

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## Diplomová práce

### ***In vitro* screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin III**

Bc. Aneta Janků

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové dne 13. 5. 2020

Podpis:

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, milý přístup a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat paní Idě Dufkové za praktickou výpomoc s experimentální částí práce. Poděkování také patří mé rodině a všem mým blízkým, kteří mi byli po celou dobu studia oporou.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Kandidát: Bc. Aneta Janků

Školitel: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

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

**Klíčová slova:** kvasinky, vláknité houby, antimykotika, mechanismus účinku polyenů, mikrodiluční bujonová metoda, MIC – minimální inhibiční koncentrace.

Hlavním tématem této diplomové práce je *in vitro* screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin.

Úvodní kapitola v teoretické části práce je věnována epidemiologii mykotických infekcí. Dále je uvedena klasifikace mikromycet a charakteristika eukaryotické buňky hub, zejména pak složení plazmatické membrány a buněčné stěny. Samostatná kapitola se také zabývá konkrétními kmeny hub a nemocemi, které způsobují. Stěžejním tématem jsou léčiva ze skupiny antimykotik, kde je zaměřena větší pozornost na polyenová antimykotika, jejich podrobný mechanismus účinku a vznik rezistence. Nedílnou součástí jsou i fáze vývoje nových léčiv a seznam nově vyvíjených antimykotik. Závěrečná kapitola popisuje typy metod určených k *in vitro* hodnocení antimikrobiální aktivity sloučenin.

Experimentální část se věnuje testování nově syntetizovaných sloučenin s potencionální antimykotickou aktivitou. K hodnocení byla použita kvantitativní mikrodiluční bujonová metoda, která je jednou z nejzákladnějších metod testování antimikrobiální citlivosti. V závěru práce jsou uvedeny výsledky a celkové zhodnocení výzkumu.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist in Laboratory Methods

Candidate: Bc. Aneta Janků

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

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

**Key words:** yeasts, moulds, antimycotics, mechanism of action of polyenes, microdilution broth method, MIC - minimal inhibition concentration.

The main topic of this diploma thesis is *in vitro* screening of new, potentially active antifungal compounds.

The introductory chapter in the theoretical part of the work is devoted to the epidemiology of fungal infections. The classification of micromycetes and the characteristics of the fungal eukaryotic cell are given below, focusing on composition of the plasma membrane and the cell wall. A separate chapter also deals with specific species of fungi and the diseases they cause. The main topic is drugs from the group of antifungals, where more attention is focused on polyene antifungals, their mechanism of action in detail and the emergence of resistance. An integral part are also the stages of development of new drugs and a list of novels developing antifungals. The final chapter describes the types of methods designed for *in vitro* evaluation of antimicrobial activity of compounds.

The experimental part is devoted to screening of newly synthesized compounds with potential antifungal activity. The microdilution broth method was used for evaluation, which is one of the most basic methods of testing antimicrobial susceptibility. At the end of the work are the results and overall evaluation of the research.

## SEZNAM ZKRATEK

5-FC	5-fluorocytosin
ABCD	Amphotec
ABLC	Abelcet
ABPA	allergic bronchopulmonary aspergillosis, alergická bronchopulmonální aspergilóza
AC	<i>Absidia corymbifera</i>
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome, Syndrom získaného selhání imunity
AmB	amfotericin B
AmBi	AmBisome
ATCC	American Type Culture Collection, Americká sbírka typových kultur
CA	<i>Candida albicans</i>
CASP5	kaspofungin
CCM	Czech Collection of Microorganisms, Česká sbírka mikroorganismů
Cfu	colony forming units, jednotky tvořící kolonie
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute, Institut pro klinické a laboratorní standardy
CNS	centrální nervová soustava
CP	<i>Candida parapsilosis</i>

CT	<i>Candida tropicalis</i>
DHODH	dihydroorotát dehydrogenáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
<i>Erg-2, Erg-3</i>	ETS (erythroblast transformation-specific) related gene, geny z genové rodiny ERG
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti
FC	flukonazol
GIT	gastrointestinální trakt
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HDAC	histondeacetyláza
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
I	intermediate, intermediárně rezistentní
IPC	inositolfosforylceramid
ITR	itrakonazol
IZ	zóna inhibice
JIP	jednotka intenzivní péče
LPCB	lactophenol cotton blue, laktofenolová modř
MHA	Mueller–Hintonové agar
MIC	minimal inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace
MOPS	3-( <i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
NaOH	hydroxid sodný
NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory Standards, Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy

Nys	nystatin
R	resistant, rezistentní
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute, chemicky definované růstové médium
S	susceptible, citlivý
SAB	Sabouraudův agar
SAFS	severe asthma with fungal senzitzation, těžké astma s fungální senzibilizací
Sp.	species, druh
Spp.	subspecies, poddruh
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
USA	United States of America, Spojené státy americké
VRC	vorikonazol



# OBSAH

1.	ÚVOD.....	11
2.	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
2.1	Epidemiologie mykotických infekcí.....	12
2.2	Charakteristika houbové buňky .....	13
2.3	Klasifikace mikromycet .....	15
2.4	Klasifikace testovaných kmenů hub.....	15
2.4.1	Rod <i>Candida</i> .....	15
2.4.2	Rod <i>Aspergillus</i> .....	18
2.4.3	Rod <i>Absidia</i> .....	21
2.4.4	Rod <i>Trichophyton</i> .....	23
2.5	Nemoci vyvolané houbami.....	24
2.5.1	Mycetismy .....	24
2.5.2	Mykotoxikózy .....	24
2.5.3	Mykoalergie.....	25
2.5.4	Mykózy .....	25
2.6	Antimykotické látky využívající se v terapii.....	27
2.6.1	Polyenová antimykotika.....	28
2.6.2	Antimetabolity .....	34
2.6.3	Azolová antimykotika .....	35
2.6.4	Echinokandiny .....	37
2.6.5	Jiná antimykotika .....	37
2.6.6	Nespecifická antimykotika .....	38
2.7	Výzkum nových antimykoticky účinných látek.....	38
2.7.1	Přehled nových antimykotických sloučenin v různých fázích vývoje .....	39
2.8	Antifungální rezistence .....	43
2.8.1	Buněčné mechanismy antimykotické rezistence .....	44
2.8.2	Molekulární mechanismy polyenové rezistence.....	45
2.9	Testování antimykotické aktivity <i>in vitro</i> .....	46
2.9.1	Interpretace aktivity léčiva pomocí klinických breakpointů .....	47

2.9.2	Metody určené ke stanovení citlivosti patogenů vůči antimykotikům <i>in vitro</i> .....	48
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	58
3.1	Cíl práce.....	58
3.2	Použitý materiál .....	58
3.3	Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub .....	59
3.4	Testované nově syntetizované látky s potencionální antimykotickou aktivitou .....	60
3.5	Standardy antimykotik .....	68
3.6	Metodika .....	69
3.6.1	Příprava růstového média .....	69
3.6.2	Příprava suspenzí testovaných kmenů kvasinek/vláknitých hub .....	69
3.6.3	Příprava dvojkové ředící řady .....	69
3.6.4	Pipetování do mikrotitračních destiček .....	71
3.6.5	Inkubace .....	73
3.6.6	Vyhodnocení .....	73
4.	VÝSLEDKY.....	74
5.	DISKUSE .....	83
6.	ZÁVĚR .....	86
7.	SEZNAM TABULEK .....	87
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	88
9.	SEZNAM GRAFŮ .....	90
10.	POUŽITÁ LITERATURA .....	91

# 1. ÚVOD

Houby (mikromycety) jsou eukaryotické organismy schopné vyvolat život ohrožující plísňové infekce. Na celém světě jimi trpí přibližně 1,7 miliardy jedinců. Jednou z příčin signifikantního nárůstu morbidit i mortality je stále větší množství patogenních hub rezistentních vůči užívaným antimykotikům. Tomu přispívá např. nadměrné užívání širokospektrých antimykotik nebo chybná indikace léčiva. Další příčinou může být pozdní diagnostika s opožděnou indikací vhodného léku. Paradoxně k rozvoji rezistence přispěl i vývoj medicíny, tj. možnost transplantace orgánů, chemoterapie či zavádění katétrů. Nejvíce ohroženou skupinou jsou imunokompromitované osoby, např. s HIV/AIDS. (Rauseo, 2020)

V posledních letech je klíčbě plísňových infekcí dostupná široká škála antimykotik s různou chemickou strukturou a odlišným mechanismem účinku. Nevýhodou je však jejich výrazná toxicita, častý výskyt vedlejších účinků či omezená účinnost. Důležité je také zmínit, že se jedná převážně o látky k lokálnímu užití, tzn. k léčbě kožních a slizničních mykóz. Antimykotika pro léčbu systémových mykóz jsou naopak značně omezená. V roce 2000 bylo k dispozici pouze šest léčiv. V praxi však byly používány jen tři z nich – amfotericin B, flukonazol a itrakonazol. (Kang, 2008) Z tohoto důvodu je nutný vývoj nových sloučenin s lepšími funkčními mechanismy, které budou fungicidní vůči houbovým patogenům a zároveň nebudou mít nepříznivý vliv na zdraví pacientů.

Cílem této diplomové práce je intenzivní *in vitro* screening (neboli vyhledávání) antimykoticky účinných látek. K *in vitro* screeningu antimikrobiální aktivity sloučenin lze použít celou řadu laboratorních metod, které jsou standardizovány Ústavem klinických a laboratorních standardů (CLSI) a Evropským výborem pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). V této práci byla použita mikrodiluční bujónová metoda, kterou bylo otestováno celkem 54 sloučenin.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Epidemiologie mykotických infekcí

V dnešní době představují plísňové infekce velmi závažný problém. Mikroorganismy, které je vyvolávají, způsobují 4–12 % všech nozokomiálních infekcí. Mohou být exogenního původu, tzn. primárně získané až v nemocničním prostředí, nebo endogenního původu, kdy se infekce manifestuje u kolonizovaného člověka. Ve většině případů jde o oportunní infekce doprovázené jiným primárním onemocněním. Způsobují je patogeny, které za běžných podmínek kolonizují kůži a sliznici zdravých lidí a nezpůsobují závažná onemocnění. Ke klinické manifestaci dochází pouze u jedinců s oslabenou imunitou. Jedná se zejména o děti, starší osoby, jedince s HIV/AIDS a pacienty, kteří podstoupili orgánovou transplantaci, chemoterapii nebo dlouhodobě užívají imunosupresiva.

Celosvětový nárůst morbidity a mortality je způsoben nejčastěji rody *Candida* – *Candida albicans* (60–80 %), non-*albicans* druhy *Candida* (20–30 %), *Aspergillus* (15–30 %), *Cryptococcus* (2 %) a ojediněle i rodem *Mucorales*. (Zazula, 2005; Yoon, 2014)

V roce 2009 se staly kandidy čtvrtou nejčastější příčinou infekcí krevního řečiště (9 %) a zároveň třetí nejčastější příčinou spojenou s vysokou mortalitou u kriticky nemocných jedinců na JIP. Důvodem takto vysoké úmrtnosti pacientů může být jednak pomalá diagnostika a s tím související opožděné zahájení léčby antimykotiky, a také podcenění rizikových faktorů umožňující vznik mykotické infekce. (Novák, 2009)

Příčinou zvyšující se incidence oportunních systémových mykóz v posledních letech je např. rozvoj pandemie HIV/AIDS, rozvoj oborů transplantologie, onkologie či neonatologie atd. Zlepšení péče o tyto pacienty umožnilo provádět např. transplantace u nemocných, u kterých to bylo dříve z technického hlediska nemožné, nebo dlouhodobě léčit pacienty např. s hematologickými malignitami. Všichni tito lidé jsou ovšem daleko víc náchylní k rozvoji oportunní systémové i lokální mykózy. Kvůli vysoké úmrtnosti pacientů s těmito obtížemi představuje rozvoj léčiv ze skupiny antimykotik klíčový faktor v možnostech vylepšení péče o kriticky nemocné pacienty. (Horák, 2011)

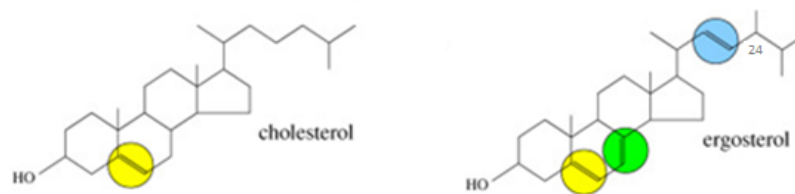
Dle studie „*Burden of serious fungal infections in the Czech Republic*“ z roku 2015, zabývající se prevalencí plísňových infekcí, bylo odhadnuto, že každoročně v České republice trpí vážnými plísňovými infekcemi asi 176 000 (1,67 %) lidí. Těmto číslům dominuje recidivující vulvovaginální kandidóza (způsobená *C. albicans*), vyskytující se zhruba u 152 840 českých žen ročně, následovaná vysokým počtem nakažených s alergickými respiračními stavy. Alergickou bronchopulmonální aspergilózou (ABPA) je pravděpodobně postiženo 4 739 dospělých ročně a dalších 6 581 trpí závažným astmatem s fungální senzibilizací (SAFS). Hlavním původcem těchto nemocí je *A. fumigatus*. K celkovému počtu nakažených osob mykotickým onemocněním za jeden rok (176 000) nejsou stále připočteny kožní plísňové infekce, které postihují až 1,5 milionu lidí ročně. (Chrdle, 2015)

V 80. a 90. letech byl také zaznamenán nárůst kandidových infekcí způsobených zejména *C. albicans*. Ten byl však na konci 90. let částečně zastaven uvedením antimykotika flukonazolu do klinické praxe. To mělo za následek nárůst incidence kandidóz vyvolaných non-albicans kandidami (zejména *C. krusei* a *C. glabrata*, dále *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*) primárně rezistentními vůči flukonazolu. Při nižším dávkování profylakticky podávaného flukonazolu se sice potlačily kmeny *C. albicans*, ale to již nestačilo k potlačení méně citlivých kmenů *Candida*. (Mallátová, 2010)

## **2.2 Charakteristika houbové buňky**

Mikromycety se řadí mezi heterotrofní eukaryotické organismy, které se svojí strukturou podobají více savcím buňkám než bakteriím.

Eukaryotická buňka obsahuje pravé jádro s jadernou membránou a cytoplazmu, která narozdíl od prokaryotických mikroorganismů (bakterií) obsahuje endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, vakuoly a mitochondrie. Další důležitou složkou je plazmatická membrána, která je složena z lipidů, glykoproteinů a sterolů (ergosterolů). Ergosteroly jsou steroidní molekuly nezbytné pro správné fungování plazmatických membrán. Ovlivňují její propustnost, fluiditu a funkci několika enzymů. V houbových buňkách nahrazují strukturou velmi podobný cholesterol, přítomný v membránách živočišných buněk (obr. 1).



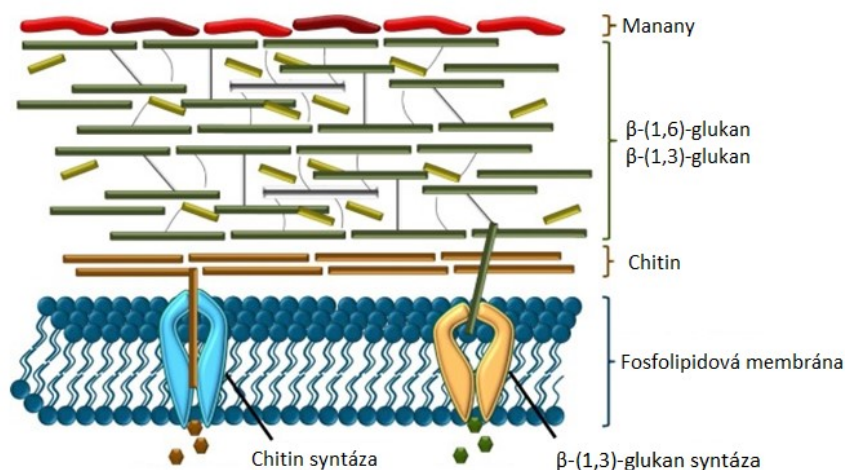
**Obrázek 1: Strukturální vzorec cholesterolu a ergosterolu**

Zdroj: Kristanc, 2019 (upraveno)

*Legenda: Ergosterol se od cholesterolu liší pouze v přítomnosti dvou dvojných vazeb mezi uhlíky C7-8 (značeno zeleně) a C22-23 (značeno modře) a přítomností  $CH_3$  skupiny na uhlíku C24*

Podobností těchto dvou látek vzniká problém při aplikaci polyenových antimykotik, kdy dochází k interakci polyenů s cholesterolem či dalšími živočišnými steroly, strukturně podobnými ergosterolu. Následkem je tak, kromě fungicidního účinku, toxické poškození lidského organismu. (Dohnal, 2008)

Velmi podstatnou složkou houbové buňky je její buněčná stěna (obr. 2). Jedná se o dynamickou strukturu, která chrání buňku před změnami osmotického tlaku a zároveň umožňuje buňce interagovat s okolním prostředím. Buněčná stěna je složena téměř výhradně z molekul, které nejsou v lidském těle zastoupeny, ale jsou nezbytné pro životaschopnost hub. Z tohoto důvodu je stěna mikromycet téměř ideálním cílem pro vývoj nových antimykotik pro klinické využití.



**Obrázek 2: Struktura buněčné stěny hub**

Zdroj: Fesel, 2016 (upraveno)

Většina hub má společnou vnitřní základní vrstvu stěny, složenou z rozvětveného  $\beta$ -(1,3)-glukanu,  $\beta$ -(1,6)-glukanu a chitinu, které jsou spojeny vodíkovými vazbami. Tyto složky představují nosnou část buněčné stěny hub, která odolává vnitřnímu hydrostatickému tlaku. Často jsou na ně navázány další struktury, jako jsou např. polysacharidy (manany) či glykoproteiny, díky kterým se od sebe jednotlivé druhy hub výrazně liší. Jednotlivé komponenty buněčné stěny jsou kovalentně zesíťovány. (Adams, 2004; Bowman, 2006; Gow, 2017)

### **2.3 Klasifikace mikromycet**

Klasifikace mikromycet vychází primárně ze způsobu jejich rozmnožování, morfologie reprodukčních orgánů a spor, popřípadě z biochemických vlastností (zejména kvasinek).

V praxi spadá převážná většina potencionálně patogenních druhů do skupiny pravých hub zvaných *Eumycetes*. *Eumycota* jsou členěna do čtyř základních tříd: *Zygomycetes* (houby spájivé), kam se řadí např. rod *Absidia*, dále *Ascomycetes* (houby vřeckovýtrusé), *Basidiomycetes* (houby stopkovýtrusé) a nakonec *Deuteromycetes* (houby nedokonalé), kam spadají rody *Candida* (řád *Blastomycetes*) nebo *Aspergillus* a *Trichophyton* (řád *Hyphomycetes*).

V běžné terminologii jsou mikromycety děleny na: kvasinky, plísně (neboli vláknité houby) a dimorfní (bifázické) houby, které se nachází, v závislosti na teplotě, buď ve fázi vláknitého mycelia (při 20 °C), nebo ve kvasinkovém stádiu (při 37 °C). (Bednář, 1996; Buchta, 1998; Melter, 2014)

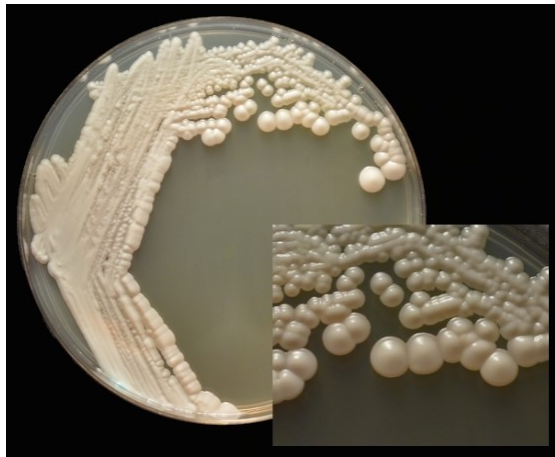
### **2.4 Klasifikace testovaných kmenů hub**

#### **2.4.1 Rod *Candida***

Mikroorganismy rodu *Candida* jsou hlavními původci povrchových i systémových endogenních mykóz. Je jich popsáno více než 200 druhů, z nichž jen několik způsobuje u člověka infekce. Jsou rozšířeny po celém světě a nejčastěji kolonizují kůži a sliznice. Častým onemocněním, které vyvolávají, je kandidóza. Původcem této infekce je hlavně ***Candida albicans*** (obr. 3). Méně častými patogenními

patogenní druhy jsou *C. parapsilosis* (obr. 4), *C. tropicalis* (obr. 5), *C. krusei* (obr. 6), *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis* nebo *C. guilliermondii*.

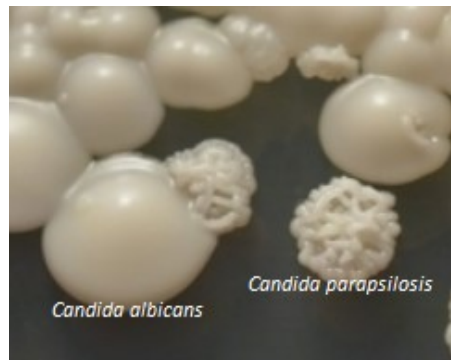
Kandidy se řadí mezi aerobní mikroorganismy a na kultivaci jsou málo náročné. Dobře rostou na Sabouraudově (SAB) glukózovém agaru při teplotě 37 °C (24–48 h). (Bednář, 1996; Votava, 2010; Loreto, 2019)



**Obrázek 3: Kolonie *Candida albicans* (SAB glukózový agar, 48 h při 37 °C)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/Candida-albicans.html>

*Legenda: makromorfologický popis kolonie Candida albicans na SAB glukózovém agaru – barva krémová, vzhled matný, textura hladká, profil kolonie vypouklý, tvar okrouhlý, okraj rovný*

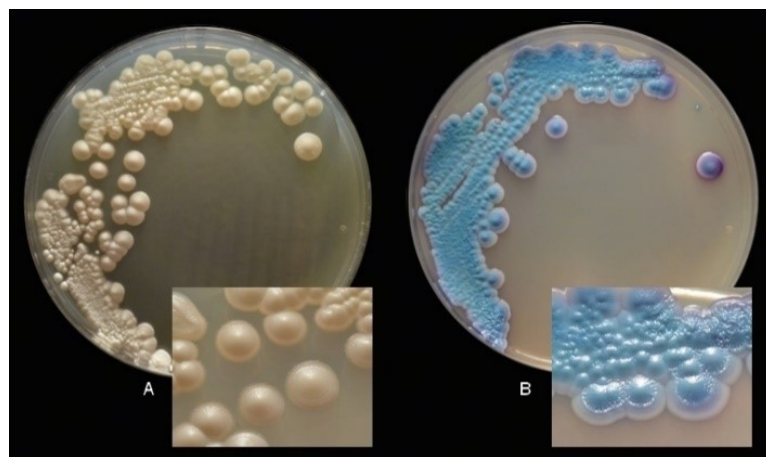


**Obrázek 4: Kolonie *Candida parapsilosis* (SAB glukózový agar, 48 h při 37 °C)**

Zdroj: [https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar.html?fbclid=IwAR2AFmFm-TsnFSyf8WvV3H5XrVal3EyE1rngl1cPPJwtPRAF67ig-L1Qn\\_I](https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar.html?fbclid=IwAR2AFmFm-TsnFSyf8WvV3H5XrVal3EyE1rngl1cPPJwtPRAF67ig-L1Qn_I) (upraveno)

*Legenda: makromorfologický popis kolonie Candida parapsilosis na SAB glukózovém agaru – barva krémová, vzhled matný, textura drsná, profil kolonie plochý a zvlněný, tvar sektorový, okraj vlnitý*

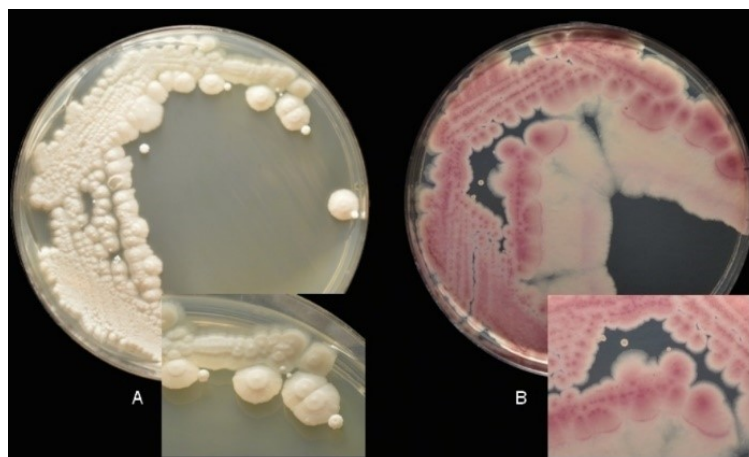




**Obrázek 5: Kolonie *Candida tropicalis* (A: SAB glukózový agar, B: chromogenní kandidový agar, 48 h při 37 °C)**

Zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar-candida-tropicalis.html>

*Legenda: makromorfologický popis kolonie Candida tropicalis na SAB glukózovém agaru – barva krémová, vzhled matný, textura hladká, profil kolonie vypouklý, tvar okrouhlý, okraj rovný*



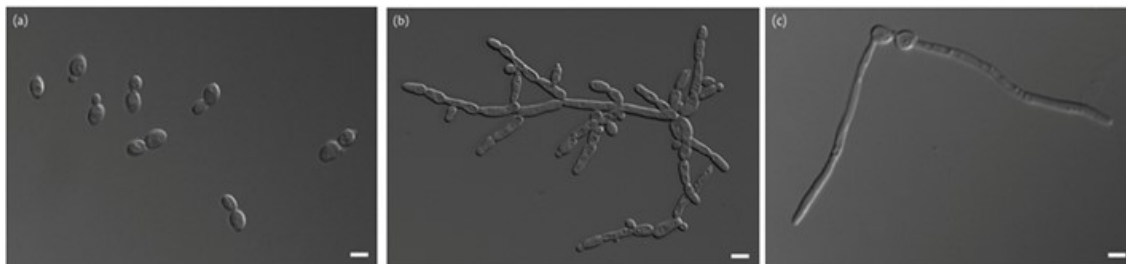
**Obrázek 6: Kolonie *Candida krusei* (A: SAB glukózový agar, B: chromogenní kandidový agar, 48 h při 37 °C)**

Zdroj: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/candida-albicans-photos/chromogenic-candida-agar-growth.html>

*Legenda: makromorfologický popis kolonie Candida krusei na SAB glukózovém agaru – barva krémová, vzhled matný, textura drsná, profil kolonie plochý, uprostřed vyvýšený, tvar okrouhlý, kraj vroubkovaný*

Kvasinky jsou dimorfní houby. Kvasinkové buňky (blastokonidie) jsou oválné či kulaté, o velikosti 3–5  $\mu\text{m}$ . Protáhlé blastokonidie tvoří tzv. řetízky – pseudohyfy.

Kandidy tvoří i pravé hyfy, složené z více buněk (obr. 7). Kvasinkové formy se rozmnožují pučením.



**Obrázek 7: *Candida albicans*: a) kvasinka jako oválná buňka – blastokonidie, b) pseudohyfy – protáhlé blastokonidie, c) pravé hyfy**

Zdroj: Kibbler, 2020

*Legenda: Fázový mikroskop, zvětšení zdroj neuvádí*

Z biochemického hlediska umí kvasinky zkvašovat různé cukry a této schopnosti se využívá k rozlišení jednotlivých druhů. Testy k tomu určené se nazývají zymogramy. Pro identifikaci kandid se používají asimilační testy auxanogramy, u kterých se využívá schopnosti utilizovat cukry a dusíkaté látky. (Bednář 1996; Schindler, 2010)

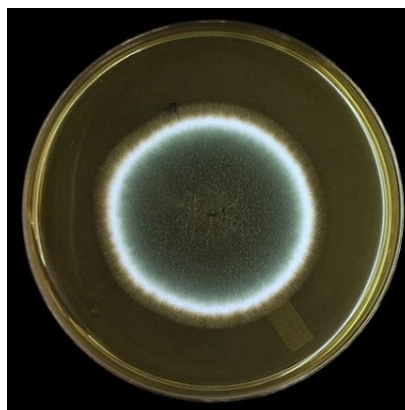
## 2.4.2 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* obsahuje více než 300 popsaných druhů. Je však známo, že jen několik málo z nich způsobuje onemocnění u lidí. Nejčastěji se můžeme setkat s druhem *Aspergillus fumigatus* (obr. 8, 9, 10), dále pak s *Aspergillus flavus* (obr. 11, 12, 13), *A. niger*, *A. terreus* a *A. nidulans*. Tyto druhy patří mezi nejvíce rozšířené mikromycety v našem prostředí. Vyskytují se kosmopolitně jako saprofytické mikroorganismy. Vzhledem k jejich četnosti je možný jejich výskyt v dýchacích cestách bez nutnosti vzniku onemocnění.

Aspergily jsou vláknité houby, jejichž vlákna (hyfy) jsou dělena septy. Makroskopický útvar tvořený mnohočetně rozvětvenými hyfami se nazývá mycelium. Dle lokalizace a funkce je složen ze dvou částí – mycelium vegetativní (bazální), které vrůstá do kultivačního média a čerpá z něj živiny, a mycelium vzdušné (povrchové), jenž nese orgány k reprodukci. Konce vláken jsou tvořeny dlouhými konidiofory s trsem konidií (sporami) – rozmnožovacími elementy. Ty se uvolňují a mohou být vdechnuty, čímž je umožněn přenos na člověka.

Tyto houby mohou vyvolat u člověka infekci a intoxikaci. Některé kmeny aspergilů produkují hepatotoxické a kancerogenní mykotoxiny (= aflatoxiny), jejichž zdrojem jsou často rostlinné produkty (např. cereálie). Infekčním onemocněním bývá aspergilóza, která má několik forem. Častý je ohraničený aspergilom, závažná je akutní pneumonie, u atopiků pak astma či bronchopneumonie. Dalšími běžnými klinickými projevy jsou sinusitida, otitida, pleuritida či postižení CNS a očníce. Dále jsou aspergily významnými původci nosokomiálních nákaz. Ohroženi jsou zejména pacienti s oslabenou imunitou a po transplantacích.

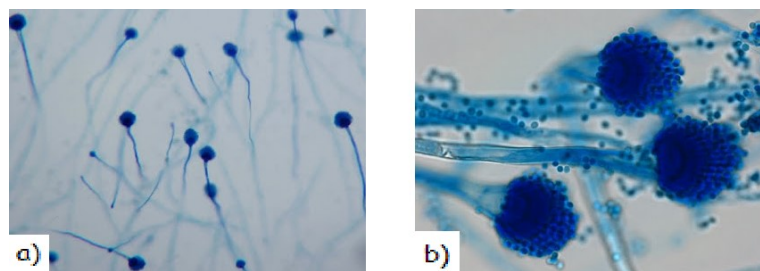
Pro přímý průkaz aspergilů se odebírá sputum, bronchiální výplachy nebo se dělá biopsie tkání. Aspergily rostou na různých půdách, nejčastěji se používá Sabouraudův agar. Doba kultivace trvá většinou 2–4 dny při teplotě 22–27 °C. Barva mikrokonidií bývá většinou šedozelená, žlutá nebo černá. Pozitivní mikroskopický a kultivační nález pro diagnózu nestačí. Rozhodující diagnostický význam mají sérologická vyšetření. (Bednář, 1996; Loreto, 2019)



**Obrázek 8: Kolonie *Aspergillus fumigatus* (SAB agar, 72 h při 27 °C)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>

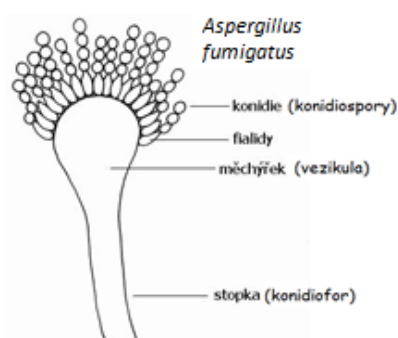
*Legenda: makromorfologický popis kolonie Aspergillus fumigatus na SAB agaru – rychle rostoucí, modrozeleně zbarvené, sametové, spodní strana většinou světlá nebo nazelenalá*



**Obrázek 9: *Aspergillus fumigatus* (mikroskopické zobrazení)**

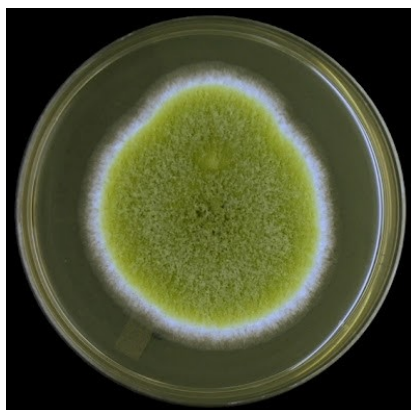
Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>

Legenda: pořízeno digitálním mikroskopem DMD-108, obarveno laktofenolovou modří (LPCB);  
a) zvětšení 250x; b) zvětšení 400x



**Obrázek 10: *Aspergillus fumigatus* – mikromorfologický popis**

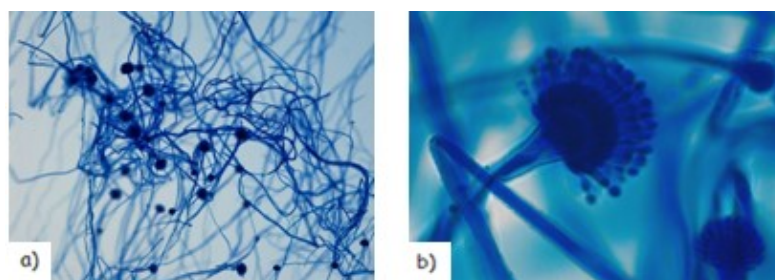
Zdroj: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fu.htm> (upraveno)



**Obrázek 11: Kolonie *Aspergillus flavus* (SAB agar, 72 h při 27 °C)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/aspergillus-flavus.html>

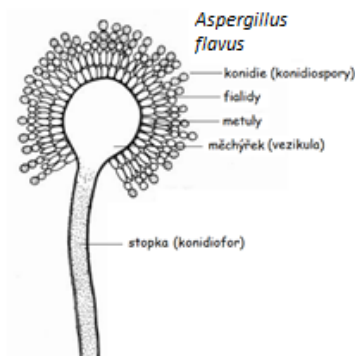
Legenda: makromorfologický popis kolonie *Aspergillus flavus* na SAB agaru – rychle rostoucí, hrubě zrnité, žlutozeleně zbarvené, spodní strana většinou světlá, mohou se vytvářet tmavá sklerocia většinou kulovitého tvaru



**Obrázek 12: *Aspergillus flavus* (mikroskopické zobrazení)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/aspergillus-flavus.html>

Legenda: pořízeno digitálním mikroskopem DMD-108, obarveno LPCB; a) zvětšení 250x; b) zvětšení 1000x, olejová imerze



**Obrázek 13: *Aspergillus flavus* – mikromorfologický popis**

Zdroj: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-fl.htm> (upraveno)

### 2.4.3 Rod *Absidia*

Rod *Absidia* patří mezi vláknité mikromycety, zygomycety (houby spájivé), které se také nazývají jako plísňě pravé. Jedná se o saprofyty na rostlinných substrátech (např. na obilí, ovoci) a vyskytují se všude na světě.

Druhy rodu *Absidia* způsobují onemocnění zvaná zygomykózy (nebo též mukormykózy), dále infekce těžkých popálenin, sepse či otomykózy zevního zvukovodu. Člověk se může infikovat nejčastěji vdechnutím spór, méně často alimentární cestou či kožním poraněním.

Laboratorní diagnostika se provádí ze sekrečního materiálu. Pro kultivaci se stejně jako u aspergilů používá nejčastěji Sabouraudův agar. (Bednář, 1996; Votava, 2003; Julák, 2006)

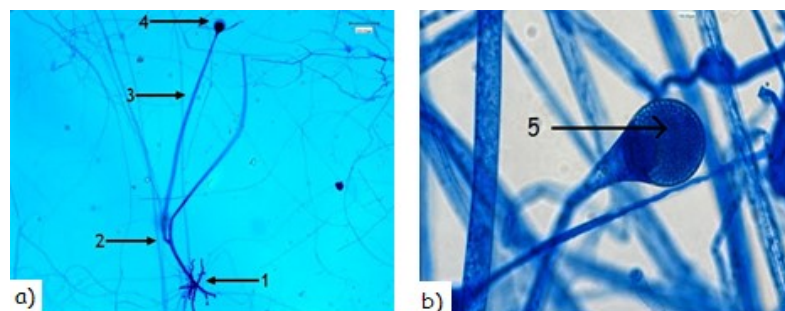
Nedávné taxonomické revize rodu *Absidia* zapříčinily přemístění tří termotolerantních druhů - *A. corymbifera* (obr. 14, 15), *A. blakesleeana* a *A. hyalospora*, které jsou nyní zařazeny do rodu *Lichtheimia*. Rod *Lichtheimia* v současné době obsahuje pět kmenů. *Lichtheimia corymbifera*, dříve pod názvem *Absidia corymbifera*, je hlavním patogenem způsobujícím infekce člověka a zvířat. Dalšími druhy jsou např. *L. ramosa* a *L. ornata*, které jsou také hlášené jako lidské patogeny. (Garcia-Hermoso, 2009)



**Obrázek 14: *Absidia corymbifera* (SAB agar, 4 dny při 30 °C)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/absidia-corymbifera-lichtheimia.html>

Legenda: makromorfologický popis kolonie *Absidia corymbifera* na SAB agaru – rychle rostoucí, vatovité, bílé, spodní strana bez pigmentu



**Obrázek 15: *Absidia corymbifera* (mikroskopické zobrazení)**

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/absidia-corymbifera-lichtheimia.html>

Legenda: pořízeno digitálním mikroskopem DMD-108, obarveno LPCB; a) zvětšení 100x; 1 – rhizoid, 2 – stolon, 3 – sporangiophor, 4 – sporangium; b) zvětšení 400x; 5 – sporangiospory

#### 2.4.4 Rod *Trichophyton*

Rod *Trichophyton* je jeden ze tří rodů (dalšími jsou *Microsporum* a *Epidermophyton*), který spadá do skupiny hub nazývaných se dermatofyty. Jedná se o tzv. keratofilní houby, které se množí pouze v keratinových vrstvách kůže a jejich adnex (vlasy, vousy, nehty).

Významnou schopností dermatofytů je dimorfismus. V keratinové vrstvě je možné pozorovat hyfy a tzv. artrospory (neboli artrokonidie) – hranaté buňky vzniklé fragmentací hyf (obr. 16).



**Obrázek 16: Rod *Trichophyton* – artrospory**

Zdroj: Mondello, 2008

Tyto patogenní houby se vyskytují po celém světě, přičemž některé druhy jsou v určitých oblastech zastoupeny více. Parazitují jak na člověku, tak na zvířatech. Přenos je možný přímým kontaktem nebo používáním stejných předmětů.

Dermatofyty jsou původci plísňových onemocnění kůže tzv. dermatofytóz, které zpravidla nemívají závažný charakter, pouze délka léčby bývá časově náročná. Infekci mohou způsobovat např. druhy *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, ***T. interdigitale*** atd. (Benáková, 2006; Votava, 2010; Singh, 2018)

*Trichophyton interdigitale* (obr. 17) je antropofilní druh, který dříve patřil do komplexu *Trichophyton mentagrophytes*, což je běžný patogen způsobující dermatofytózy. Ten se v průběhu evoluce odlišil a v dnešní době je na základě molekulárně – genetických studií klasifikován jako samostatný druh. (Zhang, 2019)

Kultivace se provádí ve tmě na SAB glukózovém agaru minimálně tři týdny při pokojové teplotě (20–25 °C). Kolonie mají různou barvu pigmentace. Povrch může být zrnitý, práškovitý či vatovitý. Velký diagnostický význam má morfologie konidií, která se u jednotlivých druhů značně liší. (Bednář, 1996)



**Obrázek 17: *Trichophyton interdigitale* (SAB glukózový agar, 3 týdny při 20 °C)**

Zdroj: <https://www.mykologie-experten.de/pilzgalerie/articles/trichophyton-interdigitale.html>

*Legenda: makromorfologický popis kolonie Trichophyton interdigitale na SAB glukózovém agaru – pomalu rostoucí, vatovité, bílé až lehce nažloutlé, spodní strana žlutohnědá s načervenalým pigmentem*

## **2.5 Nemoci vyvolané houbami**

Rozlišujeme čtyři základní skupiny infekcí vyvolané houbami. Jsou to mycetismy, mykotoxikózy, mykoalergie a mykózy.

### **2.5.1 Mycetismy**

Mycetismy jsou způsobovány požitím jedovatých hub s následnou intoxikací jejich toxiny, jedná se o tzv. alimentární otravy. Nejčastějším původcem jsou stopkovýtrusné houby. U nás se vyskytují hlavně druhy muchomůrka červená (*A. muscaria*), muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) a muchomůrka tygrovaná (*A. pantherina*). (Buchta, 1998; Graeme, 2014)

### **2.5.2 Mykotoxikózy**

Příčinou mykotoxikóz jsou toxiny – sekundární metabolity produkované mikromycetami, které jsou schopné vyvolat závažná onemocnění až smrt u lidí i zvířat. Jedná se zejména o toxiny aflatoxin, citrinin, námelové alkaloidy, fumonisiny, ochratoxin A, patulin, trichotheceny a zearalenony. Obvykle jsou součástí kontaminované potravy a představují tak pro člověka velmi významný rizikový faktor. Mohou způsobit akutní a chronické toxikózy. Jejich účinek může být nefrotoxický,



hepatotoxický, imunosupresivní, estrogenní, hemoragický, teratogenní či karcinogenní. Mezi hlavní producenty mykotoxinů se řadí vláknité houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. (Bednář, 1996; Buchta, 1998; Bennett, 2003)

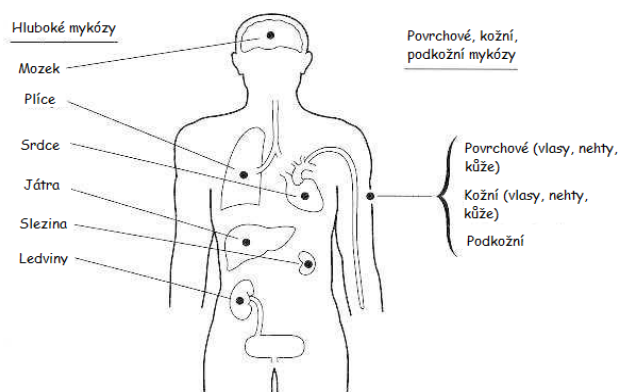
### 2.5.3 Mykoalergie

Mikromycety mohou také způsobovat mykoalergická onemocnění, která představují přecitlivělou reakci imunitního systému hostitele na plísňové antigeny vyvolanou houbovým alergenem (nejčastěji se jedná o spóry). Citliví jedinci jsou spórami alergizováni při vdechnutí, čímž dochází k podráždění dýchacích cest. Mezi alergické nemoci vyvolané houbami patří alergická rhinitis, alveolitis, astma či chronická bronchitis. K nejfrekventovanějším alergickým houbám vyvolávající tato onemocnění se řadí např. rody *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Helmithosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* atd. (Buchta, 1998; Ostrý, 1998)

### 2.5.4 Mykózy

Mykózy jsou nemoci probíhající ve tkáních nebo tělních tekutinách hostitele, který je nejprve kolonizován, následně proběhne proliferace s případnou diferenciací a sporulací, a to má za následek jeho poškození. Přítomnost patogenního agens může také způsobit intoxikaci či vyvolat hypersenzitivní reakci hostitele. Přenos houbové nákazy je možný třemi základními způsoby – **inhalací** (vdechnutím) houby, **kontaktem** (dotykem) s nemocným člověkem, zvířetem či zdravým nosičem a **traumatem** (poraněním) kůže či sliznice, čímž dojde k narušení přirozené bariéry. (Bednář, 1996; Buchta, 1998)

Mykózy můžeme klasifikovat jako povrchové (superficiální), kožní (kutánní), podkožní (subkutánní) nebo hluboké (systémové) infekce v závislosti na typu a stupni postižení tkáně (obr. 18). (Walsh, 1996)



**Obrázek 18: Lokalizace hlubokých mykóz ve srovnání s povrchovými, kožními a podkožními mykózami**

Zdroj: Walsh, 1996 (upraveno)

#### 2.5.4.1 Povrchové mykózy

Povrchové mykózy jsou ze všech mykóz nejběžnější a zároveň způsobují ve světě nejvíce rozšířená onemocnění kůže, vlasů, nehtů a sliznic. Nepronikají do hlubších tkání, jsou lokalizovány pouze v nejsvrchnější části kůže (stratum corneum) a kutikule vlasů. Postihují jak zvířata, tak lidi, u nichž kolonizují kůži a štěpí keratin. Povrchové mykózy zahrnují následující plísňové infekce a jejich etiologické původce: černá píedra (*Piedraia hortae*), bílá píedra (*Trichosporon beigelii*), pityriasis versicolor (*Malassezia furfur*) a tinea nigra (*Phaeoannellomyces werneckii*). Dalšími patogeny mohou být kvasinky. Většinou se jedná o druhy *Candida*, zvláště pak *Candida albicans*. Kvasinkové infekce jsou převážně endogenní, přenášejí se však i pohlavním stykem. (Vosmík, 1995; Bednář, 1996)

#### 2.5.4.2 Kožní mykózy

Kožní mykózy postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehty. Mohou být klasifikovány jako dermatofytózy nebo dermatomykózy. Dermatofytózy jsou způsobeny původci rodů *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*. Dermatomykózy jsou kožní infekce způsobené jinými houbami, z nichž nejčastější jsou kandidy, aspergily a kryptokoky. (Walsh, 1996; Buchta, 1998)

#### 2.5.4.3 Podkožní mykózy

Subkutánní mykózy jsou vyvolávány mikromycetami, které žijí saprofytický v půdě nebo na rozkládajících se rostlinách či dřevě. Tyto houby jsou málo invazivní a

onemocnění vzniká pouze, pokud jsou mykotická agens zanesena přímo do podkoží traumatizované tkáně. Postiženy jsou i hlubší vrstvy kůže, popř. i kosti. Existují tři základní typy subkutánních mykóz: chromoblastomykóza (vyvolává např. *Cladosporium carrionii*), mycetom (např. *Allescheria boydii*) a sporotrichóza (původcem je *Sporothrix schenckii*). (Bednář, 1996; Walsh, 1996; Peutherer, 1999)

#### **2.5.4.4 Hluboké mykózy**

Hluboké mykózy jsou způsobovány buď primárními či oportunními houbovými patogeny. Primární patogenní houby jsou schopné vyvolat infekci u zcela zdravého hostitele. Do organismu se obvykle dostávají prostřednictvím dýchacích cest. Mezi primární systémové patogeny patří *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* a *Paracoccidioides Brasiliemi*. Oportunní patogeny vyžadují naopak imunitně oslabeného hostitele, aby ho dokázali intravaskulárně skrze dýchací cesty nebo zažívací trakt infikovat. Hlavními mykotickými agens jsou *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffeii*, *Zygomycetes*, *Trichosporon beigelii* a *Fusarium* spp. (Walsh, 1996; Koďousek, 2003)

## **2.6 Antimykotické látky využívající se v terapii**

V dnešní době je stále léková skupina antimykotik podstatně početně chudší skupinou oproti antibiotikům, navzdory nárůstu prevalence závažných systémových mykotických infekcí a vzniku multirezistentních mykotických patogenů. Významným vlivem se na tomto faktu podílí, kromě kratšího času výzkumu na poli antimykotik, i složitější struktura organismu hub. Mikromycety jsou vícebuněčné eukaryotní mikroorganismy, a proto je podstatně těžší nalézt klíčovou cílovou strukturu pro zásah léčiva tak, aby nebyla zasažena i struktura hostitele – člověka. Vždy je nutné zajistit, aby toxicita léku byla pro buňky patogenních hub výrazně vyšší než toxicita pro buňky pacienta. (Lincová, 2007)

Mechanismem těchto léčiv je cílené působení na syntézu buněčné stěny, ergosterolu, nukleových kyselin či zvyšování permeability membrány. Jejich účinky jsou fungistatické, čímž je zamezeno růstu a množení houbových buněk, až fungicidní, kdy

dochází k usmrcení plísňových buněk. V praxi je možné se setkat s těmito skupinami antimykotik – nespecifická (účinná dezinficiensia a antiseptika) a specifická (polyeny, antimetabolity, azoly, echinokandiny a ostatní antimykotika). Z hlediska indikací jsou antimykotika rozdělena k léčbě systémových a lokálních mykóz (tab. 1). Léčiva jsou dostupná v několika formách, např. v lokální formě (gel, mast nebo sprej), orální (tobolka, tableta nebo tekutý lék), intravenózní (injekce) nebo ve vaginální formě (měkké tablety, globule). (www.nhs.uk; Vosmík, 1995; Lepesheva, 2011; Horák, 2011)

**Tabulka 1: Rozdělení antimykotik**

<b>Polyenová antimykotika</b>	Systémová	Amfotericin B
	Lokální	Nystatin Natamycin (Pimaricin)
<b>Antimetabolity</b>	Systémové	Flucytosin
<b>Azolová antimykotika</b>	Systémová	Ketokonazol Mikonazol Flukonazol Itrakonazol Vorikonazol
	Lokální	Ekonazol Tiokonazol Klotrimazol Terkonazol Fentikonazol Oxikonazol Bifonazol
<b>Echinokandiny</b>	Systémové	Kaspofungin Anidulafungin Mikafungin
<b>Ostatní antimykotika</b>	Systémová	Griseofulvin Terbinafin
	Lokální	Ciklopirox olamin

Zdroj: Lincová, 2007

## 2.6.1 Polyenová antimykotika

Polyeny patří k jedněm z nejstarších skupin antimykotik. Mezi tyto specifické látky řadíme amfotericin B, natamycin a nystatin, z nichž nejvýznamnější jsou amfotericin B (AmB) a nystatin (Nys). Jedná se o léčiva používaná k lokální léčbě, v případě AmB, i pro systémový účinek, a to zejména u imunokompromitovaných pacientů a některých parazitóz, jako je leishmanióza a trypanozomiáza. Nejzásadnější výhodou polyenů jsou jejich širokospektré účinky proti mykotickým patogenům, které jsou vůči nim jen zřídka kdy rezistentní. Nevýhodou polyenů je špatná biologická dostupnost při orálním podání, z důvodu nedostatečné absorpce v GIT, spolu s vysokou toxicitou, postihující zejména ledviny, srdce, játra a červené krvinky. Proto je vhodné je podávat parenterálně. (Lincová, 2007)

- **Amfotericin B**

Amfotericin B je makrocyclické polyenové antimykotikum, poprvé izolované z kmene *Streptomyces nodosus* roku 1955. Do klinické praxe bylo zavedeno o 3 roky později. Jedná se o neúčinnější antimykotikum se širokým spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Z lékařsky významných hub jsou na amfotericin B citlivé kmeny *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* a *Fusarium oxysporum*. AmB je indikován pouze k léčbě život ohrožujících plísňových infekcí, jako jsou např. aspergilóza, blastomykóza, kandidóza, kokcidioidomykóza a kryptokokóza. Obvykle se podává intravenózně s použitím lipozomální formy, čímž je snížena celková toxicita léčiva. Amfotericin B je velmi známý pro své závažné vedlejší účinky, kterými jsou především vysoké horečky, zimnice, hypotenze, nevolnost, bolest hlavy či dušnost, které se dostaví krátce po jeho podání. Dalším nežádoucím účinkem je poškození ledvin, avšak u lipozomálních přípravků, jako je Amphotec (ABCD), AmBisome (AmBi) nebo Abelcet (ABLC), byla hlášena menší nefrotoxicita, a tak se staly preferovanější formou AmB u pacientů. (Clemons, 1998; Ali, 2018)

- **Nystatin**

Nystatin je první polyenové antimykotikum použité k léčbě plísňových infekcí. Poprvé byl izolován roku 1951 z kmene *Streptomyces noursei*. Je indikován při lokální

léčbě kandidóz kůže a sliznic. Účinkuje hlavně proti rodům *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* a na mikromycety rodu *Aspergillus*. (Vosmík, 1995; Lincová, 2007)

- **Natamycin**

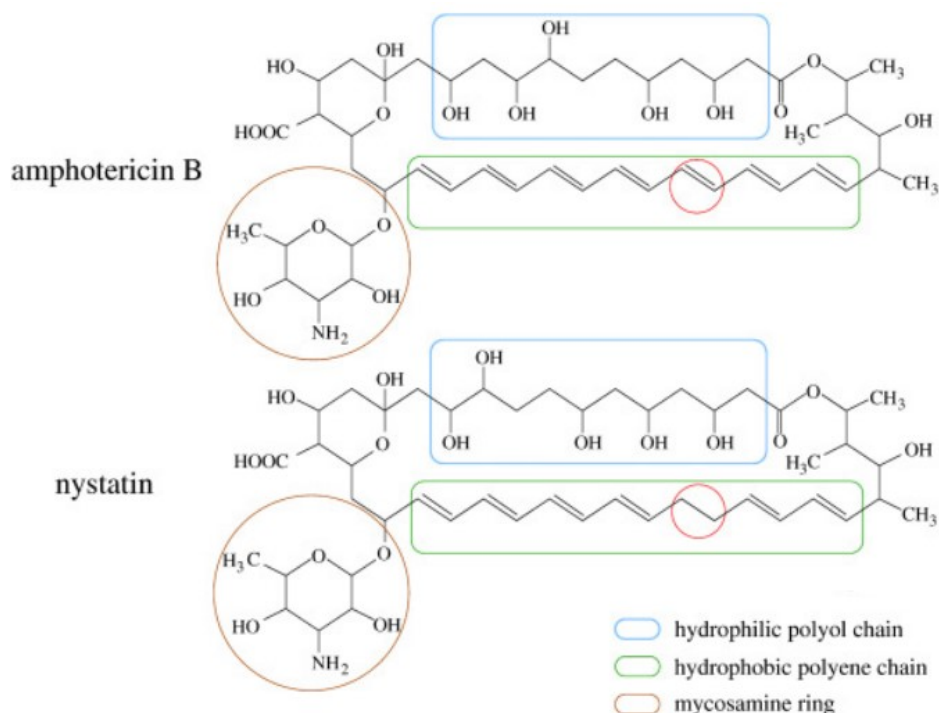
Natamycin, také známý jako pimaricin, je antimykotikum s lokálním užitím. Jedná se o látku poprvé izolovanou z kmene *Streptomyces natalensis*. Využívá se k léčbě keratitidy, konjunktivitidy, kandidózy ústních koutků nebo kandidové vulvitidy. Je účinný zejména proti druhům *Aspergillus*, *Candida* a *Fusarium*. (Horák, 2011)

### **2.6.1.1 Mechanismus účinku polyenových antimykotik**

Princip mechanismu polyenových antimykotik spočívá v navázání na ergosterol a následné tvorbě pórů v membráně fungálních buněk. Tím je zhoršena bariérová funkce membrány, zvýšena její permeabilita a buňka odumírá.

Molekula polyenů má amfipatický (amfifilní) charakter. Struktura polyenů je složena ze tří podjednotek (obr. 19), jsou to – hydrofobní polyenový (značeno zeleně) a hydrofilní polyolový řetězec (značeno modře), jenž společně tvoří makrolidový kruh. Třetí a poslední složkou je mykosaminový kruh (značený hnědě). Vlastností těchto látek je špatná rozpustnost ve vysoce polárních a nepolárních rozpouštědlech, kde tvoří agregáty. (Kristanc, 2019)

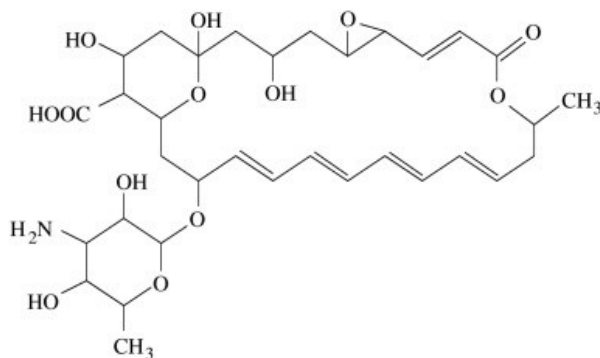
Vzorce amfotericinu B a nystatinu mají velkou strukturální podobnost, liší se pouze v rozložení hydroxylových skupin v polyolovém řetězci a v přerušení konjugovaných dvojných vazeb (v případě nystatinu) v polyenovém řetězci.



**Obrázek 19: Struktura AmB a Nys**

Zdroj: Kristanc, 2019

V závislosti na velikosti makrolidového kruhu rozdělujeme polyeny do dvou podskupin: nepórtvorné polyeny (natamycin – obr. 20) a pórtvorné polyeny (amfotericin B, nystatin).



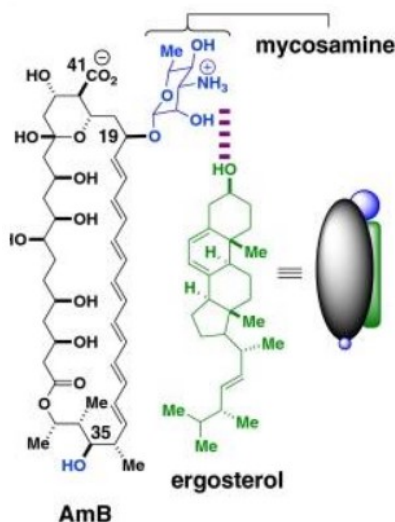
**Obrázek 20: Struktura natamycinu**

Zdroj: Kristanc, 2019

*Legenda: makrolidový kruh natamycinu je ve srovnání s Nys nebo AmB relativně krátký, a proto nemůže vytvářet transmembránové póry.*

Prvním krokem v mechanismu působení polyenů je vazba molekuly antimykotika na ergosterol (obr. 21). To je umožněno elektrostatickou interakcí (vodíkovou vazbou) mezi hydroxylovými skupinami ergosterolu a mykosaminového

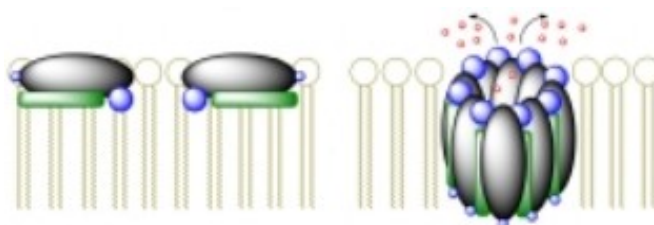
kruhu (např. AmB), který je vázán na uhlíku C19 na AmB. Hydroxylová skupina na uhlíku C35 je podstatná k ukotvení antimykotika k jedné straně lipidové dvojvrstvy. (Brajtburg, 1990; Gray, 2012)



**Obrázek 21: Vazba amfotericinu B na ergosterol**

Zdroj: Gray, 2012

Interkalací polyenového antimykotika do membrány je vytvořen „kanál“, který svou strukturou přesahuje membránu (obr. 22).

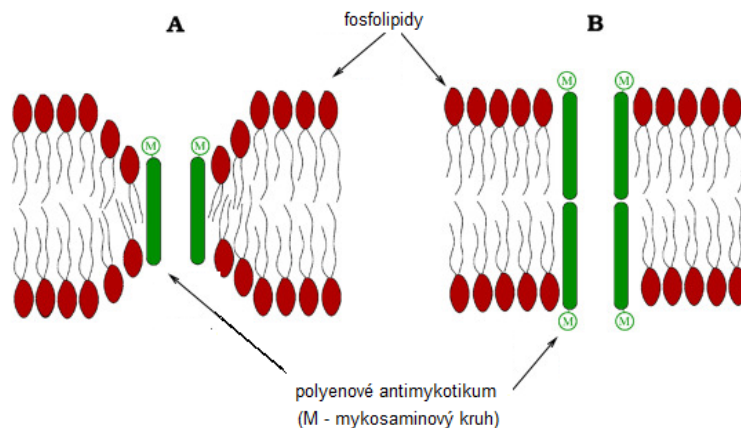


**Obrázek 22: Včlenění antimykotika do buněčné membrány**

Zdroj: Gray, 2012

Póry mohou být tvořeny dvěma způsoby – konformační změnou membrány nebo tandemovým vložením antimykotika do lipidové dvojvrstvy (obr. 23). Vznik jednoduchého či dvojitého „kanálu“ je závislý na tloušťce hydrofobní části plazmatické membrány hub – čím tenčí, tím je větší pravděpodobnost vzniku jednoduchého póru a naopak. (Lepesheva, 2011)



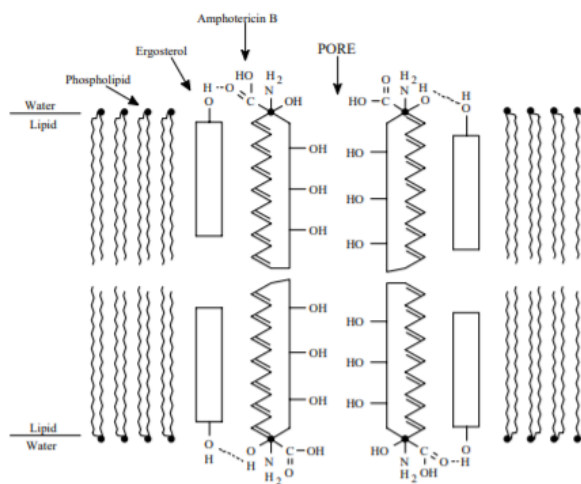


**Obrázek 23: Typy transmembránových „kanálů“ v plazmatické membráně**

Zdroj: Kristanc, 2019 (upraveno)

Legenda: A: jednoduchý „kanál“, B: dvojitý „kanál“

Oba typy transmembránových „kanálů“ mají stejnou strukturu. Polyenové řetězce směřují k lipidovému prostředí (k fosfolipidům) a dutina pórů je tvořena hydrofilními polyolovými řetězci s OH skupinami (obr. 24). (Ghannoum, 1999)

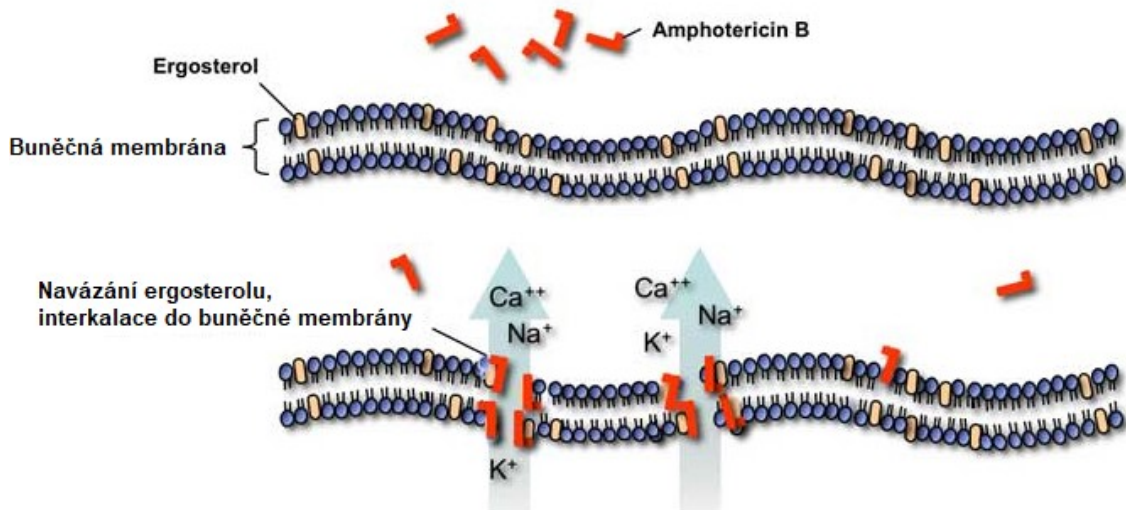


**Obrázek 24: Transmembránový "kanál" tvořený amfotericinem B**

Zdroj: Kristanc, 2019

Pórotvorná aktivita polyenů způsobuje, že jednomocné a dvojmocné ionty (např. sodné, draselné, vápenaté, chloridové ionty) unikají z buňky ven (obr. 25). Složky podílející se na tvorbě pórů se liší svými rozměry, to ovlivňuje celkovou šířku transmembránového „kanálu“ a procházet tedy mohou jen molekuly o příslušné velikosti. Zatímco nystatin tvoří menší póry, které jsou propustné pouze pro ionty

do velikosti 0,36 nm, amfotericin B tvoří póry o velikosti 0,46 nm, které umožňují průchod molekulám o velikosti sacharózy. (Ketllyn, 2016; Kristanc, 2019)



**Obrázek 25: Cytoplazmatická membrána hub – únik intracelulárních kationtů**

Zdroj: <https://drfungus.org/knowledge-base/antifungal-pharmacology/> (upraveno)

Únikem intracelulárních iontů se ničí elektrochemický gradient. To má za následek zvýšení permeability cytoplazmatické membrány a narušení buněčné homeostázy. Celý tento proces vede k buněčné smrti. (Shapiro, 2011)

K dalšímu narušení buněčné homeostázy může také přispět tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidativní poškození buněk hub.

Některé studie prokázaly, že polyeny mohou mít přímý inhibiční účinek na funkci membránových transportérů určitých aminokyselin a glukózy, a tím by tak mohly přispět k narušení biochemických procesů v buňce hub. Mechanismus inhibice není však dosud znám. (Kristanc, 2019)

## 2.6.2 Antimetabolity

Jediným zástupcem antimetabolitů je flucytosin (5-fluorocytosin, 5-FC). Jde o systémové antimykotikum s úzkým spektrem účinku. Strukturou se jedná o fluorovanou pyrimidinovou bázi. Mechanismus účinku flucytosinu spočívá v inhibici jak DNA, tak RNA syntézy za pomoci enzymu adenosindeaminázy, která 5-FC deaminuje na vlastní účinnou látku 5-fluorouracil. Problémem zde je častý výskyt

rezistencí na tento lék. Proto se flucytosin jen zřídka kdy používá samostatně. Klinicky nejvýhodnější synergickou interakcí je vzájemné působení s amfotericinem B, která se indikuje k léčbě kryptokokové meningitidy a různým typům systémových mykóz způsobených rodem *Candida*. Z nežádoucích účinků je zásadní hlavně granulocytopenie, přechodné zvýšení jaterních testů či projevy intolerance různých složek potravy. (Lüllmann, 2002; Ali, 2018)

### **2.6.3 Azolová antimykotika**

Tato skupina látek se začala používat od 60. let minulého století a dnes patří mezi nejpočetnější skupinu antimykotik. Její zástupci mají strukturu založenou na imidazolu, novější preparáty na triazolu. Používají se buď topicky, k léčbě povrchových dermatofytických a kvasinkových infekcí, nebo se indikují při závažných systémových plísňových infekcích.

#### **2.6.3.1 Systémová azolová antimykotika**

Do této skupiny léčiv se řadí imidazolová (mikonazol, ketokonazol) a triazolová (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol) antimykotika. Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici lanosin 14-alfa-demetylázy, enzymu odpovědného za přeměnu lanosinu na ergosterol. Nízké množství ergosterolu zhoršuje fluiditu plazmatické membrány a funkčnost enzymů na ní navázaných. Azolová antimykotika mají široké spektrum účinku proti dermatofytům, kvasinkám i plísním.

- **Imidazolová antimykotika – mikonazol, ketokonazol**

Jedná se o nejstarší azolová antimykotika, nahrazovaná dnes už novějšími deriváty, jako je flukonazol a itrakonazol. Ketokonazol se nejčastěji indikuje u infekcí kůže, vlasů, nehtů a sliznic vyvolaných dermatofyty či kvasinkami. U mikonazolu byl kromě antimykotického účinku prokázán i efekt na některé grampozitivní bakterie a na *Helicobacter pylori*.

- **Triazolová antimykotika – flukonazol, itrakonazol, vorikonazol**

Všechna tyto látky se řadí mezi novější druhy systémových antimykotik. Indikují se zejména u aspergilových infekcí, v některých případech i vyvolaných rodem *Candida*. Výhodou je zde menší množství nežádoucích účinků a lékových interakcí.

### **2.6.3.2 Lokální azolová antimykotika**

Jedná se o léčiva syntetického původu. Představují skupinu látek s obdobným principem mechanismu jako u předchozí skupiny, a tedy i s podobným klinickým použitím. Výjimku představuje bifonazol, který inhibuje biosyntézu ergosterolu na dvou různých úrovních, čímž dochází k funkčním a strukturálním poruchám v cytoplazmatické membráně.

V praxi se tato antimykotika využívají zejména v léčbě dermatologických obtíží, resp. hlavně v gynekologii. Jsou dostupná v různých lokálních lékových formách, což umožňuje lékaři zvolit optimální lék odpovídající danému onemocnění.

- **Bifonazol**

Bifonazol je širokospektré antimykotikum, působící hlavně na dermatofyty, kvasinky a plísň. Určené pouze pro lokální aplikaci ve formě krému či roztoku.

- **Ekonazol, Klotrimazol**

Antimykotika ekonazol a klotrimazol působí fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky a plísň. Nepůsobí na spory. Na většinu gram pozitivních bakterií účinkují bakteriostaticky.

- **Fentikonazol**

Fentikonazol je indikován k lokální léčbě dermatomykóz a ke smíšeným mykotickým a bakteriálním kožním infekcím. (Vosmík, 1995; Lüllmann, 2002; Lincová, 2007)

- **Tiokonazol, Oxikonazol, Terkonazol**

Tato tři antimykotika jsou určena výhradně k léčbě kandidových vulvovaginitid. (Slíva, 2010)

## 2.6.4 Echinokandiny

Echinokandiny jsou poslední skupinou antimykotik, která se začala používat počátkem 21. století. Jedná se o širokospektrá antimykotika užívaná výhradně k léčbě závažných systémových mykóz. Patří mezi nejnovější skupinu látek s výrazným fungicidním účinkem a zároveň velmi dobrou tolerancí. K dispozici jsou 3 zástupci této skupiny – kaspofungin, anidulafungin a mikafungin. Jednotlivé preparáty se od sebe liší strukturou postranního řetězce, která je zásadní pro antifungální aktivitu. Působí hlavně na kandidy a aspergily, histoplazmata a částečně i na *Pneumocystis carinii*. Mechanismus působení echinokandinů spočívá v inhibici syntézy  $\beta$ -D-(1,3)-glukanu, významné složky buněčné stěny hub. Tím se zcela liší od ostatních skupin antimykotik. Odlišují se i cestou biotransformace, která probíhá jen zčásti v játrech. To umožňuje jejich kombinování s ostatními druhy antimykotik. S tím souvisí i minimální orgánová toxicita a jen nevýznamné lékové interakce. Hlavní překážkou v jejich širším užívání je vysoká pořizovací cena. (Haber, 2008; Rozsypal, 2008; Horák, 2011)

## 2.6.5 Jiná antimykotika

- **Griseofulvin**

Griseofulvin, získaný z kmene *Penicillium griseofulvum*, je antimykotikum s velmi úzkým spektrem účinku. Působí pouze na dermatofyty. Mechanismus fungistatického účinku griseofulvinu spočívá v denaturaci mikrotubulárního aparátu buňky hub. To má za následek nemožnost buněčného dělení. Z morfologického hlediska se jedná o inhibici růstu vláknitých výběžků – hyf.

- **Terbinafin**

Terbinafin je allylaminové antimykotikum s fungicidním účinkem. Působí na dermatofyty, kvasinky, plísňe, dimorfní houby a parazity. Je vhodný především k léčbě tineí, kvasinkových infekcí vyvolaných rodem *Candida* a onychomykóz (houbových infekcí nehtů). Jako lék je dostupný v perorální i lokální formě.

- **Ciklopirox olamin**

Lokální antimykotikum používané k léčbě plísňových infekcí nehtů a vlasů. Ciklopirox vykazuje fungistatickou a fungicidní aktivitu proti širokému spektru

fungálních mikroorganismů, jako jsou dermatofyty, kvasinky, dimorfní houby, eumycety a aktinomycety. Kromě toho také působí protizánětlivě a antibakteriálně proti mnoha grampozitivním a gramnegativním bakteriím. (Diamantová, 2003; Lincová, 2007; Buchta, 2009)

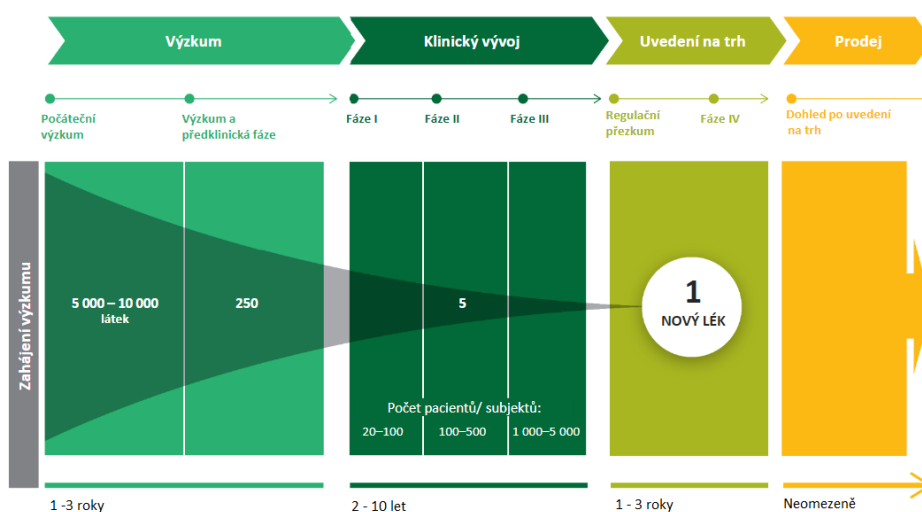
### 2.6.6 Nespecifická antimykotika

Nespecifická antimykotika narušují od specifických nezasahují v určitém místě metabolismu hub, ale mají fungistatický a obvykle i bakteriostatický účinek. Většinou ovlivňují permeabilitu buněčné membrány, způsobují denaturaci bílkovin nebo vedou ke změně kyselosti. V lékárnách je lze volně zakoupit ve formě masti, spreje nebo roztoku. Indikovány jsou při léčbě kožních mykóz i kombinovaných kandidových a bakteriálních infekcí. Mezi nespecifická antimykotika patří např. kyselina benzoová, salicylová, formaldehyd, organická barviva, fenoly, halogeny, antiseptika a další. (Hendrychová, 2011)

## 2.7 Výzkum nových antimykoticky účinných látek

Vývoj nových antimykotik je nejen velmi finančně nákladný, ale i časově náročný proces. Obvykle od počátku výzkumu, až po uvedení výsledného léku na trh, uplyne více než 10 let. Celý vývojový proces léku je založen ze čtyř na sebe navazujících fází (obr. 26). První fází je **fáze základního výzkumu**, která zahrnuje screening nových, potenciálně antimykoticky účinných látek. Po výběru nové, účinné látky se přechází k další fázi výzkumu. Druhou fází je **fáze preklinická**, jenž zahrnuje *in vitro* experimenty, u kterých se testuje (např. na izolovaných buňkách, tkáních, či orgánech) toxicita, mechanismus účinku a farmakologické vlastnosti zkoumané látky. Poté se provádí *in vivo* experimenty, u nichž se využívají zvířecí modely, na kterých se jako na komplexním živém organismu ověřuje bezpečnost a účinnost nového léku. Pokud proběhne vše v pořádku a látka je vyhodnocena jako dostatečně bezpečná, je možné přistoupit k další fázi vývoje. Tou je **fáze klinická**, jenž trvá v průměru 5 let a skládá se ze tří částí klinického hodnocení: **fáze I.** – první podání léčiva několika zdravým dobrovolníkům, **fáze II.** – průzkumné podání léčiva menší skupině nemocných, **fáze III.** – potvrzovací podání léčiva velkému počtu pacientů. Pokud hodnocený lék úspěšně

projde oběma stádii vývoje (preklinickou i klinickou fází), tzn. má dostatečný účinek a míra vedlejších účinků je přijatelná, je možné **zažádat o registraci** tohoto léčiva. Potvrzením registrace se její držitel zavazuje, že nové léčivo je dostatečně bezpečné, kvalitní a účinné. Poté je možné uvedení léku na trh. Poslední částí vývoje je **postregistrační klinické hodnocení (fáze IV)**. Zde se hodnotí výskyt nežádoucích účinků při dlouhodobém užívání léku, interakce s jinými léčivy, nebo zda ovlivňuje kvalitu a délku života pacientů. (Součková, 2015)



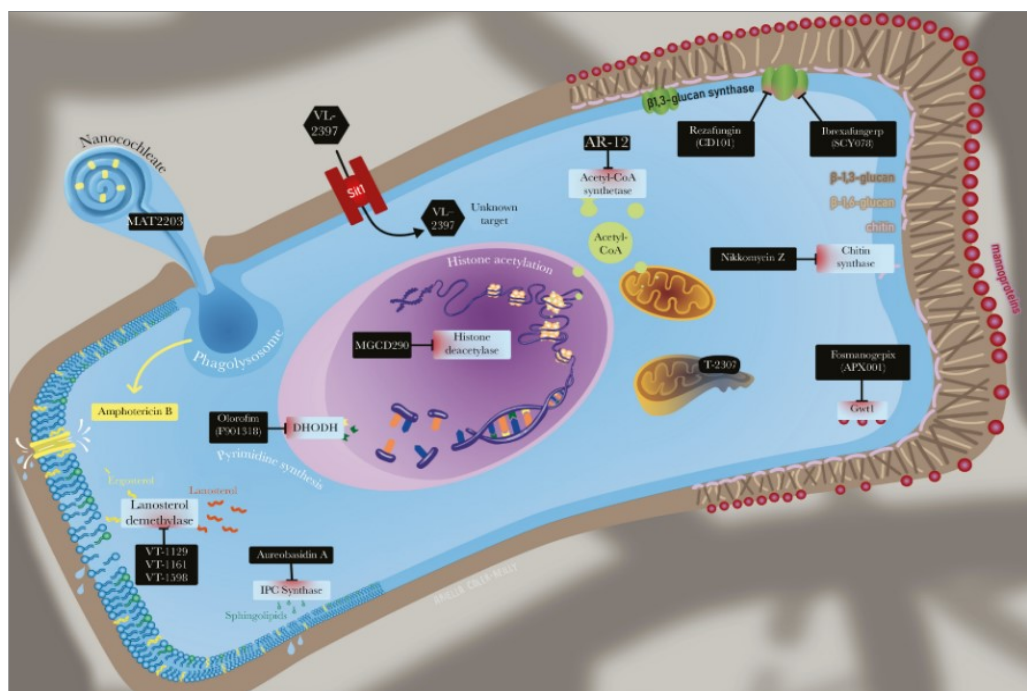
**Obrázek 26: Fáze vývoje nového léčiva**

Zdroj: <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/amr-18-2019/cs/index.html>  
(upraveno)

### 2.7.1 Přehled nových antimykotických sloučenin v různých fázích vývoje

V současnosti je ve vývoji několik nových antifungálních sloučenin, které oproti stávajícím antimykotikům mají lepší účinnost, nižší toxicitu, vykazují méně lékových interakcí, či působí na odlišnou cílovou strukturu fugalní buňky (obr. 27).

V tabulkách č. 2, 3 a 4 je uveden přehled současného vývoje antimykoticky účinných látek. Rozdělení těchto sloučenin je založeno na odlišnosti cílové struktury.



**Obrázek 27: Cílová místa nových antimykotik**

Zdroj: Rauseo, 2020

**Tabulka 2: Přehled nových antimykotik ve vývoji, jejichž cílovou strukturou je buněčná stěna**

Sloučenina	Třída	Mechanismus účinku	Spektrum aktivity	Fáze vývoje
<b>Rezafungin (CD101)</b>	Echinokandiny	Inhibice syntézy $\beta$ -(1,3)-glukanu	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Pneumocystis</i> spp.	3. fáze klinického vývoje
<b>Ibrexafungerp (SCY078)</b>	Terpenoid		<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Pneumocystis</i> spp. <i>Lomentospora prolificans</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	3. fáze klinického vývoje
<b>Fosmanogepix (APX001)</b>	N-fosfonoxy-methylové proléčivo	Inhibice glykosylfosfatidyl-inositolu (GPI)	<i>Candida</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>C. immitis</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Mucorales</i> <i>Fusarium</i>	2. fáze klinického vývoje
<b>Nikkomycin Z</b>	Antibiotikum na bázi uridinu	Inhibice syntézy chitinu	<i>C. immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Přerušný vývoj (dokončená 1. fáze vývoje)

Zdroj: Rauseo, 2020



**Tabulka 3: Přehled nových antimykotik ve vývoji, jejichž cílovou strukturou je buněčná membrána**

Sloučenina	Třída	Mechanismus účinku	Spektrum aktivity	Fáze vývoje
<b>Aureobasidin A</b>	Cyklické depsipeptidové antibiotikum	Inhibice syntézy inositolfosforylceramidu (IPC)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp.	Preklinická fáze vývoje
<b>Amfotericin B Kochleát</b>	Polyeny	Kochleát je pevná lipidová dvojvrstva ve tvaru spirály, která chrání AmB před degradací v GIT. Lék je uvolňován interakcí kochleátu s cílovými buňkami v přítomnosti nízkých intracelulárních koncentrací vápníku. Poté může dojít k vazbě na ergosterol a tvorbě membránových pórů.	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp.	2. fáze klinického vývoje
<b>VT-1129</b>	Tetrazoly	Inhibice enzymu lanosterol-14- $\alpha$ -demethylázy	<i>Cryptococcus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Preklinická fáze vývoje
<b>VT-1161 (Otesekonazol)</b>			<i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Trichophyton</i> spp. <i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	3. fáze klinického vývoje
<b>VT-1598</b>			<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp. <i>Blastomyces</i> <i>Histoplasma</i>	1. fáze klinického vývoje

Zdroj: Rauseo, 2020

**Tabulka 4: Přehled nových antimykotik ve vývoji působících na intracelulární struktury fungální buňky**

Sloučenina	Třída	Mechanismus účinku	Spektrum aktivity	Fáze vývoje
<b>Olorofim (F901318)</b>	Orotomidy	Inhibice dihydroorotát-dehydrogenázy (DHODH), inhibice produkce pyrimidinu	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Histoplasma</i> <i>Blastomyces</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>L. prolificans</i> <i>Scopulariopsis brumptii</i>	2. fáze klinického vývoje
<b>VL-2397 (ASP2397)</b>	Siderofor	Cílová struktura je neznámá, příjem do buňky pomocí transportéru železa	<i>C. glabrata</i> <i>C. kefyri</i> <i>C. neoformans</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Trichosporon asahii</i>	Ukončený výzkum ve 2. fázi vývoje
<b>T-2307</b>	Arylamidin	Neznámý mechanismus účinku, pravděpodobně způsobuje mitochondriální kolaps	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Fusarium solani</i>	1. fáze klinického vývoje
<b>AR-12</b>	Protinádorový derivát celecoxibu	Inhibice acetyl-CoA syntetázy	<i>Candida</i> spp. <i>C. neoformans</i> <i>Blastomyces</i> <i>Histoplasma</i> <i>Coccidioides</i> <i>Fusarium</i> <i>Mucor</i> <i>Lomenstospora</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	Ukončená 1. fáze klinického vývoje
<b>MGCD290</b>	Neznámá struktura	Inhibice histondeacetylázy (HDAC)	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Mucor</i> <i>Fusarium</i>	2. fáze klinického vývoje

Zdroj: Rauseo, 2020

## 2.8 Antifungální rezistence

Mikrobiální patogeny jsou hlavní příčinou úmrtnosti lidí na celém světě. Jednou z příčin je jejich schopnost zmařit terapeutické cíle rychle se vyvíjející rezistencí na antimikrobiální látky.

Antimykotická (antifungální) rezistence může být definována jako **mikrobiologická** nebo **klinická** rezistence. Z klinického hlediska představuje rezistence na lék přetrvávání či progresi infekce, navzdory vhodně použité lékové terapii. Závisí zde na řadě faktorů, jako je imunitní stav hostitele, farmakokinetika antimykotika a druh infikující houby. Jedná se o stav, ve kterém je patogen inhibován antimikrobiální koncentrací, která je vyšší, než by bylo možné bezpečně dosáhnout při normálním dávkování. V mnoha případech nemusí rezistence souviset s minimální inhibiční koncentrací (MIC), ale se selháním antifungálního činidla proniknout do infikované tkáně.

Z hlediska laboratorního je rezistence na léčiva stanovena pomocí kvantitativních testů určující MIC – nejnižší koncentraci léčiva, která inhibuje růst mykotického agens. Přesto, že tyto testy poskytují informaci o tom, jak bude patogen reagovat na léčbu léčivem, nejsou vždy přesnými indikátory reakce *in vivo*. Nevýhodou zde je, že není zohledněna farmakokinetika, interakce mezi hostitelem a patogenem, mikrobiální interakce a faktory prostředí, které ovlivňují rezistenci a klinické výsledky.

Rezistenci *in vitro* lze dále rozdělit na **primární** a **sekundární**. K primární neboli vnitřní rezistenci dochází bez expozice antimykotik. Vyskytuje se u tzv. přirozeně rezistentních buněk, které jsou v populaci přítomné v malém počtu. Tyto buňky produkují modifikované steroly, které vykazují nižší afinitu k polyenům. Jedná se např. o plísně *P. boydii*, rod *Scopulariopsis* a *Fusarium*, nebo kvasinky *T. beigelii*, *C. lusitaniae* a *C. guilliermondii* vykazující primární rezistenci na amfotericin B.

Naopak sekundární (získaná) rezistence se vyvíjí během léčby, až po podání terapeuticky účinného léčiva. Zjištěna byla např. u kvasinek způsobujících infekce u imunokompromitovaných pacientů, zejména u osob s rakovinou. K dalšímu rozvoji sekundární rezistence může přispět dřívější expozice azolovými antimykotiky, což

zapříčiní strukturální změnu buněčné membrány. Příkladem je rezistence na amfotericin B u *Candida* spp. a *Cryptococcus neoformans*.

Ke vzniku antimykotické rezistence přispívá řada faktorů. Jedním z nich jsou **klinické faktory** znemožňující úspěšnou léčbu refrakterního onemocnění, závislé na imunitním stavu pacienta, farmakologii léčiv či stupni/typu fungální infekce. Dále to jsou **buněčné faktory**, které mohou způsobit nahrazení citlivého kmene kmenem či druhem rezistentnějším vůči antimykotickému léčivu. Také může dojít k mutaci nebo genové expresi endogenního kmene na rezistentní fenotyp. K vývoji rezistence přispívají i **molekulární faktory**, které zahrnují např. nadměrnou expresi/mutaci cílového enzymu (i dalších enzymů stejné biosyntetické dráhy), nebo nadměrnou expresi efluxních pump. Obecně lze říct, že ovlivňují rezistenci buněčného fenotypu.

### 2.8.1 Buněčné mechanismy antimykotické rezistence

K přítomnosti rezistentního kmene u pacienta může vést řada faktorů. Jak už bylo výše uvedeno, plísňové infekce se vyskytují především u osob s oslabenou imunitou. Tito pacienti jsou také velmi často spojováni s výskytem infekcí endogenního původu, způsobené kmeny, které jsou součástí mikroflóry. U těchto kmenů může dojít ke vzniku rezistence hned z několika příčin. Jednou z možností je výskyt přirozeně rezistentních kmenů nebo nahrazování zprvu citlivého kmene kmenem rezistentním – vznik primární rezistence. Po dlouhodobé expozici antimykotických látek může dojít k indukci rezistence sekundární. Na jejím vzniku se podílí mimo jiné i genetické alterace.

Dalším mechanismem vzniku rezistence je schopnost některých kmenů (např. *Candida* spp.) se stát přechodně rezistentními na podávané léčivo. Jedná se o tzv. epigenetickou rezistenci. V praxi to znamená, že buňka změní svůj fenotyp, pravděpodobně prostřednictvím přechodné genové exprese, a stává se rezistentní. Jakmile je však tlak léčiva odstraněn, rezistentní fenotyp se opět může stát citlivým.

Jedinečným mechanismem vzniku rezistence je schopnost některých mykotických agens změnit svou morfologii. Jedná se o tzv. fenotypové přepnutí, kdy je možné u určitého kmene pozorovat více buněčných forem, jenž se liší v citlivosti na podané antimykotikum. Typickým příkladem je *C. albicans*, u které je běžný

dimorfismus (tzn. schopnost přejít z kvasinkové formy do formy vláknité a naopak). Změny ve fenotypu byly objeveny i u jiných kmenů rodu *Candida*.

## 2.8.2 Molekulární mechanismy polyenové rezistence

Polyenová antimykotika, jako je amfotericin B a nystatin, se používají v klinické praxi už více než 30 let, a přesto je u nich vznik rezistence spíše vzácný. Rezistence byla zjištěna převážně u druhů non-albicans *Candida* – *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* atd.

K vývoji rezistence na polyenová antimykotika přispívá mnoho různých mechanismů. Rezistence nejčastěji vzniká následkem kvantitativních změn, resp. inhibicí syntézy ergosterolu dojde ke snížením obsahu ergosterolu v buňce.

Dále k rezistenci přispívají změny kvalitativní, jako je např. substituce ergosterolu jinými biosyntetickými prekurzory (fekosterolem, episterolem), které mají horší afinitu k polyenovým antimykotikům.

Rozvoj rezistence může způsobit i reorientace či maskování ergosterolu v buněčné membráně, čímž je znemožněno navázání polyenů, protože vazba je stericky nebo termodynamicky nevýhodná.

Někdy je vývoj rezistence přisuzován změně propustnosti buněčné stěny hub. Zde hraje významnou roli fáze růstu, ve které se buňka právě nachází. Bylo zjištěno, že v tzv. exponenciální fázi růstu dochází k vyšší míře rozpadu a syntézy buněčné stěny a AmB má tak lepší přístup k ergosterolům v buněčné membráně. Naopak je zde i tzv. stacionární fáze růstu, kdy je rychlost rozkladu a syntézy pomalejší, což zhoršuje přístup polyenů k membráně a buňka se může stát rezistentní.

Vývoj rezistence může také být zprostředkován zvýšenou katalázovou aktivitou se sníženou citlivostí na oxidační poškození. To způsobuje např. rozvoj rezistence na amfotericin B.

Další možností je mutace genů, které kódují enzymy, podílející se na syntéze ergosterolů. Jedním z genů je gen *Erg-2*, který kóduje aktivitu enzymu  $\Delta$ -7,8-isomerázy, jenž se podílí na přeměně fekosterolu na episterol. Druhým důležitým genem je gen *Erg-3* kódující enzym  $\Delta$ -5,6-desaturázu, která katalyzuje přeměnu episterolu

na ergosterol. Jakákoli mutace či defekt těchto dvou genů, účastnících se biosyntézy ergosterolu, může vést ke vzniku rezistence vůči polyenům. Například defekty v genu *Erg-3* vedou k akumulaci dalších sterolů ve fungální membráně. V důsledku toho mají izoláty rodu *Candida* a *Cryptococcus* relativně nízký obsah ergosterolu v membráně, ve srovnání s izoláty citlivými na polyeny.

Jedním z důležitých aspektů, který je třeba mít na paměti při zkoumání molekulárních mechanismů rezistence vůči antimykotikům, je možnost vzniku zkřížené rezistence na polyeny, zejména na amfotericin B. AmB je zlatým standardem pro antimykotickou terapii a je proto důležité pečlivě monitorovat izoláty z důvodu zkřížené rezistence na tento lék. Jakákoli terapie nebo lék, který by byl náchylný ke vzniku zkřížené rezistence s amfotericinem B, by měla negativní účinky na naši schopnost léčit plísňové infekce. (White, 1998; Shapiro, 2011)

## **2.9 Testování antimykotické aktivity in vitro**

Antimykotická rezistence stále roste a vyvíjí se, čímž zároveň komplikuje léčbu pacientů, a to i přes zavedení nových antimykotik v klinické praxi. S ohledem ke zvyšující se incidenci závažných plísňových infekcí bylo nutné vyvinout metody, určené k testování citlivosti/rezistence klinického izolátu vůči látkám s antimykotickým účinkem, které budou standardizované a poskytnou klinicky užitečné výsledky.

V dnešní době jsou k dispozici dva nezávislé standardizované postupy pro mikrodiluční bujónovou metodu k testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub, které byly schváleny Evropským výborem pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST – The European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing) a Ústavem klinických a laboratorních standardů (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) se sídlem ve Spojených státech amerických (dříve známým pod názvem Národní výbor pro klinické a laboratorní standardy, National Committee of Clinical Laboratory Standards – NCCLS).

Přestože americká i evropská standardizovaná mikrodiluční metoda využívá k určení citlivosti stejný princip postupu, existují zde však jisté rozdíly, které je od sebe odlišují, a které jsou uvedeny v tabulce č. 5.

**Tabulka 5: Porovnání metodiky standardizované mikrodiluční metody schválené institucemi EUCAST a CLSI**

	CLSI	EUCAST
Denzita inokula	0,5 - 2,5 x 10 <sup>3</sup> cfu/ml	0,5 - 2,5 x 10 <sup>5</sup> cfu/ml
Množství glukózy v médiu	0,2 %	2,0 %
Tvar jamek v mikrotitrační destičce	Kulaté dno	Rovné dno
Doba inkubace	24 a 48 h	24 h
Odečítání MIC	Vizuálně	Spektrofotometricky

Zdroj: Mallátová, 2011

*Legenda: CLSI – Ústav klinických a laboratorních standardů; EUCAST – Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti; cfu – jednotky tvořící kolonie; ml – mililitr; h – hodina; MIC – minimální inhibiční koncentrace*

Vývoj standardizovaných metod určených k testování citlivosti mykotických agens výrazně zaostával oproti testování citlivosti bakterií vůči antibiotickým látkám. Teprve v roce 1982 vznikla v USA (v rámci tehdejšího NCCLS) subkomise pro antimykotické testování citlivosti, která v roce 1992 zveřejnila první dokument M27-A3 popisující metodiku a doporučený postup při testování citlivosti kandid pomocí kvantitativní mikrodiluční bujónové metody. Poté vznikly další tři dokumenty – M38 pro testování vláknitých hub pomocí mikrodiluční metody, M44 a M51 pro stanovení kvasinek a hyfomycet (vyjma dermatofyt) diskovou difúzní metodou. Roku 1997 byla v Evropě založena nová organizace pod názvem EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti), která vydala dva dokumenty zaměřené na testování citlivosti fermentovaných kvasinek a vláknitých hub. (Mallátová, 2011; Pfaller, 2012)

### 2.9.1 Interpretace aktivity léčiva pomocí klinických breakpointů

Ke zjištění aktivity antimykotika neboli zkráceně k vyhodnocení citlivosti jsou k dispozici dva systémy, které stanovují tzv. klinické breakpointy (mezní hodnoty, hraniční koncentrace) antimykotik – EUCAST a CLSI. Hlavním záměrem EUCAST je zharmonizování breakpointů v rámci Evropy a určení mezních hodnot u nových antimykotik. Podle EUCAST je možné interpretaci výsledků kategorizovat do tří skupin, v nichž je testovaný kmen buď klinicky **citlivý** (S; susceptible) – aktivita léčiva představuje vysokou pravděpodobnost terapeutického úspěchu,

**rezistentní** (R; resistant) – aktivita léčiva představuje vysokou pravděpodobnost terapeutického neúspěchu, či **intermediárně rezistentní** (I; intermediate) – nejistý úspěch léčby s danou aktivitou léčiva. Kurčení mezních hodnot je důležitá charakteristika antimykotika *in vitro*, distribuce citlivosti patogenů, farmakodynamika a farmakokinetika. Důležité je zmínit, že při výběru vhodného léčiva je nutné brát nejen stanovené hodnoty breakpointů, ale i ostatní kritéria.

Přestože EUCAST i CLSI jsou velmi uznávané instituce, EUCAST se zdá být v několika ohledech výhodnější. Na rozdíl od mezních hodnot CLSI jsou breakpointy EUCAST zdarma dostupné na internetu a aktualizace se provádí průběžně během roku, v závislosti na výskytu nových mechanismů rezistence. Breakpointy CLSI jsou naopak aktualizovány pouze 1x ročně, a to vždy k 1. lednu. Dostupné jsou pouze v písemné formě a mají přísný copyright. (Urbášková, 2010)

## **2.9.2 Metody určené ke stanovení citlivosti patogenů vůči antimykotikům *in vitro***

Testování citlivosti se provádí pomocí standardizovaných metod. Ty pak na základě výsledků rozdělí testované kmeny na citlivé (S), rezistentní (R) a intermediárně rezistentní (I). Metody používané pro tento účel rozdělujeme na kvalitativní (citlivý/rezistentní; ano – ne) a kvantitativní (citlivý/rezistentní – jak moc; určení konkrétní hodnoty citlivosti). Podle principu testování se dělí na difúzní a diluční.

Vývoj standardních metod v mykologii dlouhou dobu zaostával v porovnání s bakteriologií. Vypracovány byly o několik desetiletí později (na přelomu milénia). Příčinou byla či je odlišná frekvence výskytu mykotických a bakteriálních infekcí. (Špaček, 2013)

### **2.9.2.1 Difúzní agarové metody**

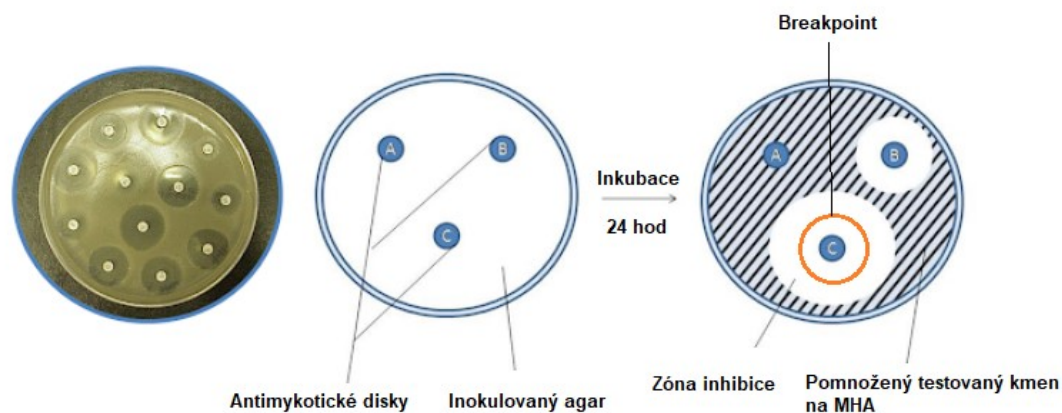
- **Diskový difúzní test**

Diskový difúzní test (obr. 28) je jednou z nejstarších metod používaných pro kvalitativní testování citlivosti kvasinek i vláknitých hub k antimykotikům. Tato metoda využívá papírových disků se standardizovaným obsahem antimykotika. Ty



se pokládají do Petriho misek na inokulovaný Mueller-Hintonové agar (v případě kvasinek MHA se 2 % glukózy a methylenovou modří). Délka inkubace je 24 h při teplotě 35 °C. Antimykotikum se pozvolna uvolňuje z disku a difunduje do okolí, kde potlačuje množení testovaného kmene. Tím vzniká tzv. zóna inhibice (IZ). Podle průměru vzniklých inhibičních zón se testovaný kmen řadí do kategorie citlivý (S) či rezistentní (R). Velikost IZ se měří v milimetrech pomocí posuvného měřítka nebo je možné využít automatizované systémy, jako je ADAGIO (BioRad Laboratories, Francie) nebo BIOMIC (Giles Scientific, USA). Jednotlivé velikosti inhibičních zón se pak porovnávají s referenčními hodnotami (breakpointy EUCAST/CLSI). Výsledek testu závisí na koncentraci antimykotika v papírovém disku, na hustotě inokula a množství agaru.

Výhodou tohoto testu je jeho jednoduchost, finanční nenáročnost a možnost testovat na jedné plotně více druhů antimykotik. Nevýhodou je, že množství antimykotické látky difundované do agarového média se nedá kvantifikovat. (Otčenášek, 1990; Bednář, 1996)



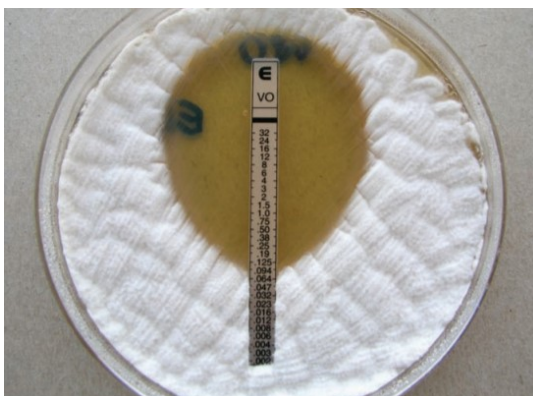
**Obrázek 28: Diskový difúzní test**

Zdroj: <http://pharmwarthegame.blogspot.com/2018/11/kirby-bauer-disk-diffusion-testing.html> (upraveno)

Pokud je IZ větší než referenční hodnota (breakpoint), je testovaný kmen na dané antimykotikum citlivý. Pokud je IZ menší než zóna breakpointu nebo se nevytvoří vůbec, je agens vůči antimykotiku rezistentní.

- **E-test**

E-test, neboli tzv. gradientový difúzní test (obr. 29), je kvantitativní metoda určená ke stanovení antimikrobiální citlivosti mikroorganismů k určitému antimykotiku. Její princip je založen na kombinaci dvou metod – diskové difúzní metody a diluční metody. E-test je komerčně vyráběný inertní plastický proužek, obsahující exponenciální gradient antimykotické látky v suchém stavu. Na jeho povrchu je znázorněna stupnice koncentrací odpovídající 15x ředěnému antimykotiku. Nanesením proužku na inokulovaný Mueller-Hintonové agar dojde k okamžitému uvolnění léčiva. Po 24–48 hodinách inkubace (při 35 °C) protíná zóna inhibice (tvarem připomínající kapku) odstupňovaný testovací proužek, pomocí níž je možné odečíst minimální inhibiční koncentraci (MIC). Podle naměřené hodnoty je možné testovanou látku zařadit do kategorie citlivý, intermediární či rezistentní.



**Obrázek 29: E-test**

Zdroj: <https://www.biomerieux.cz/produkty/etestr>

*Legenda: Testování citlivosti kmene Aspergillus fumigatus na antimykotikum vorikonazol. MIC = 0,94 µg/ml*

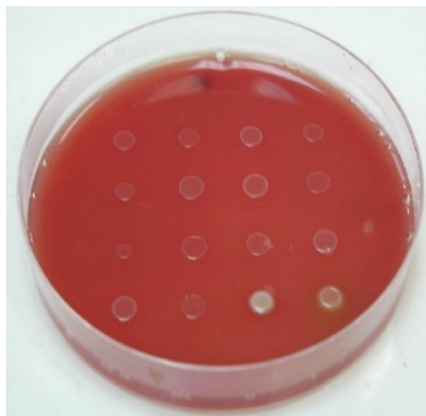
Tento test je vhodný jak pro kvasinky, tak pro vláknité houby. Výhodou této metody je její jednoduchost a rychlost provedení, nevýhodou jsou velké finanční náklady. V dnešní době jsou dostupné E-testy se všemi významnými antimykotiky (tj. s itrakonazolem, flukonazolem, amfotericinem B, ketokonazolem, vorikonazolem, flucytosinem, posakonazolem, kaspofunginem, anidulafunginem, mikafunginem). (Mallátová, 2011; [www.biomerieux.cz](http://www.biomerieux.cz); [www.ulbld.lf1.cuni.cz](http://www.ulbld.lf1.cuni.cz))

### 2.9.2.2 *Diluční metody*

- **Agarová diluční metoda**

Princip této metody spočívá ve zředění živného agarového média různými koncentracemi antimikrobiální látky. Poté následuje aplikace standardizovaného počtu buněk na povrch agarové plotny (obr. 30). Po inkubaci se odečítá hodnota MIC – nejnižší koncentrace testovaného antimikrobiálního činidla, která za definovaných podmínek inhibovala viditelný nárůst mikroorganismu (v mg/l).

Výhodou je zde možnost otestování většího počtu kmenů k danému antimykotiku najednou. Nevýhodou je náročnost provedení, a proto je tato metoda zcela nepraktická pro rutinní provoz. (Jílek, 2002; Wiegand, 2008)



**Obrázek 30: Agarová diluční metoda**

Zdroj: [https://cit.vfu.cz/mikrob-atlas/texty/rezistence\\_dilucni\\_metoda.html](https://cit.vfu.cz/mikrob-atlas/texty/rezistence_dilucni_metoda.html)

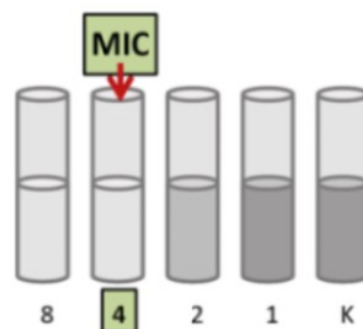
- **Bujónová diluční metoda**

Bujónová diluční metoda je založena na principu kvantitativního testování, kde se stanovuje hodnota MIC. Jsou zde dvě možnosti provedení. Jednou variantou je makrodiluční metoda ve zkumavkách s objemem větším než 1 ml (obr. 31), druhou možností je mikrodiluční bujónová metoda prováděná v mikrotitračních destičkách s objemem v řádu desetin ml (obr. 32). Jako živné médium se používá RPMI 1640 s L-glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené o 2 % glukózy (dle EUCAST). Pro méně náročné provedení a nižší spotřebu médií, antimykotik atd. je mikrodiluční bujónová metoda široce rozšířena. V této diplomové práci byla rovněž využita k experimentálnímu výzkumu.

Do mikrotitrační destičky, která obsahuje koncentrační gradient antimykotik v živném bujónu, se naočkuje inokulum vyšetřovaných kvasinek či vláknitých hub. Obvykle se stanovuje citlivost jednoho kmene ke 12 antimykotickým látkám s odstupňovanou koncentrací (tzv. dvojkové ředění). V tomto případě se stanovovala citlivost několika kmenů k jednomu antimykotiku. Suspenze mikromycet by měla odpovídat 0,5 stupni dle McFarlanda. Pro zhodnocení výsledků je velmi důležité zavést pozitivní kontrolu (K), která představuje jamku bez antimikrobní látky a slouží jako vzorová jamka značící růst mikroba. Naočkovaná destička je inkubována 24–48 h v případě kvasinek a vláknitých hub (resp. 72–120 h v případě dermatofytů) při teplotě 35–37 °C. Následně je vyhodnocena MIC – nejnižší koncentrace antimykotika, která inhibovala viditelný nárůst v mikrotitrační destičce (tzn. první čirá jamka bez zákalu). Vyhodnocení MIC je možné provádět buď vizuálně nebo za pomoci spektrofotometru.

V praxi však u většiny antimykotik, která jsou fungistatická, není vhodné stanovovat MIC, která je definována jako 100% inhibice testované látky. Proto se běžně stanovují hodnoty MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>80</sub>, MIC<sub>90</sub> nebo MIC<sub>95</sub>, které udávají koncentraci potřebnou k potlačení růstu 50 %, 80 %, 90 % nebo 95 % mikroorganismů v porovnání s pozitivní kontrolou. A právě tyto hodnoty se hodnotí pomocí spektrofotometru.

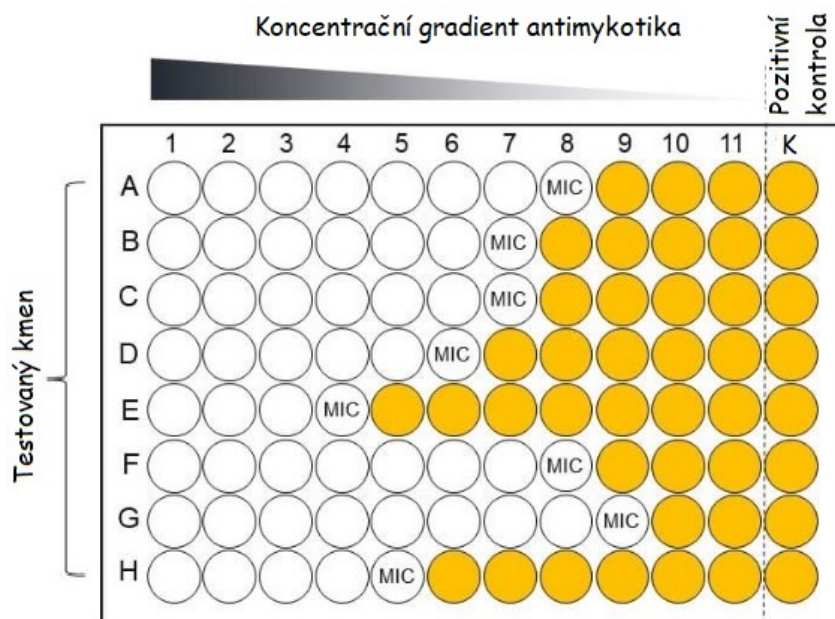
Výhodou této metody je možnost otestování jednoho zkoumaného kmene na několik druhů antimykotik současně. Nevýhodou je nesnadné rozpoznání případné kontaminace. (Jílek, 2002)



**Obrázek 31: Bujónová makrodiluční metoda – ve zkumavkách**

zdroj: Špaček, 2013

*Legenda: MIC – minimální inhibiční koncentrace (= 4 – první koncentrace, která inhibovala růst mikroba; první zkumavka bez zákalu), 1 až 8 – testované koncentrace antimykotika, K – kontrola (médiu bez antimykotika)*



**Obrázek 32: Bujónová mikrodiluční metoda – mikrotitrační destička**

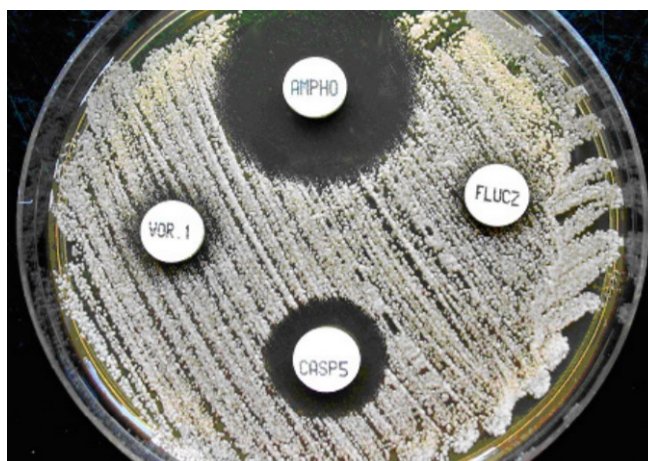
Zdroj: <https://emerypharma.com/>, 2020

Legenda: 96jamková destička s odstupňovanou koncentrací antimykotika; A–H - testované kmeny; 1–11 - klesající koncentrace antimykotika; K – pozitivní kontrola (viditelný nárůst); MIC – minimální inhibiční koncentrace, při které není pozorován žádný nárůst; žlutý kruh – nárůst; bílý kruh – čirá jamka

### 2.9.2.3 Komerční soupravy – kvalitativní metody

- **Neo-Sensitabs systém (Rosco Diagnostica, Dánsko)**

Neo-Sensitabs jsou tablety se standardizovaným obsahem antimykotik (obr. 33), kterými je možné nahradit disky z již výše zmíněné diskové difúzní metody a použít je tak pro semikvantitativní testování citlivosti kvasinek a vláknitých hub. Tyto tablety obsahují různé druhy antimykotických látek, např. amfotericin B, flucytosin, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol nebo kaspofungin. Princip vyhodnocení MIC je stejný jako u diskové difúzní metody. (Mallátová, 2011; [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz))



**Obrázek 33: Neo-Sensitabs**

Zdroj: <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/yeasts.pdf>

*Legenda: testování citlivosti C. albicans na antimykotika: AMPHO – amfotericin B, FLUCZ – flukonazol, CASP5 – kaspofungin, VOR1 – vorikonazol; byl použit Mueller-Hintonové agar s 2 % glukózy a 0,5 µg/ml methylenové modři*

#### **2.9.2.4 Komerční soupravy – kvantitativní metody**

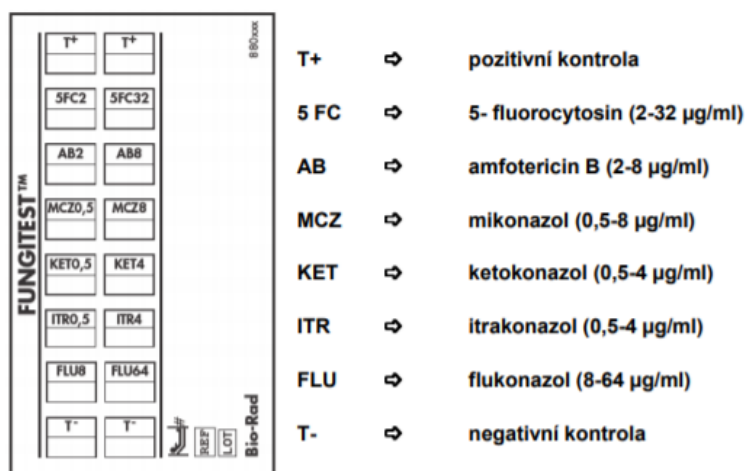
- **Fungitest (BioRad, Francie)**

Fungitest (obr. 34) je metoda určená k semikvantitativnímu stanovení citlivosti kvasinek a vláknitých hub k antifungálním látkám. Metoda spočívá ve vyhodnocení růstu mikromycet v 6 různých druzích antimykotik, která jsou přítomna vždy ve 2 hraničních koncentracích (obr. 35). Tím je umožněno zařadit testovaný kmen do kategorie citlivý/rezistentní. Hodnocení probíhá na základě redukce barevného indikátoru, kdy dojde ke změně (v tomto případě) fialové barvy na růžovou. Pokud je růst mikroorganismu potlačen, barva zůstává nezměněna. Vzhledem k současně dostupným testům stanovujícím citlivost, není souprava doporučena ani pro screeningové vyšetření. (Mallátová, 2011; Špaček, 2013; [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))



**Obrázek 34: Fungitest (ukázka z praxe)**

Zdroj: Sow, 2013

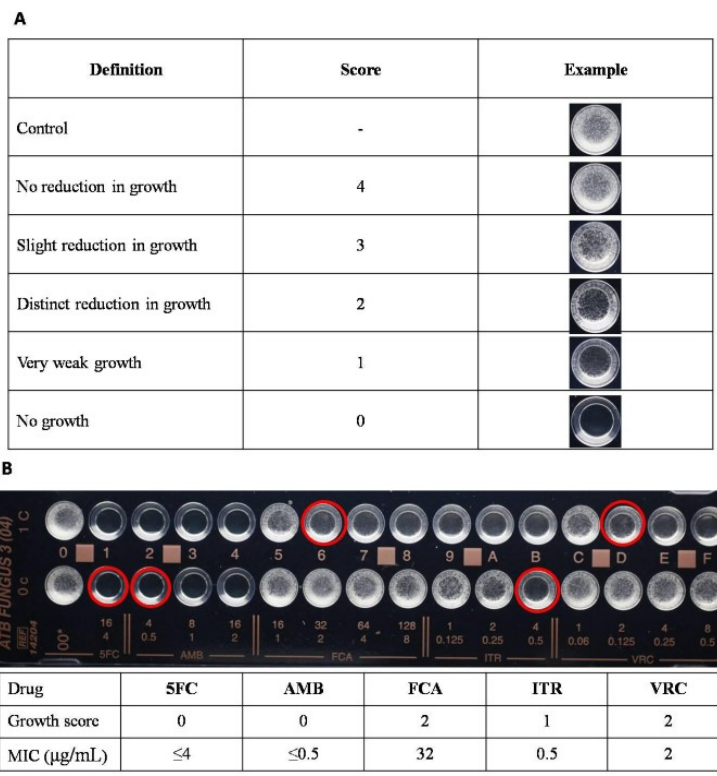


**Obrázek 35: Fungitest – schéma testovací destičky**

Zdroj: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/60780\\_881060\\_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/60780_881060_CZ.pdf)

- **ATB Fungus 3 (Biomérieux, Francie)**

ATB Fungus (obr. 36) jsou 32jamkové plastické mikrodestičky s turbidimetrickým vyhodnocením. Umožňují stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) u pěti antimykotik v různých koncentracích: 5-flucytosin (4, 16 mg/ml), amfotericin B (0,5–16 mg/ml), flukonazol (1–128 mg/ml), itrakonazol (0,125–4 mg/ml) a vorikonazol (0,06–8 mg/ml). Jednou z nevýhod této metody je, že žádné antimykotikum ze skupiny echinokandinů nebylo do soupravy zařazeno. Dále je k vyhodnocení MIC zapotřebí turbidimetru, kvůli nejednoznačnosti při vizuálním vyhodnocení. (Mallátová, 2011; Zhang, 2014)



**Obrázek 36: ATB Fungus 3**

Zdroj: Zhang, 2014

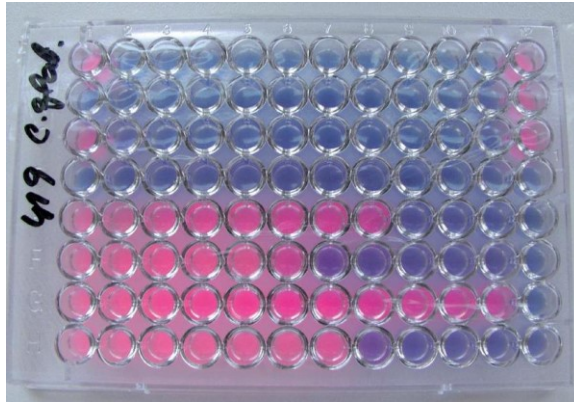
*Legenda: SFC, 5-flucytosin; AMB, amfotericin B; FCA, flukonazol; ITR, itrakonazol; VRC, vorikonazol. A) Rozpětí hodnot (0-4) k vyhodnocení růstu testované kmene. B) ATB Fungus 3 – odečet MIC + výsledky (u SFC je MIC ≤ 4 µg/ml, hodnota růstu „0“; u AMB je MIC ≤ 0,5 µg/ml, hodnota růstu „0“, u FCA je MIC = 32 µg/ml, hodnota růstu „2“; u ITR je MIC = 0,5 µg/ml, hodnota růstu „1“ a u VRC je MIC = 2 µg/ml, hodnota růstu „2“.*

- **Sensititre YeastOne**

System YeastOne slouží jako kolorimetrický mikrodiluční test. Jedná se o 96jamkovou destičku obsahující příslušné antimykotikum a barevný růstový indikátor Alamar Blue v suché formě (obr. 37). K jeho rehydrataci dojde po přidání suspenze kvasinek ve 100 µl RPMI média s 2 % glukózy. Doporučuje se inkubovat při teplotě 35 °C 24 h v případě kandid, 72 h v případě kryptokoků a 48–72 h v případě aspergilů. Vyhodnocení růstu se testovaného kmene se provádí pomocí kolorimetrické změny suspenze v jamce (v tomto případě dojde ke změně modré na růžovou). MIC je stanoveno jako nejnižší koncentrace antimykotika se stále modrým zabarvením. Výsledky mohou být odečteny buď pomocí manuální čtečky nebo automaticky pomocí Sensititre Vizion® systému. V současnosti jsou všechna dostupná systémová antimykotika začleněna do nejnovější verze tohoto testu. Výhodou metody je



jednoduchost, spolehlivost a jednoznačnost při odečtu výsledků. (Pfaller, 2004; Mallátová, 2011)

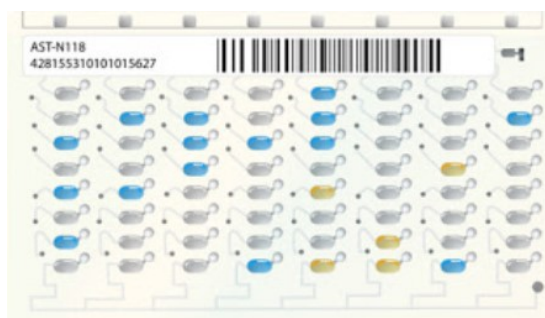


**Obrázek 37: Sensititre YeastOne**

Zdroj: Mallátová, 2011

- **VITEK 2 AST-YS (BioMérieux, Francie)**

Tyto karty, od francouzské firmy BioMérieux, slouží jako mikrodiluční metoda ke stanovení citlivosti klinicky významných kvasinek a vláknitých hub na určitá antimykotika (obr. 38). V dnešní době jsou k dispozici karty pro kaspofungin, flukonazol nebo vorikonazol. Na kartě je možné, díky spektrofotometrickému odečtu, určit nejen růst kvasinek a vláknitých hub, ale zároveň identifikovat také druh (porovnáním biochemického profilu s databází). Výhodou této metody je její plná automatizace. Nevýhodou je omezené spektrum antimykotik, omezený počet testovaných koncentrací a nedostatečný růst některých kmenů v tomto systému. (Mallátová, 2011)



**Obrázek 38: VITEK 2 AST-YS**

Zdroj: <https://hdtabsstoretext.com/search.html?key=viagra&t=ff79>

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je pomocí mikrodiluční bujónové metody a stanovení MIC provést *in vitro* screening nových, potenciálně antimykoticky účinných sloučenin. Při vyhodnocování účinnosti testovaných látek k vybraným referenčním kmenům kvasinek a vláknitých hub se stanovuje, zda jsou látky schopné inhibice růstu či nikoliv.

### 3.2 Použitý materiál

#### Pomůcky:

- sterilní mikrotitrační destičky s víčky (firma Gamedium, Česká republika)
- mikropipety (firma Socorex, Švýcarsko)
- sterilní špičky (firma Eppendorf, Německo)
- 12jamkový rezervoár na médium (firma Gamedium, Česká republika)
- očkovací kličky (firma Gamedium, Česká republika)
- sterilní umělohmotné zkumavky (firma Gamedium, Česká republika)
- skleněné zkumavky
- stojánky na zkumavky

#### Přístroje:

- laminární box Esco Class II type A2 (firma Esco Technologies, USA)
- termostat Binder WTB (firma Binder, Německo)
- denzitometr DEN-18 McFarland Biosan (firma Biosan Ltd, Lotyšsko)
- vortex MS2 Minishaker (firma IKA, Německo)
- ultrazvuková lázeň
- autokláv (firma Chirana, Česká republika)

### Chemikálie:

- dimethylsulfoxid (DMSO) (firma Sigma-Aldrich, Německo)
- sterilní voda (firma Ardeapharma, Česká republika)
- hydroxid sodný (NaOH) (firma Penta, Česká republika)
- RPMI 1640 s L-glutaminem (přesně chemicky definované 5x koncentrované růstové médium) (firma Sigma-Aldrich, Německo)
- glukóza (firma Sigma-Aldrich, Německo)
- pufr MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina) (firma Sigma-Aldrich, Německo)

### **3.3 Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub**

Tabulka č. 6 uvádí použité referenční kmeny kvasinek a vláknitých hub, jejich zkratku a označení sbírkového kmene.

**Tabulka 6: Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub**

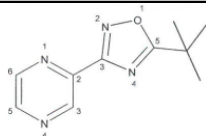
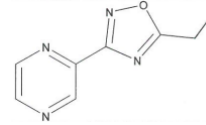
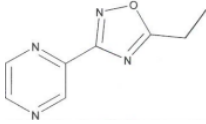
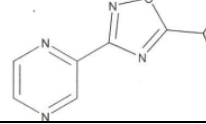
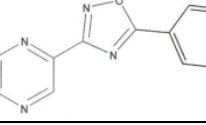
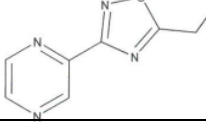
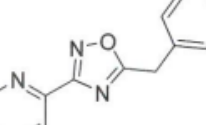
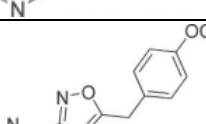
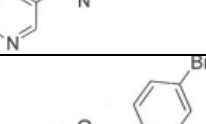
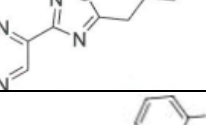
Testovaný kmen	Zkratka	Sbírkový kmen
<i>Candida albicans</i>	CA	ATCC 24433, CCM 8320
<i>Candida krusei</i>	CK	ATCC 6258, CCM 8271
<i>Candida parapsilosis</i>	CP	ATCC 22019, CCM 8260
<i>Candida tropicalis</i>	CT	ATCC 750, CCM 8264
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF	ATCC 204305
<i>Aspergillus flavus</i>	AFla	CCM 8363
<i>Absidia corymbifera</i>	AC	CCM 8070
<i>Trichophyton interdigitale</i>	TI	ATCC 9533, CCM 8377

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

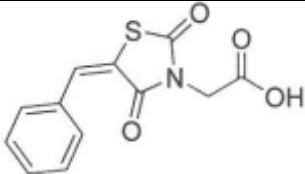
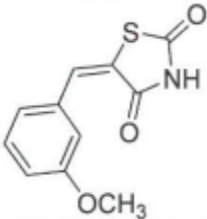
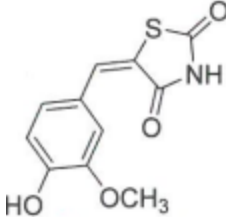
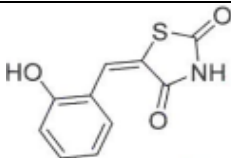
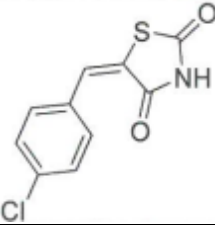
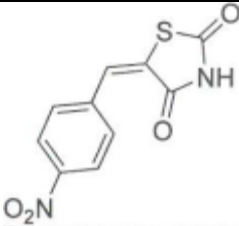
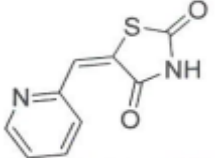
### ***3.4 Testované nově syntetizované látky s potencionální antimykotickou aktivitou***

Vzorků s potencionální antimykotickou aktivitou bylo hodnoceno celkem 54. Sloučeniny byly do laboratoře dodány z katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy v krystalické podobě, proto je bylo nutné rozpustit. Jejich účinky se testovaly v koncentracích 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9; 1,95; 0,98 a 0,49  $\mu\text{mol/l}$ . V tabulkách 7–11 jsou látky rozděleny podle jejich struktury. Každá sloučenina má svůj příslušný kód, strukturní vzorec, molární hmotnost a navážku.

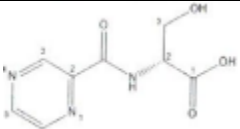
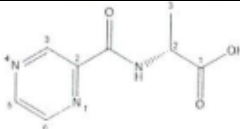
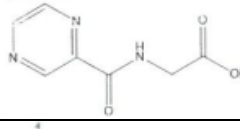
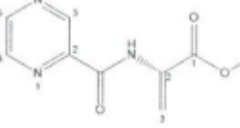
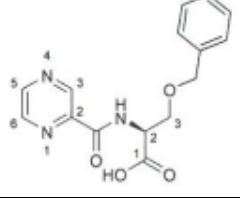
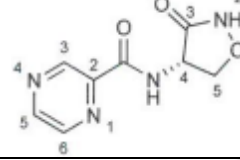
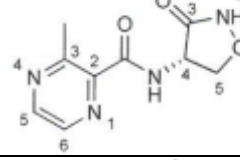
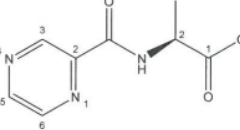
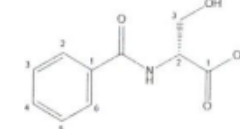
**Tabulka 7: Přehled testovaných látek (1)**

Deriváty pyrazinyloxadiazolů (Dr. Marta Kučerová)				
Pořadí látky	Kód testované látky	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
1.	OX-0b		204,23	8,5
2.	OX-0c		176,18	9,4
3.	OX-0d		190,21	8,8
4.	OX-0e		190,21	9,0
5.	OX-0f		224,22	9,1
6.	OX-0g		196,59	8,0
7.	OX-15		238,25	9,8
8.	OX-17		268,28	12,1
9.	OX-18		317,15	13,6
10.	1-OX-3C		314,77	13,0

**Tabulka 8: Přehled testovaných látek (2)**

Deriváty thiazolidindionů (Dr. Marta Kučerová)				
Pořadí látky	Kód testované látky	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
11.	TAb		263,27	10,7
12.	Tp		235,26	15,2
13.	Ta		251,26	12,2
14.	Tc		221,23	9,8
15.	Tm		239,67	12,1
16.	Ti		250,23	11,1
17.	Tt		206,22	8,8

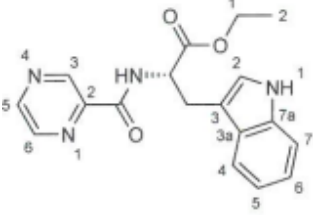
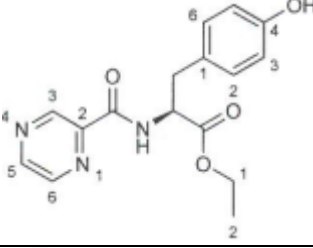
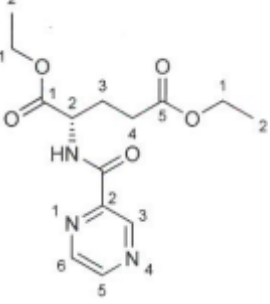
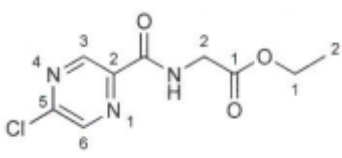
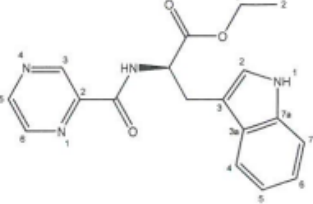
**Tabulka 9: Přehled testovaných látek (3)**

Deriváty pyrazinkarboxamidů substituovaných aminokyselinami (PharmDr. Martin Juhás)				
Pořadí látky	Kód testované látky	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
18.	PC-D-Ser		211,18	9,10
19.	PC-D-Ala		195,18	8,30
20.	PC-Gly		181,15	7,70
21.	PC-MeAcr		207,19	9,60
22.	PC-L-OBz-Ser		301,30	13,50
23.	PC-DCS		208,18	10,4
24.	3Me-PC-DCS		222,20	9,3
25.	PC-L-Ala		195,18	12,0
26.	B-D-Ser		209,20	10,10

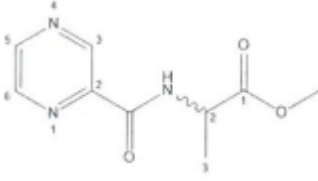
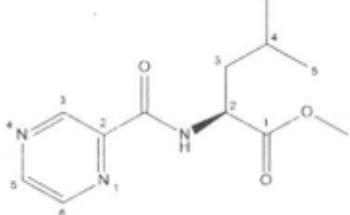
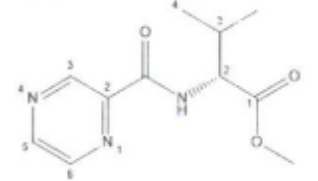
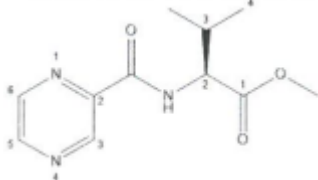
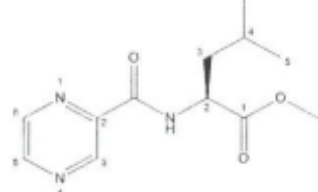
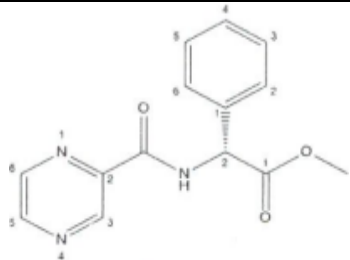
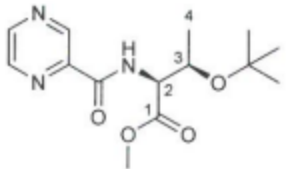
**Tabulka 10: Přehled testovaných látek (4)**

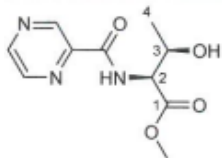
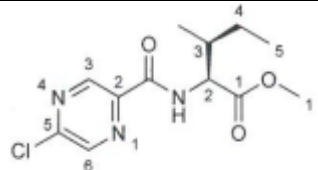
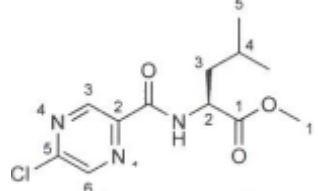
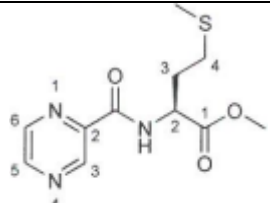
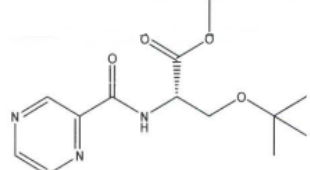
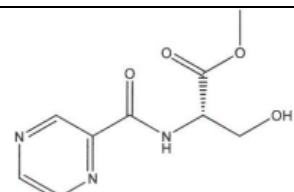
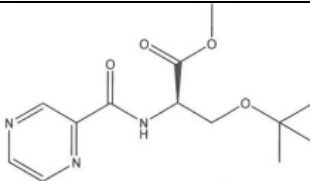
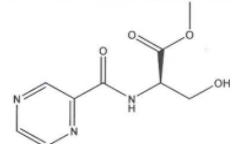
Deriváty pyrazinkarboxamidů substituovaných ethylestery aminokyselin (Et) (PharmDr. Martin Juhás)				
Pořadí látky	Kód testované látky	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
27.	PC-DL-Val-Et		251,29	11,00
28.	PC-CPC-Et		263,30	13,50
29.	PC-DL-Leu-Et		265,31	25,70
30.	PC-DL-Phe-Et		299,33	19,90
31.	PC-Gly-Et		209,21	10,30
32.	PC-L-Asp-diEt		295,30	12,70
33.	PC-L-Ala-Et		223,23	9,50
34.	PC-D-Ala-Et		223,23	11,60



35.	PC-L-Trp-Et		338,37	18,00
36.	PC-L-Tyr-Et		315,33	13,40
37.	PC-L-Glu-diEt		309,32	16,70
38.	5Cl-PC-Gly-Et		243,65	10,20
39.	PC-D-Trp-Et		338,37	17,1

**Tabulka 11: Přehled testovaných látek (5)**

Deriváty pyrazinkarboxamidů substituovaných methylestery aminokyselin (Me) (PharmDr. Martin Juhás)				
Pořadí látky	Kód testované látky	Strukturní vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	Navážka [mg]
40.	PC-DL-Ala-Me		209,21	12,60
41.	PC-L-Leu-Me		251,29	12,70
42.	PC-D-Val-Me		237,26	15,10
43.	PC-L-Val-Me		237,26	12,80
44.	PC-D-Leu-Me		251,29	12,60
45.	PC-D-Pgl-Me		271,28	14,50
46.	PC-L-OtBu-Thr-Me		295,34	16,60

47.	PC-L-Thr-Me		239,23	10,40
48.	5Cl-PC-L-Ile-Me		285,73	16,20
49.	5Cl-PC-L-Leu-Me		285,73	12,2
50.	PC-L-Met-Me		269,32	22,5
51.	PC-L-OtBu-Ser-Me		281,31	19,3
52.	PC-L-Ser-Me		225,20	11,8
53.	PC-D-OtBu-Ser-Me		281,31	13,3
54.	PC-D-Ser-Me		225,20	7,9

### 3.5 Standardy antimykotik

Jako standardy byly použity 2 antimykotické látky – amfotericin B a flukonazol (firma Sigma-Aldrich, Německo). V tabulce č. 12 jsou uvedeny hodnoty MIC pro kvasinky (CA, CK, CP, CT) a v tabulce č. 13 pro vláknité houby (AF, AFla, AC, TI). Výsledky MIC byly odečítány vizuálně po 24 h a 48 h (resp. po 72 h a 120 h v případě TI) inkubace.

**Tabulka 12: Hodnoty standardů antimykotik pro kvasinky**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC (µg/ml)					
		AmB	AmB (530 nm)*	Rozmezí dle EUCAST	Flu	Flu (530 nm)*	Rozmezí dle EUCAST
CA	24h	0,5	0,5	0,06-0,5	>32	1	32-128
CK	24h	1	1	0,125-1	>32	> 32	16-64
CP	24h	0,5	0,5	0,125-1	16	0,5	0,5-2
CT	24h	1	1	-	16	1	-

\* - spektrofotometrický odečet při vlnové délce 530 nm (IC<sub>50</sub>, 50% inhibice růstu vůči kontrole)

**Tabulka 13: Hodnoty standardů antimykotik pro vláknité houby**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC (µg/ml)					
		AmB	AmB (530 nm)*	Rozmezí dle EUCAST	Flu	Flu (530 nm)*	Rozmezí dle EUCAST
AF	24h	1	1	0,25-1	>32	>32	-
AFla	24h	8	8	0,5-2	>32	>32	-
AC	24h	0,5	0,5	-	>32	>32	-
TI	72h	2	2	-	32	16	-

\* - spektrofotometrický odečet při vlnové délce 530 nm (IC<sub>50</sub>, 50% inhibice růstu vůči kontrole)

## 3.6 Metodika

### 3.6.1 Příprava růstového média

Pro mikrodiluční bujónovou metodu bylo použito médium RPMI 1640 s L-glutaminem, bez bikarbonátů, obohacené o 2 % glukózy, které se ředí vhodným puforem – MOPS, a pH je nutné upravit pomocí 10M NaOH na  $7,0 \pm 0,1$ .

### 3.6.2 Příprava suspenzí testovaných kmenů kvasinek/vláknitých hub

K přípravě suspenzí bylo zapotřebí 8 sterilních zkumavek, které bylo nutné řádně označit zkratkami jednotlivých testovaných kmenů. Do každé z nich jsme napipetovali 3 ml sterilní vody. Z kultur narostlých na Sabouraudově glukózovém agaru jsme kličkou odebrali malou část kolonie (resp. malou část konidií) a rozsuspendovali ji ve sterilní vodě v námi označených zkumavkách. Následovalo promíchání na vortexu a měření denzity suspenze pomocí denzitometru tak, aby hustota odpovídala stupni 1 McFarlandova zákalového standardu. Takto připravené suspenze inokula vydrží v lednici zhruba týden.

### 3.6.3 Příprava dvojkové ředící řady

1. Testované látky byly dodány do laboratoře společně s informací o navážce a molekulové hmotnosti.

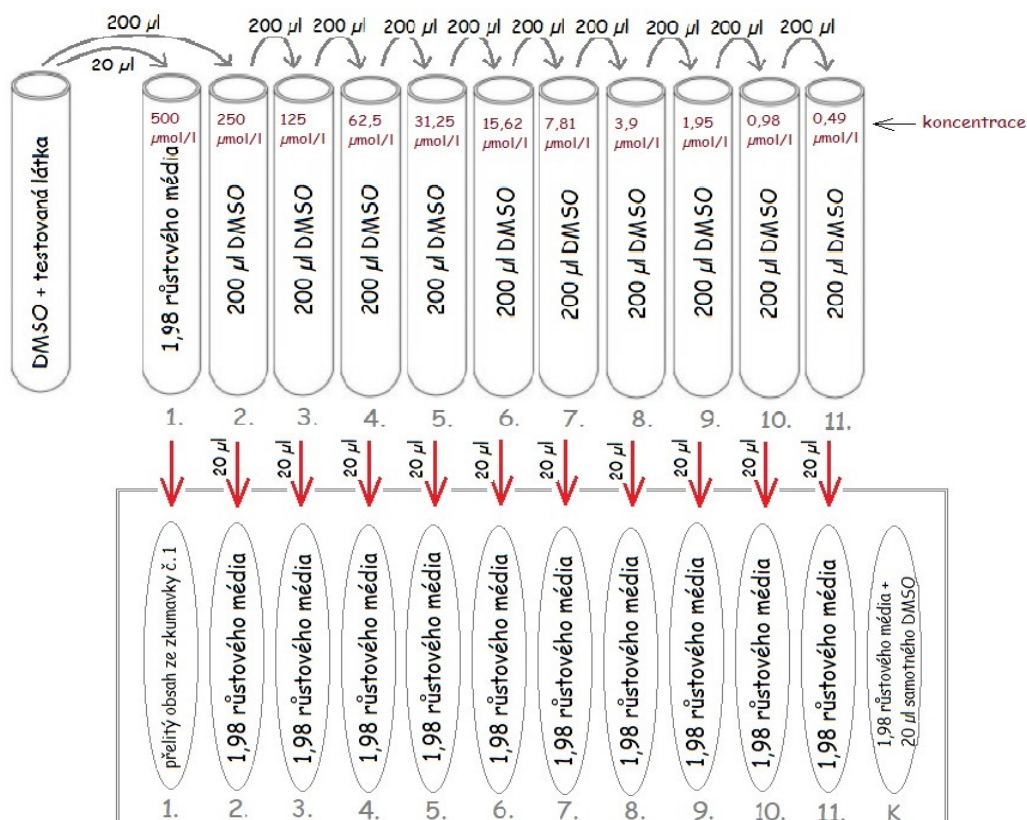
Navážku jsme rozpustili v příslušném objemu DMSO tak, aby 1. koncentrace roztoku byla  $500 \mu\text{mol/l}$  a zároveň, aby výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 %.

**Vzorec pro výpočet objemu DMSO:**

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

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

2. Pokud se látka vysrážela či nerozpustila, bylo potřeba přidat 2. případně 3. ekvivalent rozpouštědla, čímž se posunula 1. testovaná koncentrace o 1 ředění dozadu (z 500  $\mu\text{mol/l}$  na 250  $\mu\text{mol/l}$ , z 250  $\mu\text{mol/l}$  na 125  $\mu\text{mol/l}$  atd.). Pro lepší rozpuštění bylo možné použít ultrazvukovou lázeň. Pokud se látka rozpustila nebo vytvořila homogenní suspenzi, mohli jsme přistoupit k dalšímu kroku.
3. Sterilní umělohmotnou zkumavku jsme si označili číslem 1. Do ní jsme napipetovali 1,98 ml růstového média a přidali 20  $\mu\text{l}$  rozpuštěné testovací látky. Promíchali jsme pomocí vortexu a zkontrolovali, zda se látka v růstovém médiu nevysrážela. Pokud ne, tímto jsme získali roztok 1. testované koncentrace, který jsme později přemístili do 1. jamky 12jamkového rezervoáru a mohli jsme přistoupit k dalšímu kroku.
4. Dále jsme si do 10 skleněných zkumavek, které jsme si popsali čísla 2–11, připravili **dvojkovou ředící řadu testované látky v DMSO** (obr. 39). Do každé zkumavky jsme napipetovali 200  $\mu\text{l}$  DMSO, k tomu přidali stejný objem z dodané rozpuštěné látky a přetahovali z 1. zkumavky (značené č. 2) do druhé, třetí, čtvrté atd. až do poslední zkumavky (značené č. 11). Přetahovaný roztok jsme vždy pomocí pipety promíchali.
5. V dalším kroku jsme si popsali 12jamkový rezervoár čísla 1–11 a písmenem K (kontrola). Do jamky č. 1 jsme vylili obsah již nachystaného roztoku v umělohmotné zkumavce (značené č. 1). Do jamek 2–11 a K jsme napipetovali 1,98 ml růstového média. Postupně jsme přidali 20  $\mu\text{l}$  naředěné testované látky z ředící řady (tzn. z 2. zkumavky do 2. jamky, ze 3. zkumavky do 3. jamky atd.). Do poslední 12. jamky jsme napipetovali 20  $\mu\text{l}$  samotného DMSO jako kontrolu. Tímto postupem jsme získali v každé jamce rezervoáru 2 ml pracovního roztoku s postupně klesající koncentrací testované látky + kontrolu.

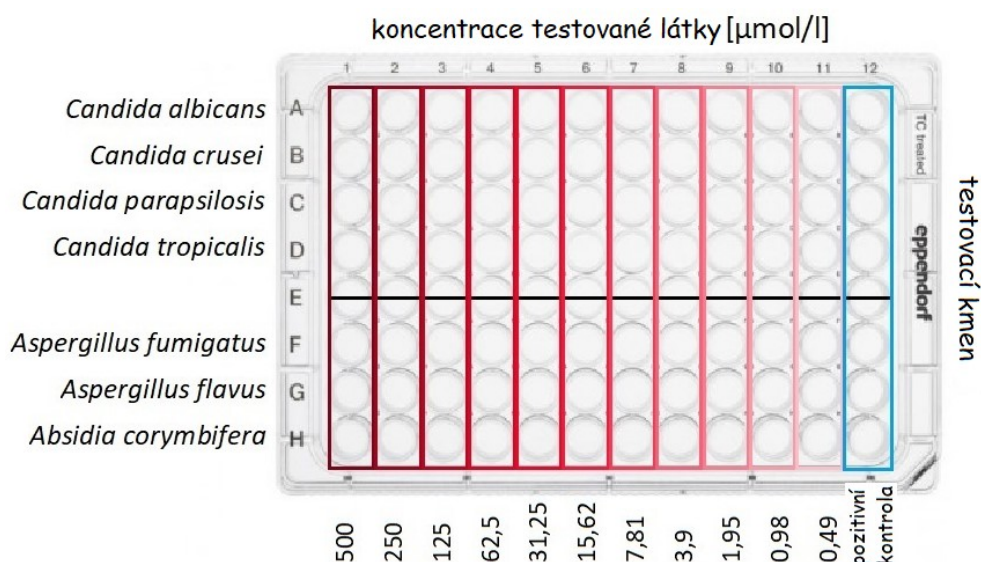


**Obrázek 39: Příprava dvojkové ředící řady**

Zdroj: Bc. Aneta Janků

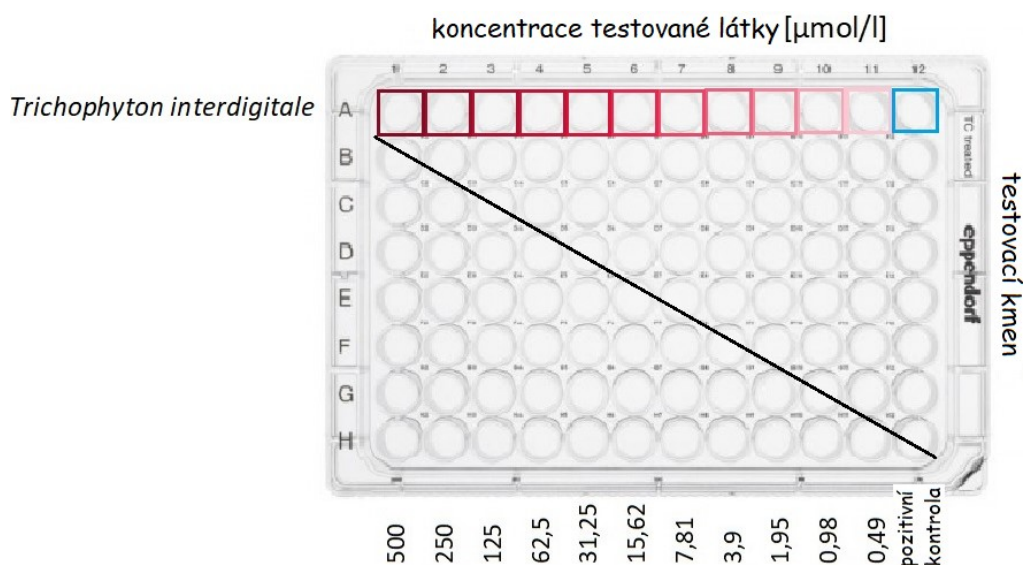
### 3.6.4 Pipetování do mikrotitračních destiček

Dvě sterilní mikrotitrační destičky bylo třeba řádně označit – číslem, datumem, kódem testované látky a příslušným kmenem. První destička sloužila k otestování citlivosti kmenů *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera*, druhá destička k otestování kmene *Trichophyton interdigitale*. Důvodem byla odlišná doba inkubace těchto kmenů. Pomocí 12kanálové pipety jsme napipetovali do všech řádků 1. destičky (vyjma řádku E) 200 µl zásobního roztoku (Obr. 40) a stejné množství i do prvního řádku 2. destičky (Obr. 41). Poté jsme přidali do každé jamky s roztokem 10 µl připravené suspenze testovacích kmenů.



**Obrázek 40: Pipetování do 1. mikrotitrační destičky**

Zdroj: [https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=20\\_162\\_77&product\\_id=150](https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=20_162_77&product_id=150) (upraveno)



**Obrázek 41: Pipetování do 2. mikrotitrační destičky**

Zdroj: [https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=20\\_162\\_77&product\\_id=150](https://www.biologicals.cz/e-shop/index.php?route=product/product&path=20_162_77&product_id=150) (upraveno)

Každá testovaná látka byla hodnocena v jiné mikrotitrační destičce (vyjma látek testovaných na kmen TI). V každém řádku byl jeden příslušný testovací kmen a ve sloupcích postupně klesající koncentrace testované látky. Poslední sloupec sloužil jako pozitivní kontrola, kde bylo možné pozorovat zákal (růst) na dně jamky.



### **3.6.5 Inkubace**

Mikrotitrační destičky bylo třeba zakrýt víčkem a nechat inkubovat v termostatu při teplotě 35 °C. Inkubace trvala 24 h a 48 h u 1. destičky a 72 h a 120 h v případě T1 u 2. destičky.

### **3.6.6 Vyhodnocení**

Vyhodnocení se provádělo vizuálně. Výsledky byly odečteny po uplynutí inkubační doby. U jednotlivých látek byla stanovena hodnota MIC – minimální inhibiční koncentrace antimykotika, při které nebyl patrný nárůst kvasinky či vláknité houby. V praxi se jednalo o první jamku, v níž byla tekutina čirá a bez zákalu.

## 4. VÝSLEDKY

Celkem bylo otestováno 54 nově syntetizovaných látek. V tabulkách 14–20 jsou uvedeny hodnoty MIC, při kterých došlo či nedošlo k inhibici růstu kandid a vláknitých hub. Byly odečítány ve dvou časových intervalech – po 24 h a 48 h (v případě *Trichophyton interdigitale* po 72 h a 120 h). Znaménko „>“ před čísly znamená, že ani při nejvyšší koncentraci testované látky s potencionální antimykotickou aktivitou nedošlo k potlačení růstu, tudíž nově syntetizovaná látka není účinná. V praxi se jedná o jamky, u kterých je na jejich dnu možné pozorovat zákal (růst).

V tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledné hodnoty testovaných látek č. 1–10. Většina z nich neprokázala žádnou antimykotickou aktivitu, kromě látek č. 4, 6 a 7.

**Látka č. 4 (OX-0e)** inhibovala růst kvasinky CK (*Candida krusei*) po 24 h inkubace při koncentraci 125 µmol/l a po 48 h při koncentraci 500 µmol/l. Dále inhibovala růst kvasinek CP (*Candida parapsilosis*) a CT (*Candida tropicalis*) po 24 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l.

**Látka č. 6 (OX-0g)** působila antimykoticky na všechny testované kmeny. Inhibovala růst kvasinek CA (*Candida albicans*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l, CK (*Candida krusei*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 62,5 µmol/l, CP (*Candida parapsilosis*) a CT (*Candida tropicalis*) po 24 h inkubace při koncentraci 62,5 µmol/l a 48 h při koncentraci 250 µmol/l. Dále inhibovala růst vláknitý hub AF (*Aspergillus fumigatus*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 250 µmol/l, AFla (*Aspergillus flavus*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l, AC (*Absidia corymbifera*) po 24 h inkubace při koncentraci 31,25 µmol/l a 48 h při koncentraci 62,5 µmol/l a TI (*Trichophyton interdigitale*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 62,5 µmol/l.

**Látka č. 7 (OX-15)** inhibovala růst kvasinky CK (*Candida krusei*) a CP (*Candida parapsilosis*) po 24 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l.

**Tabulka 14: Výsledky testovaných látek (1)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) Deriváty pyrazinyloxadiazolů (Dr. Marta Kučerová)									
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	125	>500	62,5	500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	500	>500	62,5	500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500

Legenda: 1. OX-0b, 2. OX-0c, 3. OX-0d, 4. OX-0e, 5. OX-0f, 6. OX-0g, 7. OX-15, 8. OX-17, 9. OX-18, 10. 1-OX-3C

V tabulce č. 15 jsou uvedeny hodnoty testovaných látek č. 11–17, z nichž antimykotickou aktivitu prokázaly pouze látky 12, 13, 16, 17. U ostatních látek nebyla zjištěna žádná antimykotická účinnost. U látky č. 15 (Tm) byla stanovena nejvyšší možná koncentrace 125  $\mu\text{mol/l}$  z důvodu nižší rozpustnosti.

**Látka č. 12 (Tp)** inhibovala růst kvasinky CK (*Candida krusei*) po 24 h, tak i po 48 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l a také vláknité houby TI (*Trichophyton interdigitale*) po 72 h a 120 h inkubace při koncentraci 125 µmol/l.

Dále byla zjištěna účinnost **látky č. 13 (Ta)** inhibující růst vláknité houby TI po 72 h inkubace při koncentraci 250 µmol/l, tak i po 120 h při koncentraci 500 µmol/l.

**Látka č. 16 (Ti)** slabě inhibovala růst TI po 72 h a 120 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l. **Látka č. 17 (Tt)** inhibovala růst TI po 72 h i po 120 h inkubace při koncentraci 250 µmol/l.

**Tabulka 15: Výsledky testovaných látek (2)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC (µmol.l <sup>-1</sup> ) Deriváty thiazolidindionů (Dr. Marta Kučerová)						
		11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
CK	24 h	>500	500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	500	>500	>500	>125	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500
TI	72 h	>500	125	250	>500	>125	500	250
	120 h	>500	125	500	>500	>125	500	250

Legenda: 11. TAb, 12. Tp, 13. Ta, 14. Tc, 15. Tm, 16. Ti, 17. Tt

Tabulka č. 16 shrnuje výsledky testovaných látek č. 18–26, přičemž antimykoticky účinné byly látky č. 18, 20, 23 a 25. Látka č. 21 (PC-MeAcr) dosáhla nejvyšší možné koncentrace 125 µmol/l, z důvodu nižší rozpustnosti.

**Látky č. 18 (PC-D-Ser)** a **č. 23 (PC-DCS)** vykazovaly aktivitu při koncentraci 500 µmol/l u kmene TI (*Trichophyton interdigitale*) v obou časových intervalech. **Látka č. 20 (PC-Gly)** je po 24 h i 48 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l na kmen CK (*Candida krusei*) slabě účinná. **Látka 25 (PC-L-Ala)** je účinná po 72 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l na kmen TI.

**Tabulka 16: Výsledky testovaných látek (3)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC (µmol.l <sup>-1</sup> ) Deriváty pyrazinkarboxamidů (PharmDr. Martin Juhás)								
		18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.
CA	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	500	>500	>500	>125	>500	500	>500	500	>500
	120 h	500	>500	>500	>125	>500	500	>500	>500	>500

Legenda: 18. PC-D-Ser, 19. PC-D-Ala, 20. PC-Gly, 21. PC-MeAcr, 22. PC-L-OBz-Ser, 23. PC-DCS, 24. 3Me-PC-DCS, 25. PC-L-Ala, 26. B-D-Ser

Tabulky č. 17 a 18 shrnují výsledky testovaných látek č. 27–39, které až na jednu výjimku nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu.

Jedná se o **látku č. 33 (PC-L-Ala-Et)**, která je po 72 h a 120 h inkubace při koncentraci 500 µmol/l na kmen TI (*T. interdigitale*) velmi slabě účinná.

**Tabulka 17: Výsledky testovaných látek (4)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC (µmol.l <sup>-1</sup> ) Deriváty pyrazinkarboxamidů obsahující ethylovou skupinu (Et) (PharmDr. Martin Juhás)						
		27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500

Legenda: 27. PC-DL-Val-Et, 28. PC-CPC-Et, 29. PC-DL-Leu-Et, 30. PC-DL-Phe-Et, 31. PC-Gly-Et, 32. PC-L-Asp-diEt, 33. PC-L-Ala-Et

**Tabulka 18: Výsledky testovaných látek (5)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) Deriváty pyrazinkarboxamidů obsahující ethylovou skupinu (Et) (PharmDr. Martin Juhás)					
		34.	35.	36.	37.	38.	39.
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Legenda: 34. PC-D-Ala-Et, 35. PC-L-Trp-Et, 36. PC-L-Tyr-Et, 37. PC-L-Glu-diEt, 38. 5Cl-PC-Gly-Et, 39. PC-D-Trp-Et

V tabulkách č. 19 a 20 jsou uvedeny látky č. 40–54, které kromě látek 40, 45, 47 a 50 nevykazují žádnou antimykotickou aktivitu. Látka č. 48 (5Cl-PC-L-Ile-Me) dosáhla nejvyšší možné koncentrace 250  $\mu\text{mol/l}$ , z důvodu nižší rozpustnosti.

U látky č. 40 (PC-DL-Ala-Me) došlo k inhibici růstu kvasinky CK (*C. krusei*) po 24 h a 48 h při koncentraci 250  $\mu\text{mol/l}$ .

**Látka č. 45 (PC-D-Pgl-Me)** inhibovala růst CT (*C. tropicalis*) po 24 h a 48 h inkubace při koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$ .

**Látky č. 47 (PC-L-Thr-Me) a 50 (PC-L-Met-Me)** inhibovaly růst TI (*T. interdigitale*) po 72 h a 120 h inkubace při koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tabulka 19: Výsledky testovaných látek (6)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) Deriváty pyrazinkarboxamidů obsahující methylovou skupinu (Me) (PharmDr. Martin Juhás)							
		40.	41.	42.	43.	44.	45.	46.	47.
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>

Legenda: 40. PC-DL-Ala-Me, 41. PC-L-Leu-Me, 42. PC-D-Val-Me, 43. PC-L-Val-Me, 44. PC-D-Leu-Me, 45. PC-D-Pgl-Me, 46. PC-L-OtBu-Thr-Me, 47. PC-L-Thr-Me



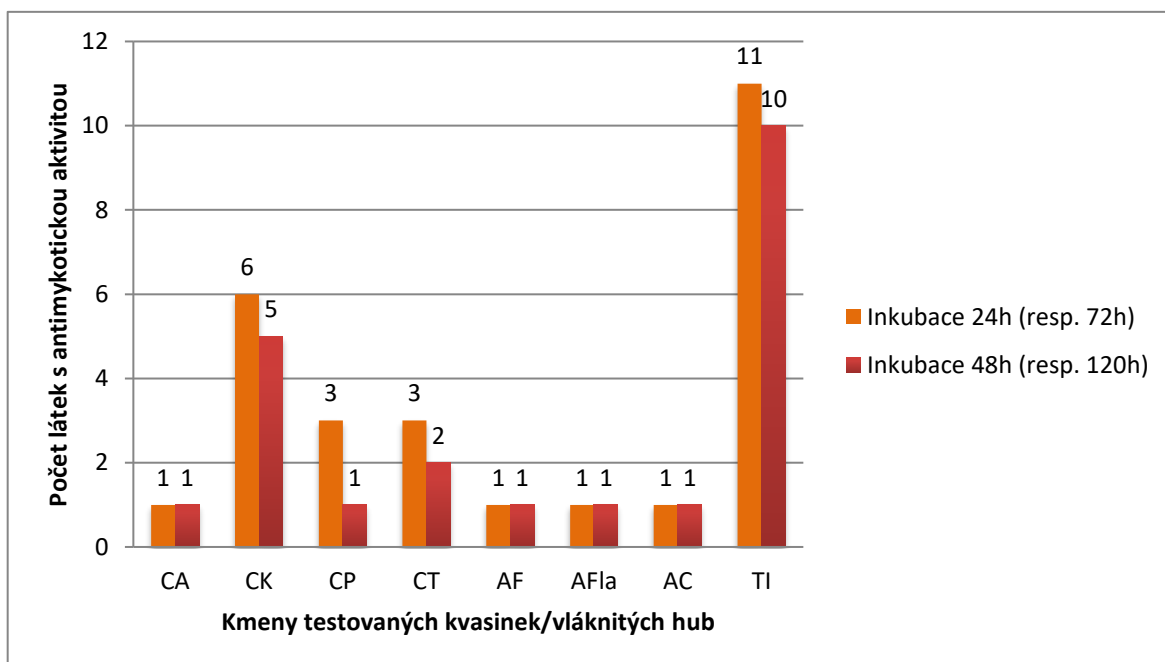
**Tabulka 20: Výsledky testovaných látek (7)**

Kmen (kód)	Inkubační doba	Testovaná látka (kód) – MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) Deriváty pyrazinkarboxamidů obsahující methylovou skupinu (Me) (PharmDr. Martin Juhás)						
		48.	49.	50.	51.	52.	53.	54.
CA	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CP	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AFla	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TI	72 h	>250	>500	500	>500	>500	>500	>500
	120 h	>250	>500	500	>500	>500	>500	>500

Legenda: 48. 5Cl-PC-L-Ile-Me, 49. 5Cl-PC-L-Leu-Me, 50. PC-L-Met-Me, 51. PC-L-OtBu-Ser-Me, 52. PC-L-Ser-Me, 53. PC-D-OtBu-Ser-Me, 54. PC-D-Ser-Me

Celkové zhodnocení výsledků znázorňuje **graf č. 1**, kde je uveden počet antimykoticky aktivních látek vůči vybraným testovaným kmenům kvasinek a vláknitých hub.

**Graf 1: Celkové zhodnocení testovaných látek**



*Legenda: CA - Candida albicans, CK - Candida krusei, CP - Candida parapsilosis, CT - Candida tropicalis, AF - Aspergillus fumigatus, AFla - Aspergillus flavus, AC - Absidia corymbifera, TI - Trichophyton interdigitale*

Osa „x“ znázorňuje jednotlivé testované kmeny kvasinek a vláknitých hub, osa „y“ množství látek, které prokázaly určitou antimykotickou aktivitu. **Oranžový** sloupec značí počet látek se zaznamenanou aktivitou s odečtem po 24 h (v případě TI po 72 h) a **červený** sloupec znázorňuje počty látek s aktivitou zaznamenanou po inkubaci dlouhé 48 h (v případě TI dlouhé 120 h).

## 5. DISKUSE

Invazivní (systémové) plísňové infekce patří mezi nejzávažnější nemoci, které lze u lidí léčit. Přestože mají nižší výskyt ve srovnání s povrchovými mykotickými infekcemi, velkou měrou přispívají k nárůstu morbidity a mortality. Efektivní léčbu těchto infekcí komplikuje např. jejich obtížná diagnostika, ne zcela optimální účinnost některých antimykotik, či jejich nadměrné užívání, čímž dochází ke vzniku rezistence vůči těmto látkám. Proto, aby mohla být do budoucna zkvalitněna zdravotní péče o pacienty postižené mykotickými infekcemi, je velmi důležité pracovat na vývoji spolehlivých metod, určených k testování antifungální citlivosti a zároveň na výzkumu nových léčiv, což zahrnuje i velmi podstatný screening (vyhledávání) nových antimykoticky účinných látek. (Rauseo, 2020)

Cílem této diplomové práce bylo otestovat 54 nově syntetizovaných látek s potenciální antimykotickou aktivitou. Vzorky sloučenin byly do laboratoře dodány z katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy). K testování citlivosti byly vybrány čtyři kmeny kvasinek – *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* a čtyři kmeny vláknitých hub – *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton interdigitale*. Dva kmeny kvasinek (CK, CP) a kmen AF byly zároveň kontrolními kmeny doporučenými postupy EUCAST pro ověření validnosti metody při testování antimykotické aktivity.

První skupina testovaných látek obsahovala 10 derivátů pyrazinyloxadiazolu. Antimykotickou aktivitu vykazovaly pouze 3 sloučeniny – **OX-0e**, **OX-0g** a **OX-15**. Látka **OX-0e** byla slabě účinná vůči kmenům CK, CP a CT. Stejně tak látka **OX-15** prokázala nízkou účinnost ke kmenům CK a CP. Nejsilnější antimykotickou aktivitu vykazovala látka **OX-0g**, která inhibovala růst všech kmenů kvasinek i vláknitých hub. Nejúčinnější byla v případě kmene AC, kde došlo k inhibici po 24 h inkubace při koncentraci 31,25  $\mu\text{mol/l}$ . U této látky je velmi pravděpodobné, že bude podrobena dalšímu testování a zkoumání z důvodu jejích významných antimykotických účinků. Tyto tři látky, které byly antimykoticky aktivní, se od sebe odlišují v substituentech na postranním řetězci oxadiazolového kruhu. Z důvodu nízkého počtu aktivních

sloučenin není možné zhodnotit, zda substituce alkylovým zbytkem či benzenovým jádrem ovlivňuje antimykotickou aktivitu. Zdá se však, že kombinace alkylového řetězce a chloru může zvyšovat aktivitu.

Druhá skupina testovaných látek obsahovala celkem 7 derivátů thiazolidindionu, přičemž antimykoticky účinné byly 4 látky – **Tp, Ta, Ti** a **Tt**. Nejsilnější antimykotickou aktivitu z nich prokázala látka **Tp**, která inhibovala růst TI po 72 h (resp. po 120 h) inkubace při koncentraci 125  $\mu\text{mol/l}$  a zároveň kmene CK při koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$ . Zbylé látky **Ta, Ti** a **Tt** vykazaly alespoň slabou antimykotickou aktivitu vůči kmenu TI v koncentracích buď 250  $\mu\text{mol/l}$  nebo 500  $\mu\text{mol/l}$  v obou inkubačních intervalech. Ze struktury těchto látek nelze posoudit, která substituce má příznivý vliv na jejich antimykotickou účinnost, neboť nevykazují prakticky žádnou významnou antimykotickou aktivitu.

Třetí a zároveň nejpočetnější skupinu testovaných látek představují deriváty pyrazinkarboxamidu substituované aminokyselinami, z nichž některé jsou esterifikovány (ethyl estery či methyl estery).

Derivátů pyrazinkarboxamidu, které neobsahovaly ethylesterovou, ani methylesterovou skupinu, bylo celkem 9, z nichž antimykoticky aktivní byly pouze 4 sloučeniny – **PC-D-Ser, PC-Gly, PC-DCS** a **PC-L-Ala**. Tyto látky vykazovaly inhibiční účinek vůči kmenům TI a CK, avšak při nejvyšší možné koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$ . V tomto případě není opět možné hodnotit vliv chemické struktury na aktivitu těchto látek, neboť nevykazovaly významnou účinnost.

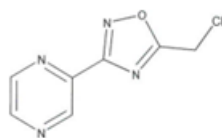
U derivátů pyrazinkarboxamidu s ethylesterovou vazbou na aminokyseliny vykazovala antimykotickou aktivitu (z celkem 13 sloučenin) pouze 1 látka – **PC-L-Ala-Et**, která velmi slabě účinkovala při koncentraci 500  $\mu\text{mol/l}$  pouze na kmen TI.

V případě derivátů pyrazinkarboxamidu s methylesterovou skupinou u aminokyselin, kterých bylo celkem 15, byly antimykoticky účinné pouze 4 látky. Nejsilnější účinek měla látka **PC-DL-Ala-Me**, která inhibovala růst kvasinky CK v obou inkubačních intervalech při koncentraci 250  $\mu\text{mol/l}$ . Látky **PC-D-Pgl-Me, PC-L-Thr-Me** a **PC-L-Met-Me** inhibovaly naopak růst kmenů CT a TI, avšak bylo zapotřebí použít nejvyšší možnou koncentraci těchto látek. U této skupiny látek se opět nedají

predikovat vztahy mezi strukturou a účinkem, jelikož aktivita těchto sloučenin je z klinického hlediska nevýznamná.

Z výsledků testování pyrazinkarboxamidových derivátů je zřejmé, že tyto sloučeniny nejsou vhodné pro vývoj nových antimykotických látek, z důvodů jen velmi slabého antimykotického účinku. Na druhou stranu je toto žádoucí výsledkem, jelikož tyto látky byly syntetizovány primárně jako antimykobakteriálně působící sloučeniny. Jejich antituberkulotická aktivita byla také prokázána. (Juhás, 2020)

Z celého výzkumu je patrné, že celkem 16 látek vykazovalo antimykotickou aktivitu. Nejvíce citlivým kmenem vůči testovaným látkám byl kmen TI, který dokázalo inhibovat po 72 h inkubace 11 antimykoticky působících látek. V případě prodloužené doby inkubace (tzn. 120 h) inhibovalo růst TI pouze 10 sloučenin. Jako nejméně citlivé lze v tomto případě označit kmeny CA, AF, AFla, AC. Nejvíce účinnou sloučeninou pak byl derivát pyrazinyloxadiazolu s označením **OX-0g**, jehož aktivita byla významná a bylo by vhodné dále pokračovat s biologickým hodnocením (např. stanovení cytotoxicity).



**OX-0g**

V závěru diskuse je nutné zmínit, že práce v laboratoři vyžaduje plnou soustředěnost a pečlivost laboranta, aby se předešlo případnému vzniku chyb při testování potenciálně antimykoticky účinných látek, které by pak mohly vést k falešně negativnímu či falešně pozitivnímu výsledku. Lze tedy doporučit, aby testování bylo prováděno opakovaně, čímž se potvrdí správnost výsledků a zároveň vyloučí případné chyby.

## 6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo otestovat 54 nově syntetizovaných, potencionálně antimykoticky účinných sloučenin, dodaných do laboratoře z katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Samotné testování antifungální citlivosti proběhlo v laboratoři katedry Biologických a lékařských věd (na FaF UK v HK) s použitím mikrodiluční bujónové metody, kde byly jako testovací kmeny použity konkrétní druhy kvasinek a vláknitých hub. Z celkového hodnocení výsledků je patrné, že antimykotickou účinnost prokázalo celkem 16 sloučenin. Nejvíce účinná byla látka OX-0g (derivát pyrazinyloxadiazolu), která jako jediná inhibovala růst všech testovaných kmenů a zároveň v nízké koncentraci prokázala silný inhibiční účinek vůči kmenu *Absidia corymbifera*.

Výsledky experimentální části této práce přispěly k celkovému vývoji nových antimykoticky účinných látek, které aby mohly být v klinické praxi užívány jako léčiva, musí podstoupit další velmi složité a nákladné fáze výzkumu.

## 7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení antimykotik .....	28
Tabulka 2: Přehled nových antimykotik ve vývoji, jejichž cílovou strukturou je buněčná stěna .....	40
Tabulka 3: Přehled nových antimykotik ve vývoji, jejichž cílovou strukturou je buněčná membrána .....	41
Tabulka 4: Přehled nových antimykotik ve vývoji působících na intracelulární struktury fungální buňky .....	42
Tabulka 5: Porovnání metodiky standardizované mikrodiluční metody schválené institucemi EUCAST a CLSI.....	47
Tabulka 6: Testované kmeny kvasinek a vláknitých hub .....	59
Tabulka 7: Přehled testovaných látek (1).....	61
Tabulka 8: Přehled testovaných látek (2).....	62
Tabulka 9: Přehled testovaných látek (3).....	63
Tabulka 10: Přehled testovaných látek (4) .....	64
Tabulka 11: Přehled testovaných látek (5) .....	66
Tabulka 12: Hodnoty standardů antimykotik pro kvasinky .....	68
Tabulka 13: Hodnoty standardů antimykotik pro vláknité houby .....	68
Tabulka 14: Výsledky testovaných látek (1).....	75
Tabulka 15: Výsledky testovaných látek (2).....	76
Tabulka 16: Výsledky testovaných látek (3).....	77
Tabulka 17: Výsledky testovaných látek (4).....	78
Tabulka 18: Výsledky testovaných látek (5).....	79
Tabulka 19: Výsledky testovaných látek (6).....	80
Tabulka 20: Výsledky testovaných látek (7).....	81

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec cholesterolu a ergosterolu .....	14
Obrázek 2: Struktura buněčné stěny hub .....	14
Obrázek 3: Kolonie <i>Candida albicans</i> (SAB glukózový agar, 48 h při 37 °C) .....	16
Obrázek 4: Kolonie <i>Candida parapsilosis</i> (SAB glukózový agar, 48 h při 37 °C)..	16
Obrázek 5: Kolonie <i>Candida tropicalis</i> (A: SAB glukózový agar, B: chromogenní kandidový agar, 48 h při 37 °C) .....	17
Obrázek 6: Kolonie <i>Candida krusei</i> (A: SAB glukózový agar, B: chromogenní kandidový agar, 48 h při 37 °C) .....	17
Obrázek 7: <i>Candida albicans</i> : a) kvasinka jako oválná buňka – blastokonidie, b) pseudohyfy – protáhlé blastokonidie, c) pravé hyfy .....	18
Obrázek 8: Kolonie <i>Aspergillus fumigatus</i> (SAB agar, 72 h při 27 °C).....	19
Obrázek 9: <i>Aspergillus fumigatus</i> (mikroskopické zobrazení) .....	20
Obrázek 10: <i>Aspergillus fumigatus</i> – mikromorfologický popis .....	20
Obrázek 11: Kolonie <i>Aspergillus flavus</i> (SAB agar, 72 h při 27 °C).....	20
Obrázek 12: <i>Aspergillus flavus</i> (mikroskopické zobrazení).....	21
Obrázek 13: <i>Aspergillus flavus</i> – mikromorfologický popis .....	21
Obrázek 14: <i>Absidia corymbifera</i> (SAB agar, 4 dny při 30 °C).....	22
Obrázek 15: <i>Absidia corymbifera</i> (mikroskopické zobrazení).....	22
Obrázek 16: Rod <i>Trichophyton</i> – artrospory.....	23
Obrázek 17: <i>Trichophyton interdigitale</i> (SAB glukózový agar, 3 týdny při 20 °C)24	
Obrázek 18: Lokalizace hlubokých mykóz ve srovnání s povrchovými, kožními a podkožními mykózami .....	26
Obrázek 19: Struktura AmB a Nys.....	31
Obrázek 20: Struktura natamycinu .....	31
Obrázek 21: Vazba amfotericinu B na ergosterol .....	32
Obrázek 22: Včlenění antimykotika do buněčné membrány .....	32
Obrázek 23: Typy transmembránových „kanálů“ v plazmatické membráně .....	33
Obrázek 24: Transmembránový "kanál" tvořený amfotericinem B .....	33
Obrázek 25: Cytoplazmatická membrána hub – únik intracelulárních kationtů 34	



Obrázek 26: Fáze vývoje nového léčiva .....	39
Obrázek 27: Cílová místa nových antimykotik .....	40
Obrázek 28: Diskový difúzní test .....	49
Obrázek 29: E-test .....	50
Obrázek 30: Agarová diluční metoda .....	51
Obrázek 31: Bujónová makrodiluční metoda – ve zkumavkách .....	52
Obrázek 32: Bujónová mikrodiluční metoda – mikrotitrační destička .....	53
Obrázek 33: Neo-Sensitabs .....	54
Obrázek 34: Fungitest (ukázka z praxe) .....	55
Obrázek 35: Fungitest – schéma testovací destičky .....	55
Obrázek 36: ATB Fungus 3 .....	56
Obrázek 37: Sensititre YeastOne .....	57
Obrázek 38: VITEK 2 AST-YS .....	57
Obrázek 39: Příprava dvojkové ředící řady .....	71
Obrázek 40: Pipetování do 1. mikrotitrační destičky .....	72
Obrázek 41: Pipetování do 2. mikrotitrační destičky .....	72

## 9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Celkové zhodnocení testovaných látek.....	82
---	----

## 10. POUŽITÁ LITERATURA

1. ADAMS D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 2004; **150** (7): 2029 - 2035. Doi: 10.1099/mic.0.26980-0. ISSN 1350-0872.
2. ALI M. F., REZAEI A., RAIESI O. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2018; **5** (2): 48 - 55. Doi: 10,29252 / jbrms.5.2.48.
3. Antifungal medicines. NHS. UK. 2017. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/antifungal-medicines/>.
4. Antifungal pharmacology: Fungal Cell Structure and Targets. *Mycoses Study Group Education and Research Consortium*. USA, 2020. Dostupné z: <https://drfungus.org/knowledge-base/antifungal-pharmacology/>.
5. BEDNÁŘ M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
6. BENÁKOVÁ N. *Dermatovenerologie, dětská dermatologie a korektivní dermatologie: trendy v medicíně*. Praha: Triton, 2006. ISBN 80-725-4855-7.
7. BENNETT J. W., KLICH M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; **16** (3): 497–516. Doi: 10.1128/cmr.16.3.497-516.2003.
8. BOWMAN S. M., FREE S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006; **28** (8): 799-808. Doi: 10.1002/bies.20441.
9. BRAJTBURG J., POWDERLY W. G., KOBAYASHI G. S., MEDOFF G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990; **34** (2): 183–188. Doi: 10.1128/aac.34.2.183.
10. BUCHTA V. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, 2009, **6** (3): 155-164. ISSN 1803-5310.
11. BUCHTA V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4565-5.

12. CLEMONS K. V., STEVENS D. A. Comparison of fungizone, Amphotec, AmBisome, and Abelcet for treatment of systemic murine cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; **42** (4): 899–902.
13. DIAMANTOVÁ D. Léčba mykóz. *Interní medicína pro praxi*. Solen, 2003; **5** (10): 8-1031. ISSN 1803-5256.
14. DOHNAL V., JEŽKOVÁ A., SKLÁDANKA J. Ergosterol: klíčový steroid hub. *Popularizace vědy*. 2008; **10**: 247–482. ISSN 1212-4117.
15. EUCAST. Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts and moulds as recommended by EUCAST. Version 4.0, 2020. Dostupné z: <http://www.eucast.org>.
16. FESEL P., PHILIPP H., ZUCCARO A. B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*. 2016, **90**: 53-60. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.004.
17. FUNGITEST™. Bio-rad. Francie, 2020. Dostupné z: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/60780\\_881060\\_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/60780_881060_CZ.pdf).
18. GHANNOUM M. A, RICE L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; **12** (4): 501–517.
19. GOW N. A. R., LATGE J. P., MUNRO C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*. 2017, **5** (3). Doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
20. GOW N. A. R., VEERDONK F. L., BROWN A. J. P., NETEA M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; **10** (2): 112–122. Doi: 10.1038/nrmicro2711.
21. GRAEME K. A. Mycetism: a review of the recent literature. *Journal of Medical Toxicology*. 2014; **10** (2): 173–189. Doi: 10.1007/s13181-013-0355-2.

22. GRAY K. C., PALACIOS D. S., DAILEY I. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 2012; **109** (7): 2234–2239. Doi:10.1073/pnas.1117280109.
23. HABER J. Echinokandiny – nová skupina antimykotik. *CZ Pharma*, 2008. ISSN 1803-5256.
24. HENDRYCHOVÁ T., MALÝ J. Volně prodejná antimykotika. *Praktické lékařství*. Solen, 2011, **7** (3): 132-137. ISSN 1803-5329.
25. HORÁK P. *Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů*. *Interní medicína pro praxi*. Solen, 2011; **13** (4): 171-175. ISSN 1803-5256.
26. CHRDLA A., MALLÁTOVÁ N., VAŠÁKOVÁ M., HABER J., DENNING D. W. Burden of serious fungal infections in the Czech Republic. *Mycoses*. 2015; **58** (6). Doi: 10.1111/myc.12384.
27. JÍLEK P. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.
28. JUHÁS M., KUČEROVÁ L., HORÁČEK O., JANĎOUREK O., KUBÍČEK V., KONEČNÁ K., KUČERA R., BÁRTA P., JANOUŠEK J., PATEROVÁ P., KUNEŠ J., DOLEŽAL M., ZITKO J. N-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents—the Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules*. 2020; **25** (7): 1518. Doi: 10.3390/molecules25071518.
29. JULÁK J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
30. KANG X., KIRUI A., MUSZYŃSKI A., WIDANAGE M. C. D., CHEN A., AZADI P., WANG P., MENTINK-VIGIER F., WANG T. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*. 2008. Doi: 10.1038/s41467-018-05199-0.
31. KETLLYN S. V., FERMINO B. L., AACUTE R. A., CARDOSO C. S., ACUTE L. N. Difficulties in antifungal therapy with amphotericin B and the continuous

- search for new formulations: A literature review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016, **10** (24): 512-520. Doi: 10.5897/AJPP2015.4280.
32. KIBBLER C., BARTON R., GOW N., HOWELL S., MACCALLUM D., MANUEL R., READ N. Fungal cell structure and organization. *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2020. Doi: 10.1093/med/9780198755388,003.0004.
33. KOĐOUSEK R. *Mykózy: lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0649-7.
34. KRISTANC L., BOŽIČ B., JOKHADAR Š. Z., DOLENC M. S., GOMIŠČEK G. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2019; **1861** (2): 418-430. Doi: 10.1016/j.bbamem.2018.11.006.
35. LEPESHEVA G. I., WATERMAN M. R. Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011; **11** (16): 2060–2071. Doi: 10.2174/156802611796575902.
36. LINCOVÁ D., FARGHALI H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
37. LORETO S., TONDOLO S. M. Epidemiology of Invasive Fungal Infection - An Overview. *Fungal Infection*. 2019. Doi: 10.5772/intechopen.85955.
38. MALLÁTOVÁ N. Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. *Vnitřní lékařství*. 2007. ISSN 1803-6597.
39. MALLÁTOVÁ N. Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. *Zdravotnictví a medicína*. 2011. ISSN 1212-4184.
40. MALLÁTOVÁ N., MENCL K. Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy. *Zdravotnictví a medicína*. 2010. ISSN 2336-2987.
41. MELTER O., MALMGREN A. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.

42. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assay. *Emery Pharma: Microbiology and Cell Biology, Medicinal Chemistry*. USA, 2020.  
Dostupné z: <https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration/>.
43. MONDELLO F. *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2008. ISSN 1123-3117.
44. NEO-SENSITABS™. *BioVendor*. Brno, 2013.  
Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/posaconazole-posac-5-neosensitab-tablety/p91.82612N/#tab=downloads>.
45. NOVÁK I. Antimykotická profylaxe u nemocných na jednotkách intenzivní péče. *Zdravotnictví a medicína*. 2009. ISSN 1212-4184.
46. OSTRÝ V. *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-707-1102-7.
47. OTČENÁŠEK M. *Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních*. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0059-8.
48. PEUTHERER J. F., SLACK R. C. B., GREENWOOD D. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9365-0.
49. PFALLER M. A., ESPINEL-INGROFF A., JONES R. N. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; **42** (10): 4577–4580. Doi: 10.1128/JCM.42.10.4577-4580.2004.
50. 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.

51. RAUSEO A. M., COLER-REILLY A., LARSON L., SPEC A. Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020. Doi: 10.1093/ofid/ofaa016.
52. ROZSYPAL H. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie*. Olomouc: Solen, 2008, **22** (1): 40-44. ISSN 1803-5353.
53. 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. Doi: 10.1128/MMBR.00045-10.
54. SCHINDLER J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
55. SINGH A., MASIH A., KHURANA A., SINGHP. K., GUPTA M., HAGEN F., MEIS J. F., CHOWDHARY A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*. 2018, **61** (7): 477-484. Doi: 10.1111/myc.12772.
56. SLÍVA J., VOTAVA M. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-424-7.
57. SOUČKOVÁ L., KOSTKOVÁ H., DEMLOVÁ R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékárenství*. Solen, 2015; **11** (4): 144–147. ISSN 1803-5329.
58. SOW D., DIENGY P., NDIAYE M. Etude du profil génétique des souches de *Candida* isolées au Sénégal. 2013. Dostupné z: [http://www.pathexo.fr/docfiles/06\\_-\\_profil\\_genetique\\_des\\_candida,\\_sow\\_d.\\_spe\\_2013.pdf](http://www.pathexo.fr/docfiles/06_-_profil_genetique_des_candida,_sow_d._spe_2013.pdf).
59. Stanovení citlivosti na ATM (kvantitativní metoda - E-TEST). ÚLBLD 1. LF UK A VFN. Praha, 2006-2020. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni?vysetreni=1412>.
60. ŠPAČEK J., BUCHTA V., JÍLEK P. *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4554-1.



61. URBÁŠKOVÁ P., ŽEMLIČKOVÁ H., HRABÁK J. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ)*, Praha, 2010; **19** (9): 266–267.
62. VOSMÍK F., SKOŘEPOVÁ M. *Dermatomykózy: diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí*. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-858-2423-X.
63. VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
64. VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
65. WALSH T. J., DIXON D. M. Spectrum of Mycoses. *Medical Microbiology*. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. PMID: 21413276.
66. 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.
67. WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, 163–175. Doi: 10.1038/nprot.2007.521.
68. YOON H. J., CHOI H. Y., KIM Y. K., SONG Y. J., KI M. Prevalence of fungal infections using National Health Insurance data from 2009-2013, South Korea. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 2014. Doi: 10.4178/epih/e2014017.
69. ZAZULA R., SCHINDLER I., SPÁLENÝ A., VAŠÁKOVÁ M., DUTKA J. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, 2005, **7** (7): 349-353. ISSN 1803-5256.
70. ZHANG L., WANG H., XIAO M. The widely used ATB FUNGUS 3 automated readings in China and its misleading high MICs of *Candida* spp. to azoles: challenges for developing countries' clinical microbiology labs. *PLOS One*. 2014; **9** (12). Doi: 10.1371/journal.pone.0114004.

71. ZHANG M., JIANG L., LI F., XU Y., LV S., WANG B. Simultaneous dermatophytosis and keratomycosis caused by *Trichophyton interdigitale* infection: a case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*. 2019; **19** (1): 983. Doi: 10.1186/s12879-019-4612-0.