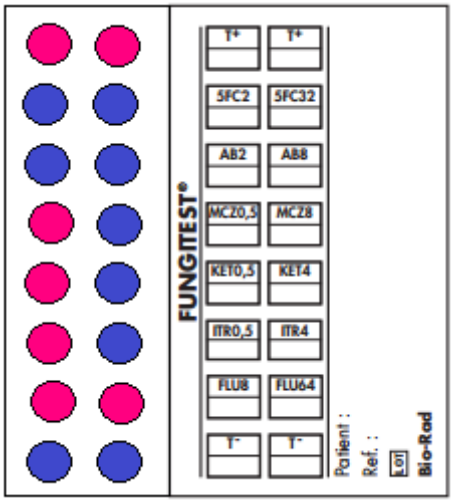


Legenda: Růžová barva - růst kvasinky; modrá barva - nedochází k růstu kvasinky; A1 – pozitivní kontrola; A2-11 – anidulafungin;B1-11 – mikafungin; C1-11 – kaspofungin; D1-11 – flucytosin; E1-11 – posakonazol; F1-11 – vorikonazol; G1-11 – itrakonazol; H1-11 – flukonazol; 12A-H – amfotericin B; odečítá se první jamka, ve které již nedošlo k růstu, tedy například jamka E9, či F7.

Další komerčně dostupná souprava pro kvantitativní hodnocení je souprava firmy Bio-Rad Laboratories z Francie, Fungitest (viz *Obrázek č. 22*). Tato souprava je určená pro semikvantitativní stanovení citlivosti. Hodnocení se provádí pouze ve dvou jamkách obsahujících hraniční koncentrace antimykotik. K dispozici je tedy ve dvou různých koncentracích šest antimykotik (flukonazol, itrakonazol, amfotericin B, ketokonazol, mikonazol a flucytosin). Po naočkování se nechá Fungitest inkubovat 48 hodin při 37 °C, resp. 72 hodin při 32 °C pro kryptokoky. Hodnocení růstu (viz *Obrázek č. 23*) je založeno na redukci barevného indikátoru, který změní médium RPMI 1640 z modré barvy na růžovou. Pokud je růst kvasinky inhibován, jamka zůstane modrá. Do této soupravy jsou začleněné vždy dvě pozitivní (růžové) kontroly růstu a dvě negativní (modré) kontroly růstu. Na základě výsledků odečítaných po kultivaci je pak testovaný izolát zařazen do kategorie citlivý, citlivý v závislosti na dávce, či rezistentní [3, 55].

Obrázek č. 22: Originální mikroplát Fungitestu. Převzato z [56] *a upraveno.*

Obrázek č. 23: Hodnocení růstu kmene Candida krusei po 48 hodinách inkubace. Převzato z [55] *a upraveno.*



Legenda: Růžová barva – růst mikroorganismu; modrá barva – inhibice růstu; 1. řádek – pozitivní kontrola růstu; 2. řádek – kmen je inhibován flucytosinem v koncentraci 2 i 32 µg/ml; 3. řádek – kmen je inhibován amfotericinem B v koncentraci 2 i 8 µg/ml; 4. řádek – kmen je odolný vůči koncentraci 0,5 µg/ml mikonazolu, ale při koncentraci 8µg/ml, již byl růst kmene inhibován; 5. řádek – kmen je odolný vůči koncentraci 0,5 µg/ml ketokonazolu, ale při koncentraci 4 µg/ml, již byl růst kmene inhibován; 6. řádek – kmen je odolný vůči koncentraci 0,5 µg/ml itrakonazolu, ale při koncentraci 4 µg/ml, již byl růst kmene inhibován; 7. řádek – kmen je odolný vůči flukonazolu jak v koncentraci 8 µg/ml, tak v koncentraci 64 µg/ml; 8. řádek – negativní kontrola růstu.

Jiným komerčně dostupným testem pro kvantitativní hodnocení je test ATB Fungus 3 firmy bioMérieux z Francie. I zde je základ tvořen plastikovou mikrodestičkou s antimykotiky v dehydratované podobě a chemickým indikátorem. Po zaočkování testovaným kmenem se po inkubaci provádí buď turbidimetrické, nebo vizuální vyhodnocení. Nevýhodou systému je v případě vizuálního hodnocení nejednoznačnost a také fakt, že tento test disponuje také omezeným spektrem testovaných antimykotik [3]. Další alternativa pro kvantitativní stanovení citlivosti mykotických klinických izolátu vůči antimykotikům spočívá ve využití automatizovaného spektrofotometrického systému VITEK 2 AST-YS, rovněž od francouzské firmy bioMérieux, který slouží také k biochemické identifikaci klinických izolátů. Výsledky lze pomocí tohoto systému odečítat již po 5 hodinách, což je nesporným kladem tohoto testovacího systému [3, 57].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze byla pomocí mikrodiluční bujónové metody určována MIC nových potenciálních antimykotických látek.

4.1. Materiál

4.1.1. Pomůcky

Sterilní mikrotitrační destičky s víčky (firma Gamedium, Jesenice u Prahy), mikropipety (Fisher Scientific s.r.o., Pardubice), sterilní špičky (Fisher Scientific s.r.o., Pardubice), dvanácti jamkový rezervoár na médium (Gamedium, Jesenice u Prahy), sterilní zkumavky (Gamedium, Jesenice u Prahy), stojánky na zkumavky, očkovací kličky (Gamedium, Jesenice u Prahy), Bűrkerovy komůrky (Gamedium, Jesenice u Prahy).

4.1.2. Přístroje

Laminární box (výrobce Esco Class, dodavatel Dynex, Buštěhrad), termostat Binder (Fisher Scientific s.r.o., Pardubice), denzitometr (P-lab, Praha), vortex (P-lab, Praha).

4.1.3. Chemikálie

RPMI 1640, MOPS [3-(N-morfolino) propansulfonová kyselina], glukóza, DMSO (dimethylsulfoxid), NaOH a sterilní voda. Všechny chemikálie jsou dodávány firmou Sigma-Aldrich, Praha; vyjma NaOH (dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové) a sterilní vody, která se připravuje autoklávováním deionizované vody.

4.2. Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub

Candida albicans, zkratka: CA, sbírkový kmen: ATCC 44859 (American testing culture colletion, Americká sbírka typových kultur)

Candida tropicalis, zkratka: CT, sbírkový kmen: 156

Candida krusei, zkratka: CK, sbírkový kmen: E28

Candida glabrata, zkratka: CG, sbírkový kmen: 20/I

Trichosporon asahii, zkratka: TA, sbírkový kmen: 1188

Aspergillus fumigatus, zkratka: AF, sbírkový kmen: 231

Absidia corymbifera, zkratka: AC, sbírkový kmen: 272

Trichophyton mentagrophytes, zkratka: TM, sbírkový kmen: 445

Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859 sice pochází z Americké sbírky typových kultur, ale je poskytován k testování z České sbírky mikroorganismů z brněnské Masarykovy Univerzity, naproti tomu všechny ostatní kmeny byly poskytnuty k testování z Fakultní nemocnice Hradec Králové.

4.3. Metodika

4.3.1. Příprava růstového média

Nejprve byl k 4 dílům MOPS s 2 % glukózy přidán 1 díl RPMI 1640 (např. 80 ml MOPS + 20 ml RPMI podle celkové spotřeby, protože celkový objem připravovaného růstového média vychází z předpokládané spotřeby, resp. z počtu testovaných kmenů). Dále se upravilo pH do rozmezí 6,5 – 7,9 přidáním 10 M roztoku NaOH, aby původně žlutý roztok změnil barvu na oranžovo-červenou.

4.3.2. Příprava suspenzí testovaných kmenů kvasinek a vláknitých hub

Nejprve bylo popsáno 8 sterilních zkumavek zkratkami testovacích kmenů CA, CT, CK, CG, TB, AF, AC, TM (viz. výše) a do každé zkumavky bylo napipetováno po 3 ml sterilní vody.

Z kultury kvasinek narostlých na Sabouraudově glukózovém agaru byla odebrána část kolonie, která byla následně resuspendována ve zkumavce se sterilní vodou. Takto vytvořená

suspenze byla řádně promíchána na vortexu a 12 µl z této suspenze bylo napipetováno do Bűrkerovy komůrky. Hustota suspenze testovaných kvasinek, či vláknitých hub byla určena pozorováním ve světelném mikroskopu při celkovém 200×, či 400× násobném zvětšení. Hustota inokula byla odečtena na základě stanovení počtu buněk ve 100 čtvercích Bűrkerovy komůrky. Hustota inokula vhodná pro testování citlivosti kvasinek by měla být 25-50 buněk v 50 čtvercích.

Taktéž byla z kultury vláknitých hub narostlých na Sabouraudově glukózovém agaru odebrána část konidií a resuspendována ve zkumavce se sterilní vodou. Takto vzniklá suspenze byla řádně promíchána na vortexu a 12 µl suspenze bylo napipetováno do Bűrkerovy komůrky. Hustota inokula byla odečtena na základě stanovení počtu kolonií ve 100 čtvercích při celkovém 200×, či 400× násobném zvětšení. Hustota inokula u vláknitých hub by měla být cca 100 buněk na 100 čtverců.

Takto připravená inokula kvasinek a vláknitých hub by měla vydržet v lednici cca týden.

4.3.3. Příprava dvojkové ředící řady testované látky

Testovaná látka musí být vždy dodána společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti. Zadaná navážka byla rozpuštěna v příslušném objemu DMSO tak, aby první testovaná koncentrace látky byla 500 µmol/l a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1 %. Následně bylo vše ve zkumavce promícháno na vortexu.

Jak již bylo zmíněno, koncentrace DMSO v jamce nesmí přesáhnout 1 %, proto se k růstovému médiu s objemem 1,98 ml přidává při přípravě pracovních roztoků jen 1 % látky rozpuštěné v DMSO. Z tohoto důvodu je třeba připravit látku 100× koncentrovanější, aby první testovaná koncentrace byla 500 µmol/l.

$$V_{DMSO} = \frac{m \cdot 10^6 \text{ (převod na µl)}}{c \cdot M \cdot 100 \text{ (zakoncentrování)}} = x \text{ µl DMSO}$$

Legenda: m – navážka v gramech, c - první testovaná koncentrace (500 µmol/l = 0,0005 mol/l), M - molární hmotnost, µl – mikrolitr, DMSO – dimethylsulfoxid.

Pokud se látka rozpustila nebo se vytvořila homogenní suspenze, přistoupilo se k dalšímu kroku. Jestliže se látka vysrážela nebo se nerozpustila, tak byl přidán druhý nebo třetí ekvivalent rozpouštědla DMSO. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla byla posunuta první testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu, tedy z 500 µmol/l na 250 µmol/l, z 250 µmol/l na 125 µmol/l, atd.

Dále byla použita sterilní zkumavka označená číslem 1, do které bylo napipetováno 1,98 ml růstového média a 20 µl rozpuštěné testované látky. Následně byla zkumavka promíchána na vortexu a bylo zkontrolováno, jestli se látka v růstovém médiu nevysrážela. Pokud se látka nevysrážela, přistoupilo se k dalšímu bodu. Pokud se látka vysrážela, byl přidán druhý nebo třetí ekvivalent růstového média. Tímto postupem získaný pracovní roztok první testované koncentrace byl přemístěn do první jamky dvanácti jamkového rezervoáru.

Do dalších deseti sterilních zkumavek popsaných čísly 2 – 11, byla připravena dvojková ředící řada testované látky v DMSO tak, že do každé zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml DMSO. Do zkumavky označené číslem 2 bylo napipetováno 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO, následně byl roztok promíchán a do další zkumavky s označením číslo 3 bylo přeneseno 0,5 ml, opět byl roztok promíchán a bylo přeneseno 0,5 ml do zkumavky s označením číslo 4, dokud se nedošlo stejným postupem až po zkumavku s označením číslo 11. Takto byla připravena dvojková ředící řada testované látky v DMSO, kdy je testovaná látka v každé následující zkumavce s poloviční koncentrací.

Následně bylo do jamek dvanácti jamkového rezervoáru napipetováno 1,98 ml růstového média a 20 µl naředěné testované látky, tedy ze zkumavky číslo 2 do jamky číslo 2, ze zkumavky číslo 3 do jamky číslo 3 atd., až do jamky číslo 11. Do poslední dvanácté jamky bylo přidáno 20 µl samotného DMSO, který nám sloužil jako tzv. pozitivní kontrola růstu, tj. jamka, kde není přitomna látka, která by mohla inhibovat růst modelového mikroorganismu. V každé jamce rezervoáru jsme získali 2 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky a kontrolu.

4.3.4. Pipetování do mikrotitrační destičky

Pomocí dvanácti kanálové pipety bylo napipetováno po 200 µl příslušné naředěné roztoky testované látky, a to do řádků A, B, C, D, E, G a H (každý řádek má 12 pozic) jedné mikrotitrační destičky (řádek F zůstane prázdný). Stejným způsobem byly napipetovány

roztoky do druhé destičky. V rámci dvou destiček byla tímto způsobem napipetována vždy jedna testovaná látka, kdy v rámci každého sloupce označeného písmenem byla látka vždy o jiné koncentraci.

Do každé jamky řádku A bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Candida albicans*, sbírkový kmen: ATCC 44859. Do každé jamky řádku B bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Candida tropicalis*, sbírkový kmen: 156. Do každé jamky řádku C bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Candida krusei*, sbírkový kmen: E28. Do každé jamky řádku D bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Candida glabrata*, sbírkový kmen: 20/I. Do každé jamky řádku E bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Trichosporon beigelii* , sbírkový kmen: 1188. Do každé jamky řádku G bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Aspergillus fumigatus*, sbírkový kmen: 231. Do každé jamky řádku H bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Absidia corymbifera*, sbírkový kmen: 272. Do každé jamky druhé destičky bylo napipetováno 10 µl připravené suspenze *Trichophyton mentagrophytes*, sbírkový kmen: 445. Následně byla každá mikrotitrační destička přikryta víčkem a inkubována v termostatu při 35 °C. První destička byla inkubována po celkovou dobu 48 hodin (odečet probíhal za 24 hodin a 48 hodin), druhá destička s dermatofytem *Trichophyton mentagrophytes* byla inkubována po celkovou dobu 120 hodin (odečet probíhal za 72 hodin a 120 hodin).

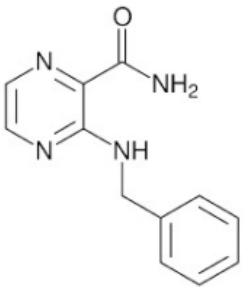
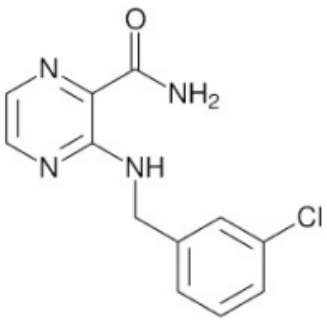
4.3.5. Vyhodnocení

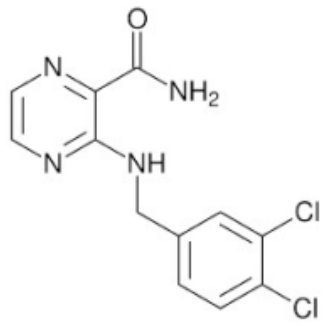
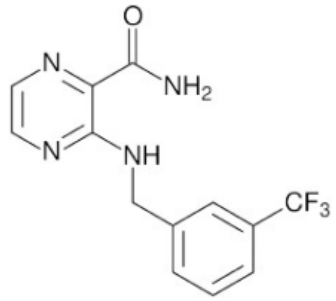
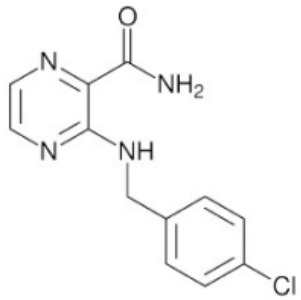
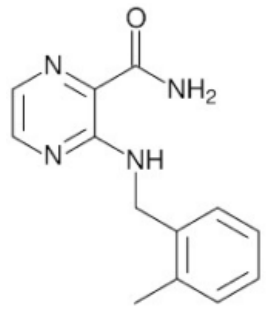
Po uplynutí inkubační doby byl vizuálně hodnocen nárůst ve všech jamkách. V první jamce, ve které již nebyl viditelný růst kvasinky či vláknité houby, byla odečtena hodnota MIC.

4.4. Testované potenciální látky s antimykotickou aktivitou

V této diplomové práci byla hodnocena citlivost mykotických agens k 34 vzorkům testovaných látek s potenciální antimykotickou aktivitou syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D. a Mgr. Ondřej Janďourek). Všechny látky byly testovány ve sledu koncentrací 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488 µmol/l. Sloučeniny byly rozděleny do pěti skupin podle jejich chemické struktury na benzylamino substituované deriváty pyrazin-2-karboxamidu (viz *Tabulka č. 6*), alifatické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (viz *Tabulka č. 7*), cyklické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (viz *Tabulka č. 8*), alifatické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu (viz *Tabulka č. 9*) a cyklické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu (viz *Tabulka č. 10*). Základní strukturu všech testovaných látek tvoří pyrazinové jádro.

Tabulka č. 6: Benzylamino substituované deriváty pyrazin-2-karboxamidu
(pokračování tabulky na straně č. 57)

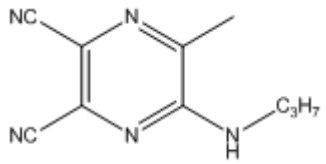
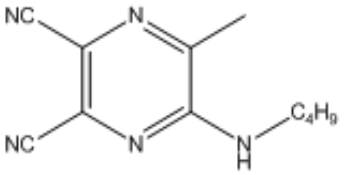
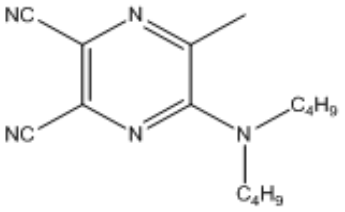
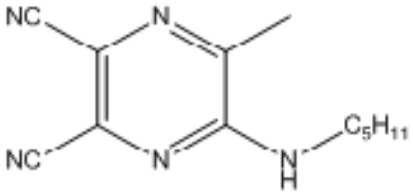
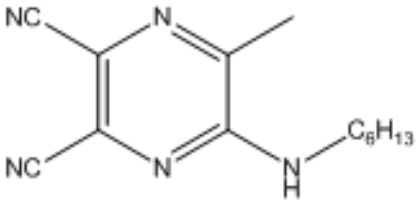
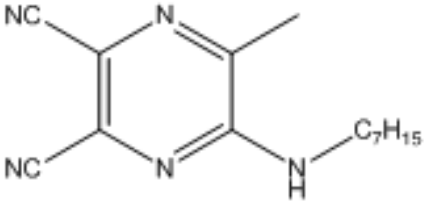
Kód vzorku	Chemický vzorec	Název struktury	Navážka / mol. hmot.
MD 677/II		3-(benzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	8,9 mg / 228,25
MD 678/II		3-(3-chlorbenzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	10,4 mg / 262,69

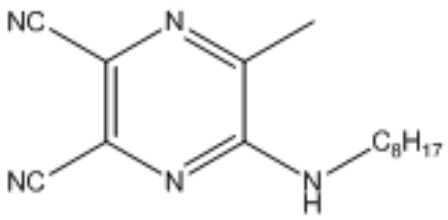
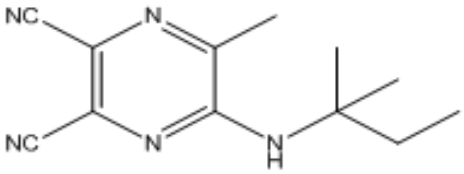
MD 679/II		3-(3,4-dichlorbenzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	12,0 mg / 298,14
MD 680/II		3-(3-trifluormethanbenzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	12,2 mg / 297,14
MD 681/II		3-(4-chlorbenzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	10,5 mg / 262,69
MD 682/II		3-(2-methylbenzylamin)-pyrazin-2-karboxamid	9,6 mg / 242,28

Legenda: mol. hmot. – molekulová hmotnost, mg – miligram

Tabulka č. 7: Alifatické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

(pokračování tabulky na straně č. 59)

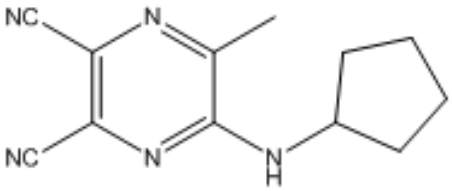
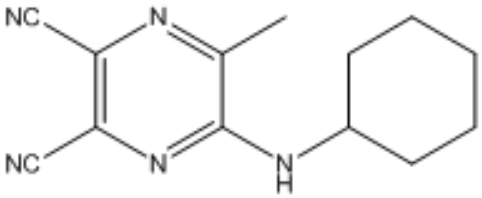
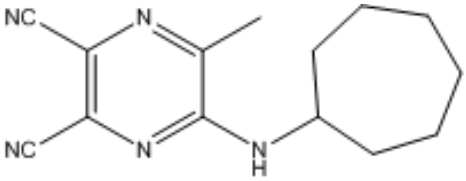
Kód vzorku	Chemický vzorec	Název struktury	Navážka / mol. hmot.
OJ 82		5-methyl-6-(propylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	8,2 mg / 201,23
OJ 83		5-(butylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	8,6 mg / 215,25
OJ 84		5-(dibutylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	10,9 mg / 271,36
OJ 85		5-methyl-6-(pentylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	9,4 mg / 229,28
OJ 87		5-(hexylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	10,0 mg / 243,31
OJ 89		5-(heptylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	10,4 mg / 257,33

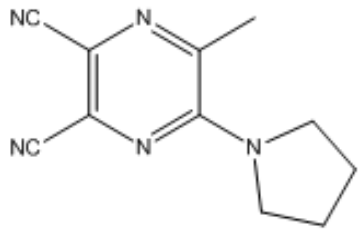
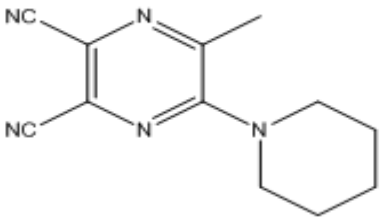
OJ 91		5-methyl-6-(oktylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	11,3 mg / 271,36
OJ 92		5-methyl-6-(*terc*-pentylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	9,3 mg / 229,28

Legenda: mol. hmot. – molekulová hmotnost, mg – miligram

Tabulka č. 8: Cyklické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

(pokračování tabulky na straně č. 60)

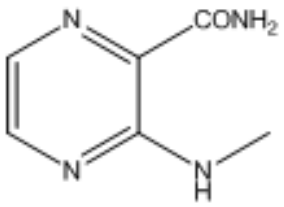
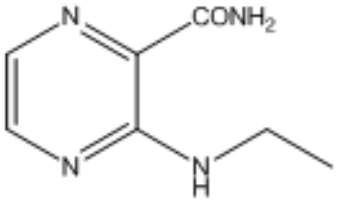
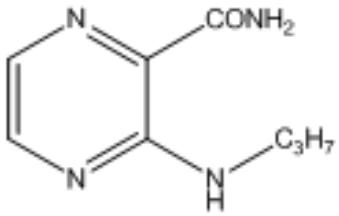
Kód vzorku	**Chemický vzorec**	**Název struktury**	**Navážka / mol. hmot.**
OJ 86		5-(cyklopentylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	9,4 mg / 227,27
OJ 88		5-(cyklohexylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	9,9 mg / 241,29
OJ 90		5-(cykloheptylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	10,1 mg / 255,32

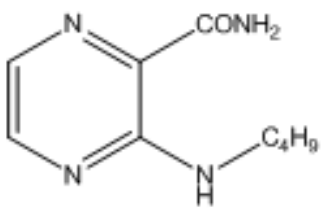
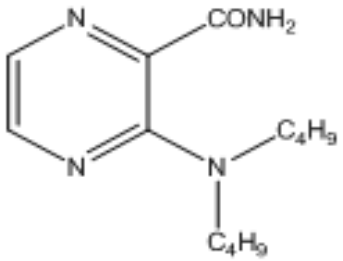
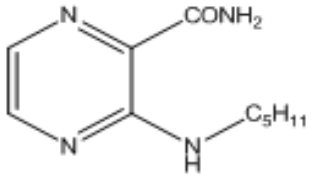
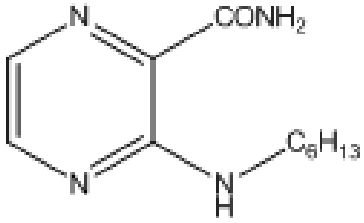
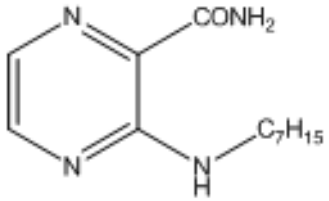
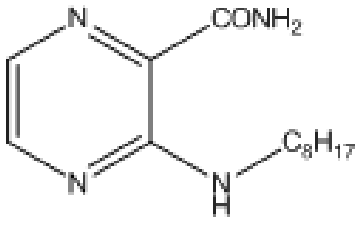
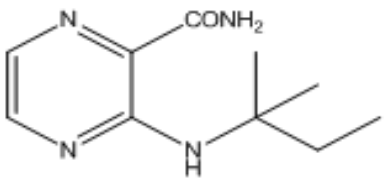
OJ 93		5-methyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	8,6 mg / 213,24
OJ 94		5-methyl-6-(piperidin-1-yl)-pyrazin-2,3-dikarbonitril	9,0 mg / 227,27

Legenda: mol. hmot. – molekulová hmotnost, mg – miligram

Tabulka č. 9: Alifatické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu

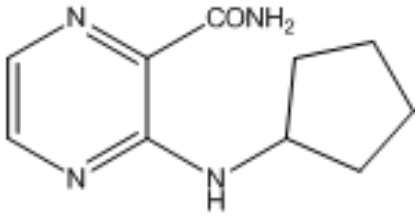
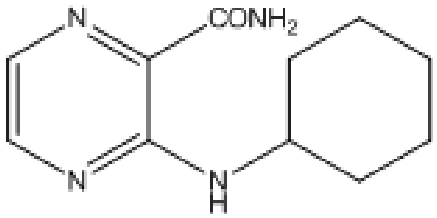
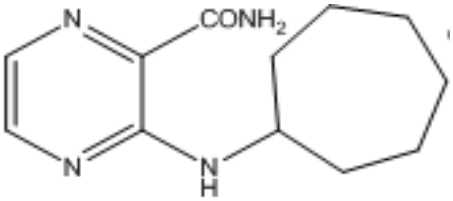
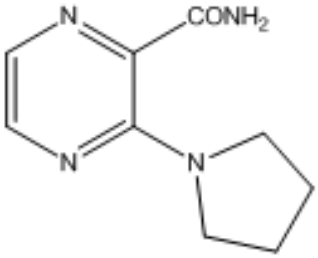
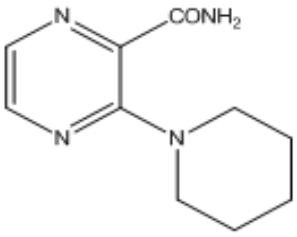
(pokračování tabulky na straně č. 61)

Kód vzorku	Chemický vzorec	Název struktury	Navážka / mol. hmot.
OJ 95		3-(methylamino)-pyrazin-2-karboxamid	6,0 mg / 152,15
OJ 96		3-(ethylamino)-pyrazin-2-karboxamid	6,7 mg / 166,18
OJ 97		3-(propylamino)-pyrazin-2-karboxamid	7,2 mg / 180,21

OJ 98		3-(butylamino)-pyrazin-2-karboxamid	7,8 mg / 194,23
OJ 99		3-(dibutylamino)-pyrazin-2-karboxamid	10,1 mg / 250,34
OJ 100		3-(pentylamino)-pyrazin-2-karboxamid	8,3 mg / 208,26
OJ 102		3-(hexylamino)-pyrazin-2-karboxamid	9,1 mg / 222,29
OJ 104		3-(heptylamino)-pyrazin-2-karboxamid	9,5 mg / 236,31
OJ 106		3-(oktylamino)-pyrazin-2-karboxamid	10,1 mg / 250,34
OJ 107		3-(*terc*-pentylamino)-pyrazin-2-karboxamid	8,3 mg / 208,26

Legenda: mol. hmot. – molekulová hmotnost, mg – miligram

Tabulka č. 10: Cyklické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu

Kód vzorku	Chemický vzorec	Název struktury	Navážka / mol. hmot.
OJ 101		3-(cyklopentylamino)-pyrazin-2-karboxamid	8,4 mg / 206,24
OJ 103		3-(cyklohexylamino)-pyrazin-2-karboxamid	9,0 mg / 220,27
OJ 105		3-(cycloheptylamino)-pyrazin-2-karboxamid	9,4 mg / 234,30
OJ 108		3-(pyrrolidin-1-yl)-pyrazin-2-karboxamid	7,9 mg / 192,22
OJ 109		2-(piperidin-1-yl)-pyrazin-2-karboxamid	8,4 mg / 206,24

Legenda: mol. hmot. – molekulová hmotnost, mg – miligram

5. VÝSLEDKY

Výsledky testování souboru 34 vzorků jsou zobrazeny od *Tabulky č. 11* až po *Tabulku č. 16*, a v *Grafu č. 1* je znázorněn počet látek inhibující růst kvasinek, či vláknitých hub v závislosti na době inkubace. Znaménko „>" u čísla v tabulkách určuje, že v této nejvyšší koncentraci není stále látka dostatečně účinná tak, aby zabránila růstu v takovém rozsahu, že při vizuálním hodnocení není vidět zákal, či sedlina. Tedy v tom případě by se pro určení hodnoty MIC testované látky musely připravit roztoky testovaných látek o vyšších koncentracích, než je koncentrace 500 μmol/l . Tučně jsou pak znázorněny odečtené hodnoty MIC, při kterých došlo k zastavení růstu kvasinek nebo vláknitých hub, tedy se hodnotily jamky, které byly bez zákalu (čiré).

Z níže uvedených šesti látek (viz *Tabulka č. 11*), uvedených pod kódy MD677, MD678, MD679, MD680, MD681 a MD682, nebyla prokázána u žádné testované látky antimykotická aktivita a to ani po 24 hodinové, ani po prodloužené 48 hodinové inkubaci (resp. ani po 72 hodinové, ani po prodloužené 120 hodinové inkubaci).

Tabulka č. 11: Výsledky testování skupiny benzylamino substituovaných derivátů pyrazin-2-karboxamidu

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (μmol/l)					
Zkratka / doba inkubace		**MD677**	**MD678**	**MD679**	**MD680**	**MD681**	**MD682**
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, μmol/l – mikromol na litr.

U skupiny testovaných látek, uvedených pod kódy OJ82, OJ83, OJ84, OJ85, OJ87, OJ89, OJ91 a OJ92 (viz *Tabulka č. 12*) vykázaly antimykotickou aktivitu pouze čtyři z nich. Látka OJ83, která zastavila růst kmene TA po 24 hodinách inkubace, však po prodloužené době už nedokázala růst kvasinky zastavit, ale naproti tomu, dokázala zastavit růst kmene TM, u kterého byla stanovena MIC 250 µmol/l po 72 hodinách inkubace a po prodloužené době 120 hodin inkubace byla stanovena MIC 500 µmol/l. Látka OJ84 zastavila sice jen růst kmene TM, ale hodnota MIC byla stanovena u nižší koncentrace než v předchozím případě, a to 125 µmol/l i po celkové době inkubace 120 hodin. Shodný účinek projevily sloučeniny OJ85 a OJ92, které prokázaly minimální antimykotickou aktivitu u kmene TA a TM, k OJ92 byl citlivý navíc ještě kmen AC.

Tabulka č. 12: Výsledky testování skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (µmol/l)							
Zkratka / doba inkubace		**OJ82**	**OJ83**	**OJ84**	**OJ85**	**OJ87**	**OJ89**	**OJ91**	**OJ92**
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	**500**	>500	**500**	>500	>500	>500	**500**
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	**500**
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	**250**	**125**	**250**	>500	>500	>500	**250**
	120h	>500	**500**	**125**	**500**	>500	>500	>500	**500**

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus

fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, µmol/l – mikromol na litr.

Z pěti látek cyklických aminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (viz *Tabulka č. 13*) uvedených pod kódy OJ86, OJ88, OJ90, OJ93, OJ94 vykázala jen minimální antimykotickou aktivitu látka OJ93 u kmene TM, u kterého byla stanovena hodnota MIC 500 µmol/l, jak po 72 hodinách, tak po 120 hodinách inkubace.

Tabulka č. 13: Výsledky testování skupiny cyklických aminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (µmol/l)						
Zkratka / doba inkubace		**OJ86**	**OJ88**	**OJ90**	**OJ93**	**OJ94**		
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TM	72h	>500	>500	>500	**500**	>500		
	120h	>500	>500	>500	**500**	>500		

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272;

TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, µmol/l – mikromol na litr.

Z deseti látek nejpočetnější skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu uvedených pod kódy OJ95, OJ96, OJ97, OJ98, OJ99, OJ100, OJ102, OJ104, OJ106, OJ107 (viz *Tabulka č. 14, č. 15*) zastavilo růst kvasinek a vláknitých hub pět testovaných látek. Antimykotickou aktivitu vykázaly látky OJ98, OJ100, OJ102 , OJ104 a OJ107, přičemž poslední tři jmenované inhibovaly růst pouze u kmene TM. Látka OJ98 inhibovala růst kmenů CK a CG po 24 hodinové inkubaci, u kmenů AF a TM inhibovala růst i po prodloužené době inkubace. Zbývá poslední látka, která vykázala antimykotický účinek proti více kmenům, a to OJ100, která inhibovala růst kmenů CA, CK, CG, TA, AF a TM.

Tabulka č. 14: Výsledky testování skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (µmol/l)						
Zkratka / doba inkubace		**OJ95**	**OJ96**	**OJ97**	**OJ98**	**OJ99**		
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CK	24h	>500	>500	>500	**250**	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CG	24h	>500	>500	>500	**500**	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
AF	24h	>500	>500	>500	**500**	>500		
	48h	>500	>500	>500	**500**	>500		
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TM	72h	>500	>500	>500	**500**	>500		
	120h	>500	>500	>500	**500**	>500		

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus

fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, µmol/l – mikromol na litr.

Tabulka č. 15: Výsledky testování skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu (pokračování)

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (µmol/l)						
Zkratka / doba inkubace		**OJ100**	**OJ102**	**OJ104**	**OJ106**	**OJ107**		
CA	24h	**500**	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CK	24h	**250**	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
CG	24h	**500**	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TA	24h	**250**	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
AF	24h	**500**	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>500		
	48h	>500	>500	>500	>500	>500		
TM	72h	**500**	**250**	**250**	>500	**500**		
	120h	**500**	**500**	**250**	>500	>500		

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, µmol/l – mikromol na litr.

Poslední skupina pěti cyklických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu, uvedených pod kódy OJ101, OJ103,OJ 105,OJ108 a OJ109 (viz *Tabulka č. 16*), se projevila jako nejvíce antimykoticky účinná ze všech skupin. Ke všem osmi kmenům kvasinek a vláknitých hub vykazovaly aktivitu dvě sloučeniny (OJ103, OJ105), přičemž hodnoty MIC se pohybovaly od 7,81 µmol/l až po 500 µmol/l. Nejnižší hodnotu MIC, tedy 7, 81 µmol/l vykázala látka OJ105 vůči CK a CG po 24 hodinách, u AF dokonce i po 48 hodinách inkubace.

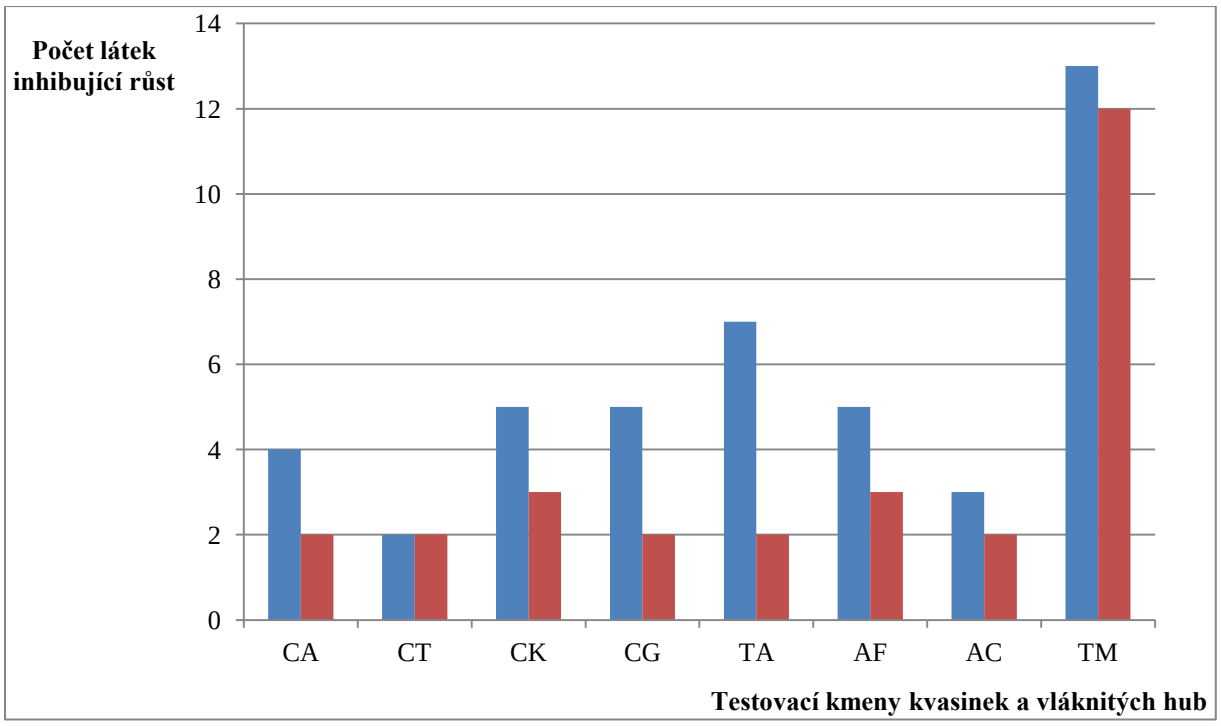
Tabulka č. 16: Výsledky testování skupiny cyklických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC** (µmol/l)						
Zkratka / doba inkubace		**OJ101**	**OJ103**	**OJ105**	**OJ108**	**OJ109**		
CA	24h	**500**	**31,25**	**15,62**	>500	>500		
	48h	>500	**62,5**	**31,25**	>500	>500		
CT	24h	>500	**125**	**62,5**	>500	>500		
	48h	>500	**500**	**500**	>500	>500		
CK	24h	**250**	**15,62**	**7,81**	>500	>500		
	48h	**500**	**62,5**	**31,25**	>500	>500		
CG	24h	**250**	**15,62**	**7,81**	>500	>500		
	48h	>500	**31,25**	**15,62**	>500	>500		
TA	24h	**500**	**31,25**	**31,25**	>500	>500		
	48h	>500	**250**	**125**	>500	>500		
AF	24h	**500**	**15,62**	**7,81**	>500	>500		
	48h	>500	**62,5**	**7,81**	>500	>500		
AC	24h	>500	**250**	**62,5**	>500	>500		
	48h	>500	**500**	**250**	>500	>500		
TM	72h	**500**	**15,62**	**15,62**	>500	>500		
	120h	**500**	**15,62**	**15,62**	>500	>500		

Legenda: CA - Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; CT - Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace, µmol/l – mikromol na litr.

Jak je patrné z *Grafu č. 1*, který uvádí množství účinných látek, tedy těch, které dokázaly inhibovat růst mykotických agens po 24 hodinách (resp. 72 hodinách u *Trichophyton mentagrophytes*) a dále po 48 hodinách (resp. 120 hodinách u *Trichophyton mentagrophytes*), tak z celkového počtu 34 kandidátních látek vykázalo 13 látek antimykotickou aktivitu.

Graf č. 1: Celkové zhodnocení výsledků testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub vůči testovaným látkám s možným antimykotickým účinkem



Legenda: Modrá barva – počet sloučenin vykazující antimykotický účinek po 24 hodinách (resp. 72 hodinách) inkubace; červená barva – počet sloučenin vykazující antimykotický účinek po 48 hodinách (resp. 120 hodinách) inkubace.

Osa x značí použité testovací kmeny: CA – Candida albicans, sbírkový kmen: ATCC 44859; Candida tropicalis, sbírkový kmen: 156; CK - Candida krusei, sbírkový kmen: E28; CG - Candida glabrata, sbírkový kmen: 20/I; TA - Trichosporon asahii, sbírkový kmen: 1188; AF - Aspergillus fumigatus, sbírkový kmen: 231; AC - Absidia corymbifera, sbírkový kmen: 272; TM - Trichophyton mentagrophytes, sbírkový kmen: 445.

Osa y značí počet látek, které dokázaly inhibovat růst kvasinek nebo vláknitých hub buď po 24 hodinách, nebo po 48 hodinách inkubace.

6. DISKUZE

Antimykotická rezistence byla uznána jako důležitý klinický problém po rozšiřujícím se používání antimykotik, protože stále roste počet invazivních mykotických infekcí. Z tohoto důvodu byla vyvolána potřeba reprodukovatelného a klinicky relevantního testování antimykotické citlivosti [58]. Právě rezistence je jedním z důvodů potřeby vývoje nových antimykotických léčiv.

Metody pro určení citlivosti mikroskopických hub k antimykotikům *in vitro* mohou sloužit v běžné laboratorní praxi k detekci rezistentních kmenů v populacích mikromycet, k odhalení rozvíjející se rezistence těchto mikroorganismů během antimikrobní terapie, ale také mohou sloužit jako skrínink za účelem vyhledávání nově syntetizovaných, kandidátních antimykotik [3].

Cílem této diplomové práce bylo určit účinnost 34 testovaných vzorků potenciálních antimykotických léčiv vůči mykotickým agens. Testované sloučeniny byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové primárně jako potenciální antituberkulotika, která se na této fakultě syntetizují již desítky let. Hlavní strukturu všech sloučenin tvoří pyrazinový kruh a právě sloučeniny s pyrazinovým kruhem vykazují řadu biologických účinků a některé z nich se používají i jako léčiva. Příkladem takového léčiva je právě antituberkulotikum 1. linie pyrazinamid, jehož modifikace se stala koncem 50. let dvacátého století nosným programem pro vývoj nových a účinnějších léčiv, než je stále v praxi využívaný pyrazinamid [59, 60].

Na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv se navrhují sloučeniny pomocí tzv. „dockingu“. Aby bylo léčivo biologicky aktivní, hledí se na Lipinského pravidlo pěti [61], avšak v současné době se podmínky ještě více zpřísnily a začíná se dodržovat „pravidlo tří“, které lze vidět jako příklad u všech našich sloučenin, že molekulová hmotnost testovaných látek není vyšší než 300. Syntetizované látky jsou doplňkově testovány na antimykotické a antibakteriální účinky. Antimykotické účinky jsou zjišťovány na osmi kmenech kvasinek a vláknitých hub (*Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida glabrata, Trichosporon asahii, Aspergillus fumigatus, Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*).

Podle chemické struktury byly rozděleny testované sloučeniny do pěti skupin na benzylamino substituované deriváty pyrazin-2-karboxamidu, alifatické aminoderiváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, cyklické aminoderiváty aminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu, alifatické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu a cyklické aminoderiváty pyrazin-2-karboxamidu.

Testované látky z první skupiny, tedy benzylamino substituovaných derivátů pyrazin-2-karboxamidu, byly syntetizovány v roce 2013 v rámci diplomové práce jako potenciální antituberkulotika [62]. Stejně jak zmiňuje autor práce, jejíž součástí bylo i vyhodnocení biologické aktivity syntetizovaných sloučenin, tak i z našeho skríninku nebyla pozorována žádná antimykotická aktivita. Je tedy zřejmé, že substituce benzylaminem není vhodná pro vývoj nových antimykotik, ale z jiného úhlu pohledu lze říci, že negativní výsledek pro antimykotický účinek může znamenat, že by tyto deriváty mohly mít specifický antimykobakteriální účinek.

Skupina pyrazin-2,3-dikarbonitrilů by měla nejvíce vykazovat antimykotický účinek [8, 9], ale v našem testování vykazovaly látky ze skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu minimální antimykotický účinek. Pouze k 4 sloučeninám (OJ83, OJ84, OJ85, OJ92) byly citlivé kmeny TA, AC a TM. I k cyklickým aminoderivátům pyrazin-2,3-dikarbonitrilu byl citlivý pouze kmen TM u sloučeniny OJ93, kde byla účinná koncentrace 500 μmol/l jak po 72 hodinách, tak po 120 hodinách inkubace. Z výsledků tedy vyplývá, že jak substituce alkyly, tak cyklickými zbytky na pyrazin-2,3-dikarbonitrilu není vhodná pro antimykotický účinek.

Ze čtvrté skupiny alifatických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu vykazovala sloučenina OJ98 účinnost proti CK a CG pouze ve vysoké koncentraci po 24 hodinách. Kmeny AF a TM byly ke sloučenině OJ98 citlivé i po 48 hodinách, resp. 120 hodinách. Dalšími sloučeninami, které prokázaly alespoň minimální antimykotickou aktivitu, byly OJ100, OJ104 a OJ107. U daných sloučenin, které vykázaly antimykotickou aktivitu, je patrný rozdíl v jejich chemické struktuře, a proto nelze říci, zda má nějaký vliv na účinek těchto látek zvětšující, resp. zmenšující se molekula alkylu, nebo také jeho rozvětvení.

Největší antimykotickou aktivitu vykazovaly sloučeniny ze skupiny cyklických aminoderivátů pyrazin-2-karboxamidu. K OJ101 byly citlivé kmeny CA, CK, CG, TA, AF a TM v koncentraci 250 μmol/l a 500 μmol/l. Všechny kmeny byly citlivé ke sloučeninám OJ103 a OJ105 vykazovaly aktivitu, která by mohla znamenat, že se tyto sloučeniny dostanou

do dalšího zkoumání a testování. Aby se ale tyto látky staly skutečnými antimykotickými léčivy, trvalo by ještě spousty let, než by se potvrdilo, že jsou nejen účinné, ale i bezpečné pro podání člověku. Jelikož látky OJ101, OJ103 a OJ105 vykazovaly antimykotický účinek a zbylé dvě látky OJ108 a OJ109 nikoli, je pravděpodobné, že na vznikající antimykotický účinek by mohla mít vliv přítomnost cyklického zbytku, protože u dvou zmíněných, které účinek nevykázaly, zahrnuje jejich struktura napojení na pyrazinový kruh přes dusík, tedy cyklické zbytky zahrnující dusík (v tomto případě pyrrolidin a piperidin) zabraňují pravděpodobně antimykotickému účinku.

Je velmi pravděpodobné, že většina testovaných látek, které dokázaly inhibovat růst mykotických agens, je fungistatických, stejně jako je tomu u většiny antimykotik, protože po 24 hodinách (resp. 72 hodinách) inkubace dokázaly testované látky růst kvasinek, resp. vláknitých hub inhibovat, ale po 48 hodinách (resp. 120 hodinách) inkubace již nebyla stejná koncentrace látky účinná a nedokázala růst zastavit.

V závěru diskuze lze říci, že z 34 testovaných možných kandidátů na nové potenciální antimykotické látky zůstalo pouze 13 látek k dalšímu možnému testování. Nelze však vyloučit ani riziko vzniku chyb při testování v laboratoři, například při sebemenším vyrušení nebo ztrátě pozornosti při inokulaci patogenních kmenů kvasinek a vláknitých hub do jamek mohlo dojít k přeskočení jedné jamky, a tím k vyhodnocení falešně pozitivních výsledků, protože jamka byla bez patogenní houby. Dále mohlo při práci v laboratoři dojít ke kontaminaci při zapomenutí výměny sterilní špičky při pipetování nebo při nešikovném zacházení s mikrotitrační destičkou či pipetami, nebo také při hodnocení mohlo dojít ke špatnému odečtu výsledků. Dle mého názoru, je více než žádoucí, aby na základě těchto možných chyb došlo k opakovanému testování a potvrdily se tak slibné výsledky.

7. ZÁVĚR

Celkem bylo otestováno pomocí mikrodiluční bujónové metody 34 vzorků potenciálních antimykotických látek syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

Testované látky byly rozděleny do pěti skupin podle jejich chemické struktury, přičemž základní skelet všech látek tvoří pyrazinový kruh.

Z 34 kandidátů vykázalo antimykotickou aktivitu 13 látek, a to OJ83, OJ84, OJ85, OJ92, OJ93, OJ98, OJ100, OJ101, OJ102, OJ103, OJ104, OJ105 a OJ107.

Nejcitlivějším kmenem k testovaným látkám byl *Trichophyton mentagrophytes*, a naopak nejvíce rezistentními byly kmeny *Candida tropicalis* a *Absidia corymbifera.*

Tato práce přispěla svými výsledky k dalšímu možnému testování sloučenin s antimykotickým účinkem. Aby však mohly tyto sloučeniny najít uplatnění v klinické praxi, bylo by zapotřebí ještě řady testů a klinických studií, aby mohlo být léčivo bezpečně podáno člověku.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Praktické lékárenství*. 2010, 6 (4): 182-186.

[2] KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Oxford Journals. Clinical Infectious Diseases.* 2008, 46: 120-128.

[3] MALLÁTOVÁ, N., HAMAL, P., KOCMANOVÁ, I., BUCHTA, V., MENCL, K. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům in vitro u imunosuprimovaných pacientů - doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Postgraduální medicína*. 2011, 5: 51-65.

[4] BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-565-5.

[5] GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews*. 1999, 12(3): 454-500.

[6] ELLIS, D. H. An introduction to medical mycology [online]. [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/downloads/Mycology_Intro.pdf

[7] RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. L., BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews.* 2000, 13 (2): 236-301.

[8] Stavba buňky [online]. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: http://www.gymh.cz/vyuka/biologie/prehledy/1uvo_2_bunka.pdf

[9] GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B., PEUTHERER, S. F. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Grada Publishing, 1999. ISBN 80-7169-365-0.

[10] KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R. M. *Medical microbiology*. 10th German Edition. Stuttgart: Thieme, 2005. ISBN 3-13-131991-7.

[11] HRDINA, R. Studijní materiály k přednáškám z Farmakologie. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013/2014.

[12] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.

[13] ELLIS, D. Clinical groupings for fungal infections – Mycology Online [online]. [cit. 2015-02-15]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/

[14] COWEN, L. E., KOHN, L. M., ANDERSON, J. B. Divergence in fitness and evolution of drug resistence in experimental populations of Candida albicans. *American Society for Microbiology. Journal of Bacteriology.* 2001, 183: 2971-2978.

[15] VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. 2012, 713687.

[16] BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠŤÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M., DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Medicína pro praxi*. 2009, 6 (3): 155-164. Převzato z: *Klinická farmakologie a farmacie.* 2008, 22 (2):72-75.

[17] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Druhé doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.

[18] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie.* Druhé české vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0836-1.

[19] SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2011, 75 (2): 213-267.

[20] RUSSELL, E. L. Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.php

[21] DOHNAL, V., JEŽKOVÁ, A., SKLÁDANKA, J. Ergosterol. [online]. [cit. 2014-10-08]. Dostupné z: http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/administrace/clankyfile/20120504145335154666.pdf

[22] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.

[23] Ionofory. [online]. [cit. 2015-03-06]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/ionofory.html

[24] DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékárenství*. 2006, 1: 25–29.

[25] HABER, J. Amphotericinum B. *Remedia.* 1994, 4 (5): 274–283. Převzato z: HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Praktické lékárenství*. 2010, 6 (4): 182-186.

[26] ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: New targets for antifungal agents. *Oxford Journals, Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999, 44 (2): 151-162.

[27] MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2006, 32 (5): 449-460.

[28] RUSSELL, E. L. Amphotericin B – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Ampho_Deoxycholate.php

[29] RUSSELL, E. L. Nystatin – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Nystatin_liposomal.php

[30] ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2008, 22 (2): 40-44.

[31] Clotrimazole – Drugs. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.drugs.com/pro/clotrimazole-betamethasone-cream.html

[32] RUSSELL, E. L. Fluconazole – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Fluconazole.php

[33] WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews.* 1998, 11 (2): 382–402.

[34] HABER, J. Nová antimykotika – jaká jsou a co přinášejí. *Remedia*. 2005, 5 (3): 247-258.

[35] RUSSELL, E. L. Terbinafine – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Terbinafine.php

[36] RUSSELL, E. L. Amorolfine – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Amorolfine.php

[37] SHARON, C. A. C., SORRELL, T. C. Antifungal agents. *The Medical Journal of Australia.* 2007, 187 (7): 404-409.

[38] RUSSELL, E. L. Flucytosine – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Flucytosine.php

[39] HABER, J. Echinokandiny – nová skupina antimykotik. *Remedia*. 2008, 7 (4): 297-309.

[40] RUSSELL, E. L. Caspofungin - Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/Caspofungin.php

[41] RUSSELL, E. L. Griseofulvin – Doctor Fungus. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thedrugs/griseofulvin.php

[42] SUBISSI, A., MONTI, D., TOGNI G., MAILLAND, F. Ciclopirox. *Drugs.* 2012, 70 (16): 2133-2152.

[43] Ciclopirox. [online]. [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/usp28nf23s0_m17620.htm

[44] HENDRYCHOVÁ, T., MALÝ, J. Volně prodejná antimykotika. *Praktické lékárenství*. 2011, 7 (3): 132-137.

[45] CANNON, R. D., LAMPING, E., HOLMES, A. R., NIIMI, K., BARET, P. V., KENIYA, M. V. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 2009, 22: 291–321. Převzato z: PRASAD, R., RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in Pharmacology.* 2014, 5: 202.

[46] JÍLEK, P., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., FŐRSTL, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.

[47] PHALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 2012, 125 (1): S3-S13.

[48] EUCAST. [online]. [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: www.eucast.org

[49] EUCAST dokumenty – Státní zdravotní ústav. [online]. [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: http://www.szu.cz/eucast-dokumenty

[50] Tabulky breakpointů EUCAST – Státní zdravotní ústav. [online]. [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast

[51] Clinical resistance and clinical breakpoints – The Swedish reference group for antibiotik. [online]. [cit. 2014-10-26]. Dostupné z: http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm

[52] Diskový difúzní test. [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/disktest/disktest.htm

[53] MARTINS, R. S., PÉREIRA E. S. Jr, LIMA, S. M., SENNA M. I., MESQUITA, R. A., SANTOS, V. R. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patiens with oral candidiasis. *Journal of Oral Sciences.* 2002, 44 (1): 41-48. Převzato z: SANTOS, V. R. Propolis: Alternative Medicine for the Treatment of Oral Microbial Diseases. *InTech.* 2012, 7: 133-169.

[54] CUENCA-ESTRELLA, M., GOMEZ-LOPEZ, A., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., BERNAL-MARTINEZ, L., CUESTA, I., BUITRAGO, M. J., RODRUGUEZ-TUDELA, J. L. Comperison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility Systém with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSL) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for In Vitro Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2010, 48(5): 1782 – 1786.

[55] Fungitest. [online]. [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biorad%20diagnostics%20pasteur/pdf/60780.pdf

[56] Fungitest – Bio-Rad Laboratories. [online]. [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/en-uk/product/fungitest-kit

[57] VITEK 2 – bioMérieux. [online]. [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-2

[58] PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012, 50 (9): 2846–2856.

[59] DOLEŽAL, M. Léčiva na bázi pyrazinu. *Praktické lékárenství.* 2005, 1: 16-17.

[60] DOLEŽAL, M. Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chemické Listy.* 2006, 100 (1): 959-966.

[61] LEESON, P. Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature.* 2012, 481 (7382): 455-456.

[62] TAUCHMAN, M. *Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika II*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.