

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

**VYHODNOCENÍ AKTIVITY POTENCIÁLNĚ  
ANTIFUNGÁLNÍCH LÁTEK POMOCÍ MIKRODILUČNÍ  
BUJONOVÉ METODY II**  
(diplomová práce)

**Hradec Králové, 2010**

**Eliška Fučíková**

## **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.

Za odborné vedení, pomoc při vypracování diplomové práce a trpělivost děkuji Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. Dále mé díky patří paní Idě Dufkové za pomoc při práci v laboratoři.

21. 2. 2010

Fučíková Eliška

# OBSAH

OBSAH.....	3
SEZNAM ZKRATEK.....	5
1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Klasifikace hub – říše Fungi .....	9
2.2 Obecná charakteristika hub.....	11
2.3 Morfologie .....	12
2.4 Patogenita.....	12
2.5 Epidemiologie.....	13
2.6 Laboratorní diagnostika.....	13
2.6.1 Mikroskopie .....	13
2.6.2 Kultivace.....	13
2.6.3 Biochemická identifikace .....	14
2.6.4 Nepřímý průkaz .....	14
2.6.5 Přímý průkaz .....	14
2.7 Chorobné stavy vyvolané houbami .....	14
2.7.1 Mycetismy .....	14
2.7.2 Mykotoxikózy .....	14
2.7.3 Mykoalergózy .....	15
2.7.4 Mykózy .....	15
2.8 Systém lékařsky významných hub .....	16
2.8.1 Zygomycetes (houby spájkivé).....	16
2.8.2 Ascomycetes (houby vřeckovýtrusé).....	16
2.8.3 Basidiomycetes (houby stopkovýtrusé).....	16
2.8.4 Deuteromycetes – Fungi imperfecti (houby nedokonalé).....	16
2.9 Přehled testovacích kmenů kvasinek a vláknitých hub.....	17
2.9.1 <i>Candida albicans</i> .....	17
2.9.2 <i>Candida tropicalis</i> .....	17
2.9.3 <i>Candida krusei</i> .....	18
2.9.4 <i>Candida glabrata</i> .....	18
2.9.5 <i>Trichosporon beigelii</i> .....	18
2.9.6 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	18
2.9.7 <i>Absidia corymbifera</i> .....	19
2.9.8 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	19
2.10 Antimykotika.....	19
2.10.1 Polyenová antibiotika.....	20
2.10.2 Azolová antimykotika.....	22
2.10.3 Allylaminy .....	25
2.10.4 Morfoliny.....	26
2.10.5 Jiná antimykotika .....	27
2.10.6 Současná antimykotická léčba .....	29
2.11 Testování citlivosti k antifungálním látkám in vitro.....	30
2.11.1 Difúzní disková metoda .....	31
2.11.2 Gradientová difúzní metoda v agaru (E – test).....	31

2.11.3	Diluční metody	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1	Pomůcky	33
3.2	Přístroje	33
3.3	Chemikálie	33
3.4	Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub	33
3.5	Složení a příprava médií	34
3.5.1	Sabouraudův glukózový agar	34
3.5.2	RPMI 1640 (5x koncentrované růstové médium) KlinLab – Praha 34	
3.6	Příprava MOPS (Sigma)	35
3.7	Příprava růstového média	35
3.8	Příprava suspenzí testovaných kmenů hub	35
3.9	Příprava ředící řady testované látky – vlastní pokus	36
3.9.1	Testované koncentrace látky:	37
3.10	Pipetování do destičky	37
4	SEZNAM TESTOVANÝCH LÁTEK	39
4.1	Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny	39
4.2	Arylaminopyraziny	40
4.3	Pyrazin – 2,3 – dinitrily	42
4.4	Estery pyrazinkarboxylové kyseliny	47
4.5	Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin- 4-onu	48
4.6	Estery cholesterolu a alkanových kyselin	49
4.7	Deriváty thiosalicylamidu	50
4.8	Diamidy	52
4.9	Styryl benzoxazoly	55
4.10	Benzoxazepin – diony	56
5	VÝSLEDKY	58
5.1	Anilidy pyrazinkarboxylových kyselin	58
5.2	Arylaminopyraziny	59
5.3	Pyrazin – 2,3 – dinitrily	60
5.4	Estery pyrazinkarboxylové kyseliny	64
5.5	Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin- 4-onu	65
5.6	Estery cholesterolu a alkanových kyselin	66
5.7	Deriváty thiosalicylamidu	67
5.8	Diamidy	69
5.9	Styryl benzoxazoly	71
5.10	Benzoxazepin – diony	72
6	DISKUSE	73
7	ZÁVĚR	79
8	LITERATURA	80

## SEZNAM ZKRATEK

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming unit, jednotka tvořící kolonii
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
D	pravotočivost
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, analýza pomocí enzymu vázaného na imunosorbent
L	levotočivost
M	molární hmotnost
m	hmotnost v gramech
mg	miligramy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOPS	3-[N-morfolino] propansulfonová kyselina
MPa	megapascal
NaOH	hydroxid sodný
odd.	oddělení
pH	potential of hydrogen, potenciál vodíku, vodíkový exponent
RPMI 1640	5x koncentrované růstové médium
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
ř.	řád
TB	<i>Trichosporon beigelii</i>
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tř.	třída
μl	mikrolitr

# ABSTRAKT

Eliška Fučíková

Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody II

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Cílem mé diplomové práce bylo otestovat potenciálně antifungální látky. Testovali jsme celkem 10 skupin látek: anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny, arylaminopyraziny, pyrazin-2,3-dinitrily, estery pyrazinkarboxylové kyseliny, deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu, estery cholesterolu a alkanových kyselin, deriváty thiosalicylamidu, diamidy, styrylbenzoxazoly a benzoxazepin-diony.

Metody: Testování probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody.

Výsledky: Nejvýraznější antifungální aktivitu vykazovaly deriváty thiosalicylamidu, u kterých byly hodnoty MIC velmi nízké téměř u všech testovaných kmenů hub.

Závěry: Zjistili jsme, že největší antimykotický účinek se projevuje při substituci halogenem, nejvíce chlorem.

## **ABSTRACT**

Eliška Fučíková

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

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Specialist in laboratory methods

Background: The aim of this thesis was to test substances with potential antifungal effect. We tested a totally 10 categories of substances: anilides of pyrazincarboxyl acid, arylaminopyrazines, pyrazin-2.3-dinitriles, pyrazincarboxyl acid esters, derivatives of (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-on, cholesterol and alkane acids esters, derivatives of thiosalicylamid , diamides, styrylbenzoxazoles, benzoxazepin-diones.

Methods: The assesment was carried out using the microdilution broth method.

Results: The most striking antifungal activity exhibit derivatives of thiosalicylamid for which MIC values were very low in almost all scale of concentration for all tested fungi.

Conclusions: We found that the greatest antimycotic activity is manifested with the substitution of a halogen, mostly by chlorine.

# 1 ÚVOD

Se vzestupem výskytu mykotických onemocnění se zvyšuje úsilí k vývoji nových, méně toxických a účinnějších antimykotických preparátů. Hlavním důvodem zvyšujícího se počtu pacientů s mykózami jsou imunosuprimovaní pacienti, kteří jsou léčeni cytostatiky, ať už z důvodů transplantací či HIV infekce. Ke zvýšení incidence mykóz přispívají i invazivní procedury, používání implantátů z umělých hmot a nepříznivě se odrazila i vysoká, v mnoha případech i zbytečná spotřeba širokospektrých antibiotik.

Mezi nejzávažnější mykotická onemocnění patří systémové mykózy, zahrnující nejčastěji kandidózy, aspergilózy a kryptokokózy. Tyto infekce zvyšují, především u imunoalterovaných pacientů, mortalitu a morbiditu.

Vyšetření citlivosti k antimykotikům se provádí za účelem zjistit, zda vůbec a do jaké míry je kvasinka či plíseň citlivá *in vitro*. Cílem vyšetření citlivosti je návrh terapie a dávkování daného antimykotika.

V mé diplomové práci jsem se zabývala testováním nově syntetizovaných, potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody, tedy v podmínkách *in vitro*. Tyto sloučeniny byly připravené na Katedře anorganické a organické chemie a na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Testovaných kmenů kvasinek a plísní bylo osm, jednalo se o tyto potenciálně patogenní houby: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon beigelii* (*T. asahii*) a *Trichophyton mentagrophytes*.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Klasifikace hub – říše *Fungi*

Klasifikace hub je založena především na jejich ontogenetickém vývoji a způsobu pohlavního rozmnožování, které spočívá ve střídání jaderných fází s karyogamií a s meioitickým dělením. Dále pak na základě charakteru a tvaru stélek, významu jednotlivých skupin a ekologická, evoluční a fylogenetická návaznost (Ambrožová, 2007).

Odd. Chytridiomycota - houby buněkotvaré

Tř. Chytridiomycetes

- ř. Chytridiales
- ř. Spizellomycetales
- ř. Blastocladales
- ř. Monoblepharidales

Odd. Microsporidiomycota - mikrosporidie

Odd. Eumycota – pravé houby

Pododd. **Zygomycotina** - houby spájkivé

- Tř. Zygomycetes
  - ř. Mucorales
  - ř. Endogonales
  - ř. Glomales
  - ř. Entomophthorales
  - ř. Zoopagales
  - ř. Dimargaritales
  - ř. Kickxellales
- Tř. Trichomycetes

Pododd. **Ascomycotina** – houby vřeckaté

- Tř. Hemiascomycetes

- ř. Saccharomycetales
- ř. Schizosaccharomycetales
- ř. Protomycetales
- ř. Taphrinales
- Tř. Ascomycetes - houby vřeckovýtrusé
  - ř. Laboulbeniales
  - ř. Eurotiales
  - ř. Pezizales
  - ř. Erysiphales
  - ř. Helotiales
  - ř. Rhytismatales
  - ř. Hypocreales
  - ř. Microascales
  - ř. Diaporthales
  - ř. Ophiostomatales
  - ř. Sordariales
  - ř. Boliniales
  - ř. Xylariales
  - ř. Diatrypales
  - ř. Phyllachorales
  - ř. Dothideales
  - ř. Pleosporales
  - ř. Lecanorales
  - ř. Lichinales
  - ř. Arthoniales
  - ř. Gyalectales
  - ř. Ostropales
  - ř. Verrucariales

Pomocné pododd. **Deuteromycotina** – houby nedokonalé (Fungi imperfecti)

- pomocná tř. Blastomycetes
- pomocná tř. Hyphomycetes

- pomocná tř. Coelomycetes
- pomocná tř. Agonomycetes

Pododd. **Basidiomycotina** - houby stopkovýtrusé

- Tř. Heterobasidiomycetes
  - ř. Uredinales
  - ř. Ustilaginales
  - ř. Exobasidiales
  - ř. Tilletiales
  - ř. Tremellales
  - ř. Auriculariales
  - ř. Dacrymycetales
- Tř. Homobasidiomycetes
  - Podtř. Hymenomycetidae
    - ř. Aphyllorphorales
    - ř. Cantharellales
    - ř. Polyporales
    - ř. Russulales
    - ř. Hymenochaetales
    - ř. Boletales
    - ř. Agaricales
    - ř. Thelephorales
  - Podtř. Gasteromycetidae
    - ř. Lycoperdales
    - ř. Geastrales
    - ř. Sclerodermatales
    - ř. Nidulariales
    - ř. Phallales

(Sedlářová, Vašutová, 2007)

## **2.2 Obecná charakteristika hub**

Houby mikroskopických rozměrů se nazývají mikromycety (Votava et al., 2003). Jsou heterotrofní skupinou eukaryotických organismů, nemají chlorofyl, proto jsou

neschopné fotosyntetické asimilace – přijímají tedy organické látky rostlinného nebo živočišného původu. Vyznačují se převážně saprofytickým způsobem výživy. V přírodě jsou především destruenty organické hmoty. Malá část se adaptovala k parazitismu.

### **2.3 Morfologie**

Houbová buňka je tvořená buněčnou stěnou se všemi organelami kromě plastidů. Tato podobnost se savčími buňkami je také jednou s překážek při vývoji nových, selektivně působících antifungálních látek s nízkou toxicitou pro člověka. Většina antimykotik působí na úrovni ergosterolu, což je hlavní sterol plazmatické membrány hub (Skalický et al., 1991). Stěna hub obsahuje složité sacharidy – hlavně chitin. Díky němu se mohou na stěnu vázat některá barviva, což je důležité pro diagnostiku mikromycet (Votava et al., 2003).

Základní morfologickou jednotkou mikromycet je blastokonidie a vlákno neboli hyfa. Blastokonidie představuje kvasinkovitý typ – oválná buňka s tendencí k pučení. Některé houby mají schopnost tvořit v závislosti na podmínkách oba morfotypy, tomuto fenoménu se říká dimorfismus. Kvasinkovitá forma představuje většinou parazitickou invazivní fázi a vláknitá forma fázi saprofytickou. Kandidy mají též dvojí podobu, ale oválné blastokonidie zde představují saprofytickou fázi a pseudomycelia reprezentují fázi parazitickou (Votava et al., 2000).

Soubor vláken se označuje jako mycelium. Obecně se dělí na substrátové (vegetativní), které ukotvuje houbu a generativní neboli vzdušné, které nese rozmnožovací orgány (Votava et al., 2003).

Životní cyklus hub je kombinací nepohlavního a pohlavního rozmnožování, někdy jen nepohlavního. Mezi sexuální rozmnožovací struktury patří askospory (váčky, ve kterých se tvoří sudý počet pohlavních buněk s diploidní sadou chromosomů), oospory (vzniklé splynutím velké, samičí buňky a malé samčí pohyblivé buňky) a zygospor (kdy dojde ke spojení dvou stejně velkých buněk opačného pohlaví). U nepohlavního rozmnožování hovoříme o vzniku konidií.

### **2.4 Patogenita**

O většině mikromycet platí, že obvykle nenapadají zdravý makroorganismus. Mykotické infekce jsou v převážné většině oportunní. Význam roste u disponovaných jedinců – novorozenci, nemocní nad 75 let, diabetici, nemocní se solidními nádory

nebo hemoblastózami, imunokomprimovaní jedinci, nemocní po orgánové nebo tkáňové transplantaci, dlouhodobé používání kortikoidů a širokospektrých antibiotik, těžce popálení a další (Votava et al., 2003).

Významným znakem patogenity hub je přítomnost mananu v buněčné stěně, vůči němuž lidský organismus postrádá mechanismy nutné k jeho odstranění (Rehany et al., 2004).

## **2.5 Epidemiologie**

Mikromycety se svou morfologickou rozmanitostí, adaptabilitou a schopností se přizpůsobit různým ekologickým podmínkám, vyskytují prakticky všude, kde je přítomna organická hmota. V životním a pracovním prostředí člověka jsou přítomny v ovzduší, půdě, vodě, na povrchu živých a odumřelých organismů, předmětů, na plochách, v krmivech i v potravinách. V potravinářském průmyslu jsou mnohé z nich využívány např. při výrobě sýrů, kyseliny citronové, ve farmaceutickém průmyslu při výrobě antibiotik i jiných léčiv a v dalších biotechnologiích, např. při výrobě houbových přípravků proti hmyzím škůdcům nebo proti houbovým patogenům. Naproti tomu mnohé mikroskopické houby mohou působit na člověka nepříznivě - rozkladem potravin a krmiv uskladněných za nevhodných podmínek, produkcí mykotoxinů do těchto produktů, způsobují alergické obtíže u citlivých jedinců vdechováním nadměrného množství spor hub (Chumchalová et al., 2004).

## **2.6 Laboratorní diagnostika**

### **2.6.1 Mikroskopie**

Houby jsou asi desetkrát větší než bakterie, proto jsou dobře viditelné i v nativním preparátu. Dají se ale i barvit podle Grama (zejména kvasinky), barví se modře, přestože jejich buněčná stěna nemá nic společného s buněčnou stěnou gram pozitivních bakterií. Používají se i speciální barvení, např. barvení Parkerovým inkoustem. Částičky kůže a nehtů se připravují jako louhové preparáty a tekuté materiály, jako je sputum či mozkomíšní mok, se mísí s Lugolovým roztokem. V histologii se k průkazu hub používá stříbření dle Grocotta (Votava et al., 2000).

### **2.6.2 Kultivace**

Základní diagnostickou půdou je Sabouraudův glukózový agar. Proti kontaminaci bakteriemi se do agaru přidávají antibakteriální látky, hlavně chloramfenikol, který má

široké spektrum účinku. Ideální kultivační teplota se jeví při 26 °C až 37 °C 2 až 7 dní (Votava et al., 2000).

### **2.6.3 Biochemická identifikace**

Využívá se schopnosti asimilace (využití látek k růstu jako zdrojů uhlíku) a štěpení cukrů a dusíkatých látek. Používají se auxanogramy, kde se zjišťuje, zda houba využívá nějaký cukr a zymogramy, jestli cukr fermentativně štěpí. Další možností je v dnešní době použití systémů biochemické identifikace v panelu (Votava et al., 2000).

### **2.6.4 Nepřímý průkaz**

Nepřímý průkaz (průkaz specifických protilátek) má význam u systémových mykóz, např. aspergilózy. K tomuto průkazu řadíme reakce typu aglutinace, vazba komplementu, ELISA, imunoelektroforéza a další.

### **2.6.5 Přímý průkaz**

Stěna hub je složena z polysacharidových proteinových komplexů. Na proteiny se vážou polysacharidy, jako je manan nebo glukan a ty můžeme jako antigeny prokázat.

## **2.7 Chorobné stavy vyvolané houbami**

### **2.7.1 Mycetismy**

Jedná se o mechanické poškození organismu alimentární otravou (Buchta et al., 1998). Jako nejnebezpečnější se v tomto směru jednoznačně profiluje muchomůrka zelená, považovaná za jednu z nejedovatějších a nejnebezpečnějších hub světa, a její blízké příbuzné. Některé houby vyvolávají po požití psychotické stavy a halucinace – příkladem je lysohlávka česká. Tyto se záměrně sbírají a konzumují jakožto droga. I zde je však nutné si uvědomit hrozící předávkování se smrtelnými komplikacemi.

### **2.7.2 Mykotoxikózy**

Mykotoxiny jsou toxické organické látky, které jsou produkovány řadou mikroskopických hub (plísní) po celém světě. K intoxikaci nejčastěji dochází kontaminovanou potravou. Konzumace zplsnivělých potravin a krmiv byla často provázena onemocněním a otravami lidí i hospodářských zvířat. Mezi mykotoxiny,

keré se nejčastěji vyskytují v potravinách, patří: deoxynivalenol/nivalenol, zearalenon (produkovaný plísněmi rodu *Fusarium* – obsažený v cereáliích, rýži či v kukuřici), ochratoxin (v obilninách), aflatoxiny (produkované plísní *Aspergillus flavus* – především v oříškách), patulin (nejznámější z jablečných a jiných ovocných výrobků).

#### **2.7.2.1 Účinky mykotoxinů**

Mají cytotoxický účinek, zastavují mitózu a inhibují růst, imunosupresivní, kdy organismus přestává reagovat na antigenní podněty tvorbou protilátek. Účinek mykotoxinů je všeobecně neurotoxický a hepatotoxický. Řada je potenciálními mutageny a teratogeny.

Na druhé straně se tyto toxiny využívají ve farmaceutickém průmyslu k výrobě řady léků.

#### **2.7.3 Mykoalergózy**

Mykoalergie jsou hypersenzitivní reakce imunitního systému na antigenní stimulaci houbovým alergenem (Buchta et al., 1998). Mikromycety produkují značné množství drobných spor, které jsou především součástí prachu. Jsou lehké, a proto stačí slabý závan a z narostlého a vysporulovaného mycelia se dostanou okamžitě do ovzduší. Účinek plísní jako alergenů závisí na počtu jejich částic ve vzduchu, délce pobytu člověka v takto kontaminovaném prostředí a především na jeho dispozici a jeho imunitě. Počty spor v prostředí kolísají v průběhu dne a noci, jsou závislé na teplotě a vlhkosti vzduchu. Mění se také během střídání ročních období. Podle vstupu alergenu do organismu se rozlišují alergie respirační, kontaktní a potravinové.

#### **2.7.4 Mykózy**

Mykózy jsou houbové záněty, které v důsledku změnou životního stylu a také antibiotické léčby přibývají. Podle Buchty et al., (1998) se dělí lokalizačně na povrchové, kožní, podkožní a hluboké (lokalizace v různých orgánech nebo i systémové mykózy).

U povrchových mykóz je postižena nejsvrchnější vrstva kůže. Vytváří se pigmentové plochy, často v místech s vlhkou zapádkou.

Kožní mykózy neboli dermatomykózy postihují keratinizované vrstvy kůže, nehtová lůžka a vlasové folikuly.

U podkožních mykóz jsou poškozeny hlubší vrstvy škůry, subkutánní tkáň a dokonce i kosti.

Hluboké mykózy postihují jeden nebo více orgánů, mohou přerůst až do systémových mykóz. Původci systémových mykóz zpravidla nepostihují člověka často a u zdravého člověka k infekci nedochází, nebo proběhne bez příznaků či mírně. Hlavními rizikovými faktory vzniku mykóz je používání širokospektrých antibiotik, kortikosteroidů, nitrožilní katétry, invazivní lékařské postupy a lidé s HIV infekcí (Nosanchuk, 2006).

## **2.8 Systém lékařsky významných hub**

### **2.8.1 Zygomycetes (houby spájkivé)**

Ve výskytu systémových mykóz se nejčastěji uplatňují zástupci rodů *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus* a další. Tyto napadají převážně pacienty s oslabenou imunitou, jako jsou popálení, osoby po transplantaci, lidé s AIDS. Zygomycety mají schopnost přilnout ke stěnám velkých arterií, zde prorůstají a vytvářejí v jejich lumen tromby (Votava et al., 2000).

### **2.8.2 Ascomycetes (houby vřeckovýtrusé)**

Zahrnuje zhruba polovinu všech známých druhů hub. Řadí se sem saprofytické druhy, parazité rostlin nebo živočichů a i komenzální druhy. Mezi známé zástupce patří *Penicillium spp.*, *Aspergillus sp.*, *Claviceps purpurea*, *Fusarium* a řada dalších.

### **2.8.3 Basidiomycetes (houby stopkovýtrusé)**

Skupina hub s převážně makroskopickými plodnicemi. Jedná se převážně o saprofyty a parazity – některé parazitují i na člověku, např. kvasinka *Cryptococcus neoformans* se projevuje u imunosuprimovaných jedinců jako kryptokoková meningitida. Některé stopkovýtrusé houby žijí v symbióze s lesními dřevinami (Buchta et al., 1998).

### **2.8.4 Deuteromycetes – Fungi imperfecti (houby nedokonalé)**

Jedná se o umělou, pomocnou skupinu. Řadí se sem houby, u kterých je známo jen nepohlavní stádium nebo tvoří pohlavní stádium jen sporadicky. Usuzuje se, že



většina zástupců jsou z řad vřeckovýtrusých hub. Většina deuteromycet patogenních pro člověka spadá do 2 podtříd: Blastomycetes a Hyphomycetes.

Blastomycetes – nesporogenní kvasinky, k zástupcům patří *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans* a další.

K zástupcům pomocné třídy Hyphomycetes se řadí již dříve jmenované vřeckovýtrusé houby - *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Alternaria*, *Fusarium* (Mieslerová et al., 2006).

## **2.9 Přehled testovacích kmenů kvasinek a vláknitých hub**

*Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), *Candida krusei* (CK), *Candida glabrata* (CG), *Trichosporon beigeli* (TB), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Absidia corymbifera* (AC), *Trichophyton mentagrophytes* (TM).

### **2.9.1 Candida albicans**

V lidském materiálu se vyskytuje ze všech kvasinek nejčastěji. *C. albicans* je hlavním původcem kandidóz, např. vulvovaginálních kandidóz, častěji je však bezpříznakovou kolonizací zejména ve střevě, ale i jinde. *Candida albicans* má velikost přibližně 2-6 x 3-9 μm (Špaček et al., 2003). Mikroskopicky, v nativním nebo barveném preparátu, jsou vidět eliptické buňky. *C. albicans* roste na krevním agaru i na Sabouraudově glukózovém agaru, má buďto smetanově bílé, nebo šedavé kolonie s kvasnicovou vůní (Fragner, 1984). Od ostatních kandid lze odlišit biochemickými testy pomocí auxanogramů, zymogramů nebo komerčními stripy (Votava et al., 2000). Je odolná vůči nižšímu pH. Jako dimorfní houba se nachází ve dvou různých formách. Blastospory jsou fenotypem pro rozšíření a přenos. Jsou stálou formou, která může být spojena s asymptomatickou kolonizací. Druhá forma je micelární a je schopná klíčení. Tento fenotyp může napadat tkáň, u vulvovaginálních kandidóz napadá buňky vaginálního epitelu a způsobuje symptomy onemocnění (Mašata et al., 2001).

### **2.9.2 Candida tropicalis**

Je velmi často izolovanou kandidou, může vyvolat stejné potíže jako *C. albicans*, u nemocných s leukémií je dokonce patogennější (Votava et al., 2003). Nejčastěji se vyskytuje jako všeobecný komenzál v ústech, GIT, v plicích, ve vagíně, na pokožce lidí a zvířat. V kvasném průmyslu se používá na výrobu krmného droždí. *C. tropicalis*

vytváří měkké, krémovité, hladké, kučeravé až kraječkovité kolonie (Chumchalová et al., 2004).

### **2.9.3 *Candida krusei***

Vyskytuje se jako častý kontaminant různých potravin, jako je kyselá kapusta, droždí, víno. Dobře využívá etanol, proto se vyskytuje v procesu výroby droždí a vína (Chumchalová et al., 2004). *C. krusei* má zploštělé matné kolonie šedé barvy s charakteristickou acetonovou vůní (Jílek et al., 2002). Je rizikem pro pacienty se sníženou imunitou, neboť se vyznačuje primární rezistencí k flukonazolu – nejčastěji používanému antimykotiku (Fragner, 1984).

### **2.9.4 *Candida glabrata***

Tvoří lesklé, bělavé kolonie, netvoří hyfy ani pseudohyální struktury (Jílek et al., 2002). Má typickou ovocnou vůni (Fragner, 1984). Je často nalézána na kůži, v urogenitálním traktu, dýchacích cestách, GIT. Díky své snížené citlivosti k azolovým antimykotikům se stává problémem u oslabených jedinců, např. jedinců s AIDS a převážně u hematologických pacientů. Proto se často vykytuje na odděleních klinické hematologie a na gerontologické – metabolické klinice.

### **2.9.5 *Trichosporon beigelii***

*T. beigelii* je starší název, podle nynější nomenklatury hovoříme o *T. asahii*. Na Sabouraudově agaru nelze přesně odlišit od kolonií kandid, je nutné provést biochemickou a mikroskopickou identifikaci. V mikroskopu jsou vidět blastokonidie uspořádané cik cak, často tvoří pseudomycelium.

*T. asahii* způsobuje infekce kůže i nehtů, ale převážně se podílí na infekcích močových cest. Postihuje především oslabené pacienty s defektní imunitou. Je znám jako původce tzv. bílé piedry. Jedná se o mykotické onemocnění postihující vlasy a vousy, kde se vytváří bílé uzlíky. Toto onemocnění se vyskytuje hlavně v tropech a subtropích (Votava et al., 2000).

### **2.9.6 *Aspergillus fumigatus***

Rod *Aspergillus* tvoří vláknité rychle rostoucí mikromycety, které tvoří barevné kolonie s pestrou škálou pigmentů. *A. fumigatus* mívá kolonie tmavě zelené, jemně zrnité a směrem k okraji zelené ubývá – bělaví (Jílek et al., 2002)

Mikroskopicky lze pozorovat charakteristický vzhled řetízkových konidií, které připomínají kropicí konev – proto je českým názvem aspergilů kropidlák (Votava).

Vyskytuje se v zrní, zelenině i ovoci a podobně (Fragner, 1984).

Aspergily jsou původci jak systémových mykóz, tak i mykóz povrchových – onychomykózy a otomykózy (Votava et al., 2003). Jsou respiračními patogeny, plicní infekce propuká na základě inhalace konidií (Beyer et al., 1994). K systémovým mykózám se řadí endokarditidy, alergické pulmonální aspergilózy, občas se vyskytne ohraničené ložisko – aspergilom (Buchta et al., 1998). Tyto klinické obrazy pozorujeme spíše u traumatizovaných a imunoalterovaných jedinců (Pfaller, Wenzel, 1992).

Rod *Aspergillus* je jedním z hlavních producentů mykotoxinů – nejznámějšího aflatoxinu, který je karcinogenní, hepatogenní i neurotoxický. Zdrojem aflatoxinů jsou kontaminované potraviny, především arašídy (Buchta et al., 1998).

*A. flavus* se však také odedávna využívá v Japonsku k výrobě alkoholického nápoje, tzv. saké z rýže (Fragner, 1984).

### **2.9.7 *Absidia corymbifera***

Řadí se k vláknitým mikromycetám, jako původce systémových mykóz. Napadá hlavně oslabené pacienty po transplantacích, pacienty s dlouhodobou léčbou kortikoidy a nemocné s AIDS a vyvolá záněty plic, otitidy atd.

*A. corymbifera* má typický vzhled. Má charakteristické trsy sporangioforů na vrcholech stolonů, s malými rhizoidy a špičatou kolumelou s typickou apofýzou. Povrch kultivačního média je pokryt šedobílým až šedočerným myceliem, který má nadýchaný vzhled (Votava et al., 2003).

### **2.9.8 *Trichophyton mentagrophytes***

Kolonie na Sabouraudově agaru jsou bílé s uprostřed žlutavým nádechem (Fragner, 1984). *T. mentagrophytes* se řadí k dermatofytům, což je skupina mikroskopických hub, jejíž zástupci jsou nejčastějšími původci infekcí kůže, vlasů, nehtů a chlupů. Odpovídají za asi 90% všech onychomykóz na nohou a 50% na rukou (Votava et al., 2003).

## **2.10 Antimykotika**

Jsou to látky, které působí na kvasinky i plísně. Specifická antimykotika zasahují do určitého místa metabolismu hub a nesespecifická antimykotika obvykle účinkují i na

bakterie. K léčbě kožních a slizničních mykóz se podávají jen lokální antimykotika. Při zasažení celého organismu mykózou je nutné provést celkovou, systémovou terapii.

Antimykotika účinkují různými mechanismy. Mohou vytvářet póry v cytoplazmatické membráně buňky hub a ovlivnit tak permeabilitu membrány - polyenová antibiotika. Jinou možností je inhibovat syntézu ergosterolu, který je nezbytnou součástí buněčné membrány hub – azolová antimykotika (Lüllmann et al., 2004).

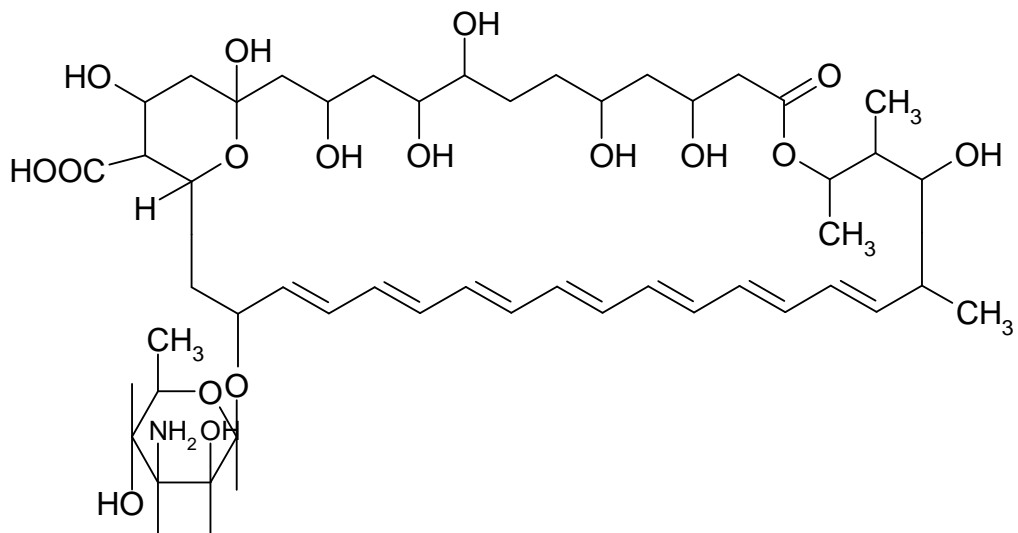
### **2.10.1 Polyenová antibiotika**

Vazbou se na ergosterol změní propustnost membrány buňky hub vytvořením hydrofilních pórů. Prostřednictvím pórů unikají do prostředí důležité ionty a makromolekuly s následným zánikem buňky – fungicidní efekt (Lüllmann et al., 2004).

#### **2.10.1.1 Amfotericin B**

Má široké spektrum účinku, použití je téměř vždy provázeno nežádoucími účinky. Proto byly vyvinuty preparáty, kde je molekula amfotericinu B vázána na tukový nosič a tím se odstranilo riziko nefrotoxicity (Rozsypal, 2008). Účinek amfotericinu B je závislý na jeho koncentraci (Burgess et al., 2000 a Klepser et al., 1997). Je lékem volby u aspergilových infekcí, kandidóz, kryptokokových infekcí. V úvahu přichází i použití k terapii histoplazmóz (Lüllmann et al., 2004). Používá se pro téměř všechny systémové mykotické infekce (Martínková et al., 2007).

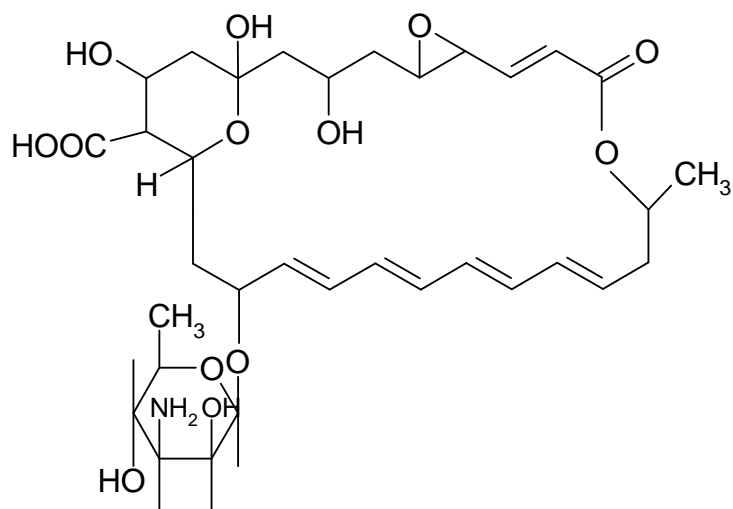
K nežádoucím účinkům patří vysoká horečka, zimnice, arytmie, dušnost, bolesti hlavy, zvracení, hypotenze, selhání ledvin, neurologické poruchy, poruchy krvetvorby (Nosanchuk, 2006). Podáváním vysokých dávek NaCl se nefrotoxicita oslabuje, stejně tak použitím liposomální formy preparátu (Graybill, 1982). Amfotericin B se podává intravenózně infúzí, váže se na krevní bílkoviny a je distribuován do tkání. Po několika dnech je vyloučen močí. Perorální podání je systémově neúčinné (Lüllmann et al., 2004).



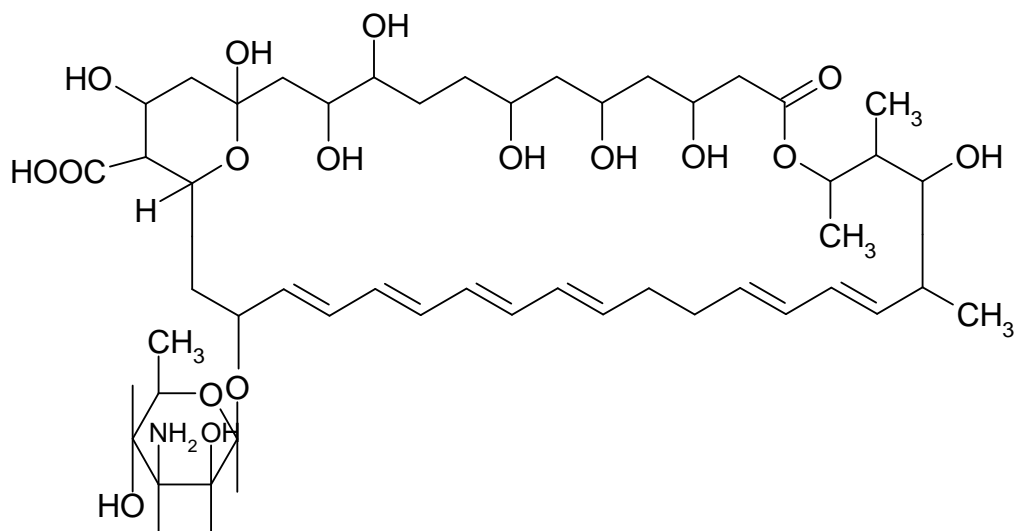
Obr. 1 Amfotericin B

### 2.10.1.2 Nystatin a Natamycin

Jsou to lokální antimykotika pro terapii kandidózy, gastrointestinálním traktem se neabsorbují (Lüllmann et al., 2004).



Obr. 2 Natamycin



Obr. 3 Nystatin

### 2.10.2 Azolová antimykotika

Jsou to syntetické, převážně fungistatické látky, které mají totožný mechanismus účinku. Inhibují aktivitu enzymu cytochrom P450 – dependentní C – 14  $\alpha$  – demethylasy (Borgers, et al., 1983), tím nedojde k přeměně lanosterolu na ergosterol, což je nejdůležitější sterol buněčné stěny hub. To způsobí poškození buněčné membrány patogenního agens a inhibici růstu (Krausová et al., 2009).

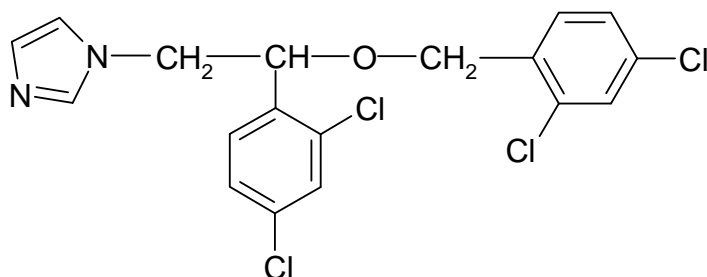
Azolová antimykotika mají buď imidazolový, nebo triazolový kruh.

K imidazolovým derivátům patří: kotrimazol, ketokonazol, mikonazol, ekonazol, oxikonazol, izokonazol, bifonazol, novější krokonazol, sertakonazol, omokonazol a řada dalších. Imidazoly se používají hlavně lokálně na dermatofyty a kvasinky. Při lokální aplikaci se neresorbují, proto nevyvolávají systémové nežádoucí účinky, mohou způsobit pouze lokální alergickou reakci (Lüllmann et al., 2004).

Triazoly mají širší spektrum účinku a jsou dostatečně citlivé již v malých dávkách. Patří sem: itrakonazol a flukonazol. Jsou vhodné pro systémovou terapii, a protože se ve střevě dostatečně resorbují, podávají se perorálně.

#### 2.10.2.1 Mikonazol

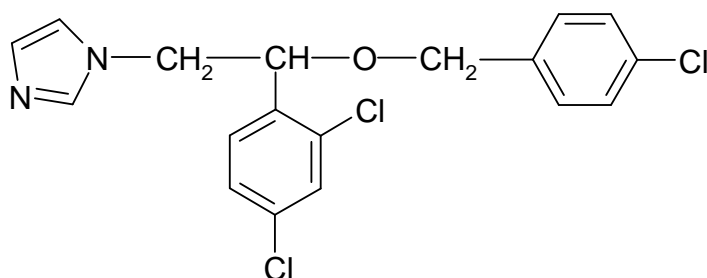
Řadí se k první generaci azolových antimykotik. Dříve se používal k systémové léčbě či k léčbě plísňových meningitid (Deresinski et al., 1977), terapeutický účinek se však ukázal jako nedostatečný a udržení terapeutické koncentrace bylo spojeno s nežádoucími toxickými účinky, proto se dnes již nepoužívá (Rozsypal, 2008).



Obr. 4 Mikonazol

### 2.10.2.2 Ekonazol (např.preparát **Gyno-Pevaryl**)

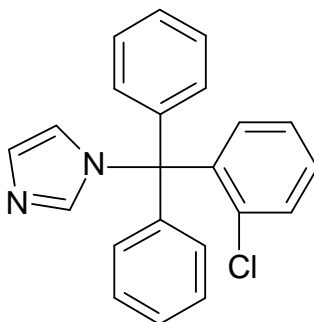
Těž se řadí k první generaci azolových antimykotik. Používá se k léčbě mykotických onemocnění kůže nebo sliznic. Je vhodný k terapii poševní kandidózy.



Obr. 5 Ekonazol

### 2.10.2.3 Klotrimazol (**Canesten**)

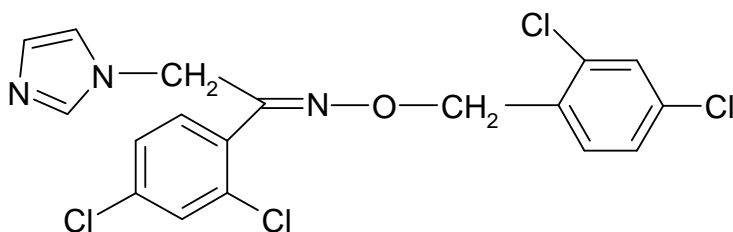
Dermatologikum, gynekologikum a antimykotikum. Je to moderní širokospektré antimykotikum, je účinný na plísně, dermatofyty i kvasinky, navíc je klotrimazol účinný i proti různým bakteriím, které se mohou podílet na sekundární infekci (Lüllmann et al., 2004).



Obr. 6 Klotrimazol

#### 2.10.2.4 Oxikonazol (Myfungar)

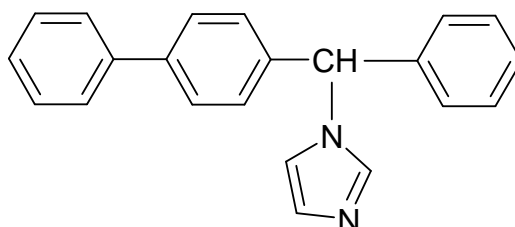
Azolové antimykotikum 2. generace. Má široké antifungální spektrum zahrnující dermatofyty (z rodu *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*), kvasinky (včetně *Malassezia furfur*), vláknité a dimorfní houby (např. *Aspergillus*, *Candida*). Působí také proti některým patogenním bakteriím.



Obr. 7 Oxikonazol

#### 2.10.2.5 Bifonazol (Mycospor)

Antimykotikum určené k lokální léčbě. Též má široké spektrum účinku zahrnující dermatofyty, kvasinky a plísně.



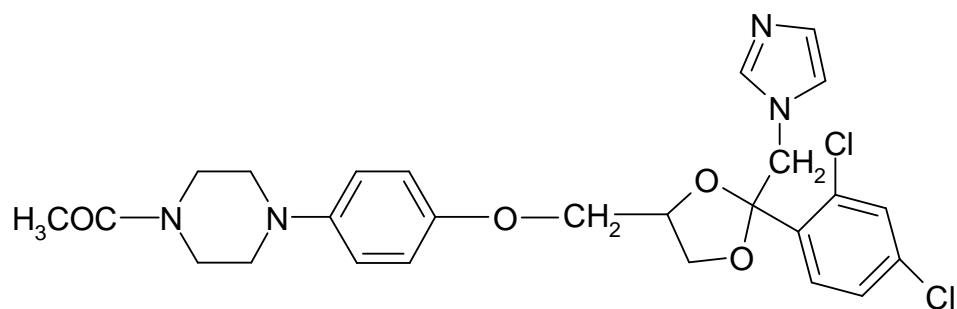
Obr. 8 Bifonazol

#### 2.10.2.6 Ketokonazol (Nizoral)

Je to antimykotikum 2. generace, které má specifický účinek proti kvasince *Malassezia furfur* (Vokurka et al., 2008). Používá se i k léčbě dermatofytóz, kožních kandidóz a i k terapii chronické rekurentní vaginální kandidózy.

V některých případech, obzvláště při dlouhodobém užívání, dochází k výskytu těžkých poruch jater, zvyšují se jaterní enzymy a vzácně vzniká nekróza hepatocytů. Též vysoké dávky ketokonazolu snižují syntézu steroidních hormonů, např. testosteronu a kortizolu (Lüllmann et al., 2004).

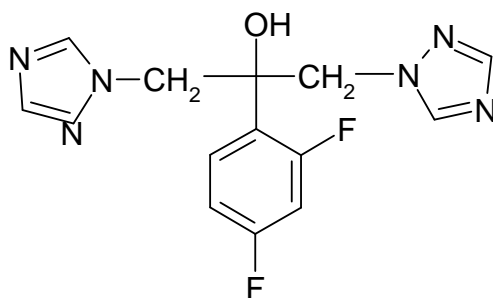




Obr. 9 Ketokonazol

### 2.10.2.7 Flukonazol (Diflucan, Mycomax)

Řadí se k širokospektrým triazolovým antimykotikům s minimem nežádoucích účinků (Buchta et al., 1998). Indikací flukonazolu jsou mykózy vnitřních orgánů vyvolané kandidami a kryptokoky (Lüllmann et al., 2004). Je dostupný v perorální i intravenózní formě (Doležal, Buchta, 2006). Patří mezi nejčastěji užívaná antimykotika, proto se již vyskytují kvasinky s primární a sekundární rezistencí.



Obr. 10 Flukonazol

### 2.10.2.8 Itrakonazol (Sporanox)

Je účinný proti infekcím způsobeným dermatofyty (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*), kvasinkami (*Cryptococcus neoformans*, *Pityrosporum spp.*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*) a různými jinými kvasinkami. Spolu s vorikonazolem se používá k léčbě invazivní aspergilózy (Lass-Flörl et al., 2001).

Je strukturně podobný ketokonazolu, ale neovlivňuje funkci jater a syntézu steroidních hormonů. Může vyvolat gastrointestinální potíže (Lüllmann et al., 2004).

### 2.10.3 Allylaminy

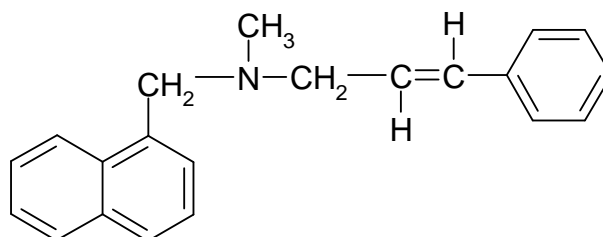
Jsou to syntetické látky, které jsou prezentovány terbinafinem a naftifinem. Jako azolová antimykotika interferují s biosyntézou ergosterolu, jen v jiném kroku - inhibují

skvalenepoxidasu, která katalyzuje jeden z prvních kroků syntézy ergosterolu (Lüllmann et al., 2004).

Působí fungicidně na řadu druhů dermatofytů rodu *Trichophyton* a fungistaticky na příslušníky rodu *Microsporum*. Vedle toho obsáhnou i různé další vláknité houby a kvasinky (Buchta et al., 2009).

### 2.10.3.1 Naftifin

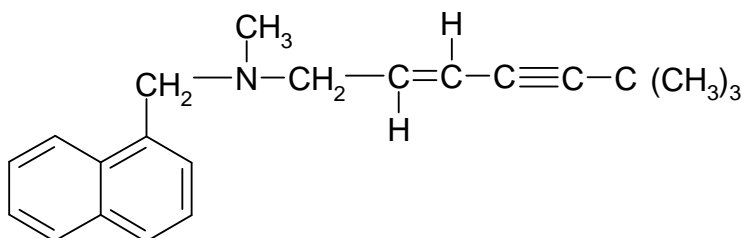
Je topickým lokálním antimykotikem, které je účinné hlavně proti dermatofytům (Doležal, Buchta, 2006). Také proti kvasinkám (*Candida albicans*, *Malassezia furfur*), plísním (*Aspergillus spp.*). Má fungicidní a fungistatický účinek. Naftifin má také antibakteriální účinek proti různým grampozitivním a gramnegativním organismům, které se obvykle vyskytují ve spojení s plísňovým onemocněním.



Obr. 11 Naftifin

### 2.10.3.2 Terbinafin

Působí širokým spektrem proti houbovým patogenům kůže, vlasů a nehtů včetně dermatofytů. Dosahuje výborných výsledků při léčbě onychomykóz. Používá se lokálně i perorálně (Doležal, Buchta, 2006).

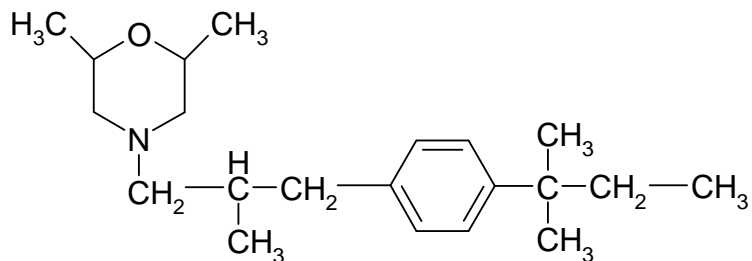


Obr. 12 Terbinafin

### 2.10.4 Morfoliny

Zástupcem je Amorfolin, který inhibuje syntézu ergosterolu na dalším stupni za místem působení azolů (Lüllmann et al., 2004). Dobře proniká do nehtu, proto se

používá ve formě laku na nehty při postižení mykózou (Buchta et al., 1998). Používá se i pro léčbu kožních a slizničních infekcí vyvolaných dermatofyty a kvasinkami, včetně onychomykózy a vulvovaginální kandidózy (Doležal, Buchta, 2006).



Obr. 13 Amorfolin

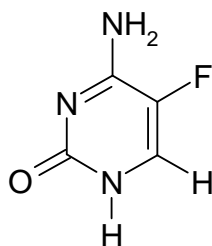
## 2.10.5 Jiná antimykotika

### 2.10.5.1 Flucytosin

Chemicky se jedná o fluorovanou pyrimidinovou bázi 5 – fluorocytosin. Jako falešný pyrimidinový analog je vestaven do rRNA a tRNA, blokuje tak proteosyntézu a zasahuje i do syntézy DNA. Flucytosin je do buňky aktivně transportován, 5 – fluorocytosin se přemění na 5 – fluorouracil, který působí jako antimetabolit při syntéze nukleových kyselin (Lüllmann et al., 2004). Účinek je fungistatický až fungicidní (Buchta et al., 1998).

Flucytosin působí na kandidy, kryptokoky a částečně na aspergily. Pokud se flucytosin používá jako monoterapie u kvasinkových infekcí, je vysoká tendence k rychlému rozvoji rezistence. Proto se téměř vždy používá v kombinaci s jinými antimykotiky (Francis, Walsh, 1992 a Hospenthal, Bennett, 1998). Nejčastěji se používá v kombinaci s amfotericinem B (Buchta et al., 1998).

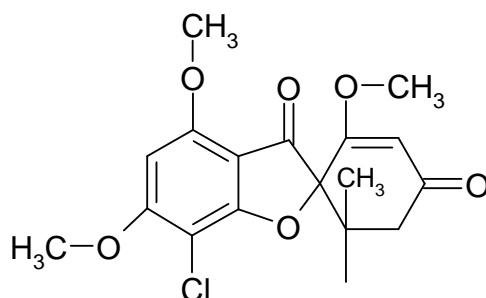
Flucytosin spolu s tolciklátem, tolnaftátem a griseofulvinem však nejsou v ČR registrovány (Buchta et al., 2009).



Obr. 14 Flucytosin

### 2.10.5.2 Griseofulvin

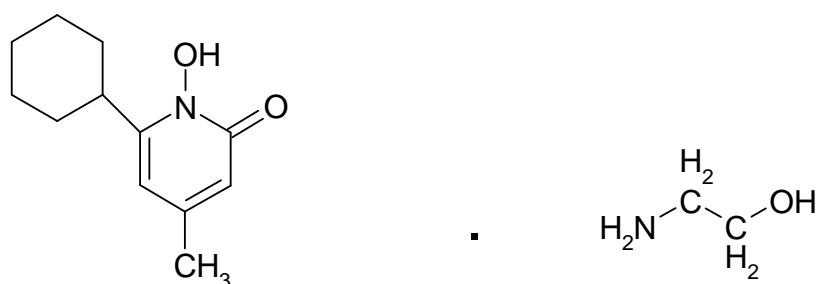
Je antimykotikum produkované mikroorganismem *Penicillium griseofulvum*. Zasahuje do funkce intracelulárních mikrotubulů a brání tak tvorbě mitotického vřeténka (Buchta et al., 1998). Používá se k terapii lokálních mykotických infekcí – především mykóz nehtů, způsobené dermatofyty. Podává se perorálně, ukládá se do keratinizovaných tkání, kde působí fungistaticky (Lüllmann et al., 2004).



Obr. 15 Griseofulvin

### 2.10.5.3 Ciklopiroxolamin

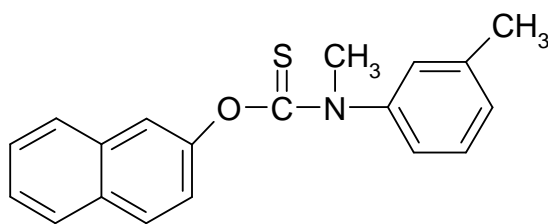
Širokospektré antimykotikum působící na dermatofyty, kvasinky, trichomonády i na řadu bakterií. Inhibuje proteosyntézu. Přednostně se používá u dermatomykóz (Buchta et al., 1998).



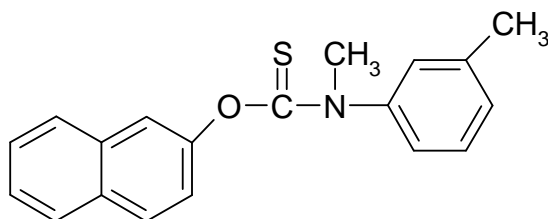
Obr. 16 Ciklopiroxolamin

### 2.10.5.4 Tolnaftát, tolciklát

Patří mezi thiokarbamátové deriváty. Inhibují syntézu ergosterolu a působí hlavně na dermatofyty. Indikují se na dermatomykózy (Buchta et al., 1998). Jsou také součástí různých hygienických prostředků pro pravidelné ošetřování nohou a obuvi (Buchta et al., 2009).



Obr. 17 Tolnaftát



Obr. 18 Tolciklát

### 2.10.6 Současná antimykotická léčba

Za posledních 20 let došlo k výraznému nárůstu mykotických infekcí, zároveň s tím se zvýšil počet imunosuprimovaných pacientů v populaci. Terapie hlubokých mykóz se stala velmi obtížnou. Mezi současná nová antimykotika patří triazoly druhé generace a echinokandiny, které mají značný potenciál rozšířit léčebné možnosti a zlepšit výsledky léčby invazivních mykóz (Ráčil et al., 2008).

**Triazolová antimykotika (3. generace)** znamenají v současnosti podstatné zdokonalení antifungální terapie (Buchta, Doležal, 2006). Kromě již zmiňovaného flukonazolu a itraconazolu sem řadíme i vorikonazol, posakonazol, ravukonazol.

*Vorikonazol* (V-fend) má spektrum účinku podobné jako itraconazol, působí na kvasinky, včetně flukonazol rezistentních, dermatofyty, plísně rodu *Aspergillus* (Maschmeyer, 2002) a další. Vorikonazol se zařadil mezi léky první volby aspergilózy (Herbrecht et al., 2002).

*Ravukonazol* je širokospektrý derivát flukonazolu, má velmi dobrý efekt na kvasinky, včetně kmenů, které jsou rezistentní na flukonazol. Dále působí na kryptokoky a řadu vláknitých hub, včetně aspergilů. Je již v závěrečné klinické fázi zkoušení.

*Posakonazol* (Noxafil) má široké spektrum účinku, hlavně má vyšší účinnost proti aspergilům. Je hydroxylovaným analogem itraconazolu (Buchta, Doležal, 2006).

Tyto novější azoly jsou zbaveny některých závažných nežádoucích účinků, jako je gynekomastie, oligospermie, impotence a mnohem méně působí na játra (Rozsypal, 2008).

**Echinokandiny**, ke kterým řadíme kaspofungin (Cancidas), anidulafungin (Ecalta) a mikafungin (Mycamine), působí na buněčnou stěnu tím, že inhibují fungální  $\beta$ -(1,3)-glukan syntetázu (Bouffard et al., 1994), což vede k úbytku glukanu v buněčné stěně, sníží se její kvalita, dojde ke ztrátě ochranné funkce pro buňku a k její lýze (Ráčil et al., 2008). Echinokandiny brání kandidám ulpět a vytvořit biofilm na umělých površích, jako jsou např. katetry (Rozsypal, 2008).

*Kaspofungin* má široké spektrum účinku. Je účinný na kandidy (Marco et al., 1998), aspergily (Abruzzo et al., 1997), na *Saccharomyces cerevisiae* a na cysty *Pneumocystis jiroveci*. *Anidulafungin* a *mikafungin* jsou v závěrečných fázích klinického zkoušení. Tyto látky mají též široké spektrum účinku, působící na flukonazol rezistentní houby, oportunní druhy kvasinek a plísně (Buchta, Doležal, 2006).

Ve vývoji jsou další látky, které inhibují biosyntézu buněčné stěny – corynecandin, fusacandin, arthrichitin, dále selektivní inhibitory houbových bílkovin (Domínguez et al., 1998) a aminokyselin (sordariny, cispentacin, azoxybacilin) a inhibitory biosyntézy sfingolipidů (aureobasidin, rustmicin, khafrefungin), jiné působí na úrovni inhibice transportu elektronů v mitochondriích (Fostel, Lartey, 2000).

Aureobasidin A je cyklický nonadepsi-peptid produkovaný *Aureobasidium pollulans* (Ikai et al., 1991), má silnou fungicidní aktivitu proti mnoha patogenním houbám – *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* a proti některým druhům *Aspergillus spp.*, ale ne proti *Aspergillus fumigatus* (Takesako et al., 1993).

## **2.11 Testování citlivosti k antifungálním látkám in vitro**

Se vzrůstajícím výskytem mykotických infekcí dochází k zintenzivnění snah po rozšíření palety antifungálních látek, proto je v současnosti nezbytné laboratorně sledovat citlivost původců mykóz k antimykotikům. Dalším důvodem je vyskytující se rezistence některých druhů mikromycet a potřeba klinika volit nejen vhodný preparát, který si zachoval *in vitro* účinnost, ale také dávku v závislosti na citlivosti mikromycety k danému antimykotiku (Otčenášek, 1990). Vzhledem k tomu, že laboratorní model

nemůže nikdy přesně napodobit živý organismus, jsou závěry pouze relativní, nikoliv absolutní.

Cílem laboratorního testování je určit, zda zkoumaná látka má nebo nemá antimykotickou aktivitu *in vitro*, testy by se měly vyznačovat dostatečnou citlivostí a spolehlivostí a neměly by poskytovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky (Buchta, 1993).

Antimykotická citlivost je závislá na velikosti inokula, médiu, pH, reakčních časech i teplotách (Bolmström et al., 1993).

### **2.11.1 Difúzní disková metoda**

Stanovuje citlivost (rezistenci) podle velikosti zóny růstové inhibice kolem disků, které obsahují určité koncentrace antimykotik. Nejprve se musí vytvořit inokulum a to tak, že se bakteriologickou kličkou sebere několik kolonií kvasinek (nebo konidií plísní) z povrchu agaru, na kterém vyrostly. Kolonie se suspendují ve fyziologickém roztoku nebo sterilní vodě a upraví se denzita na  $10^3$  elementů  $\text{ml}^{-1}$ . Na půdu, která je připravena pro stanovení citlivosti, se přelije suspenze, nebo se použije roztěrový tampón. Citlivost se stanovuje disky, které jsou napuštěny antimykotiky, tyto se položí na povrch agaru. Misky se inkubují při určité teplotě (nejčastěji při 35 – 37 °C) po určitou dobu (24 – 72 hodin). Po inkubaci se citlivost projeví inhibiční zónou růstu, její průměr se měří v mm (Otčenášek, 1990).

### **2.11.2 Gradientová difúzní metoda v agaru (E – test)**

Na agar se suspenzí z testované mikromycety se přiloží kalibrovaný proužek s koncentračním gradientem antimykotika (Rex et al., 2001). Po kultivaci se vytvoří inhibiční zóna ve tvaru kapky. Ostrý konec je v místě minimální inhibiční koncentrace, hodnota koncentrace se odečte ze stupnice na proužku. E – test se ukázal být užitečný pro testování amfotericinu-B a azolů proti řadě houbových patogenů (Lozano-Chiu, et al., 1998). A zdá se být lepší pro detekci rezistentních izolátů k amfotericinu B (Wanger et al., 1995). Především se ale používá jako alternativa k jinak pracné mikrodiluční metodě.

### **2.11.3 Diluční metody**

Tyto metody umožňují kvantitativně posoudit citlivost hub k antimykotikům. Určují MIC, což je nejnižší koncentrace antimykotika, která zastavuje růst testovaného mikroorganismu. Vyšetření se provádí na agarových nebo v bujónových půdách,

kteřé obsahují odstupňované koncentrace antimykotik. Do půd se očkuje standardní inokulum testované kvasinky nebo plísně. Po příslušné době inkubace se odečítá MIC (Bednář et al., 1996).

**Agarová diluční metoda:** Schopnost růstu se hodnotí v řadě Petriho misek, které obsahují odstupňované koncentrace antimykotik. Metoda je pracná a ekonomicky náročná, nehodí se pro rutinní testování (Ferrari, Turnidge, 2003).

**Bujónová diluční makrometoda:** Inhibice růstu testované houby se sleduje v řadě zkumavek, které obsahují tekuté médium s různou koncentrací antimykotika.

**Bujónová diluční mikrometoda:** Používají se plastové mikrotitrační destičky. Díky tomu se MIC stanovuje u většího počtu antimykotik s celým souborem kmenů. Metoda je snadná, nenáročná a automatizovatelná (Cormican, Pfaller, 1996).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Pomůcky

Sterilní mikrotitrační destičky s víčky, mikropipety, sterilní špičky, 12 - ti jamkový rezervoár na médium, sterilní zkumavky, stojánky na zkumavky, očkovací kličky, Bürkerovy komůrky.

### 3.2 Přístroje

Laminární box, termostat, mikroskop, vortex.

### 3.3 Chemikálie

Médium RPMI - 1640 5x koncentrované (dodavatel KlinLab – Praha), MOPS (3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina), glukóza, DMSO (dimethylsulfoxid), NaOH, sterilní voda.

### 3.4 Testovací kmeny kvasinek a vláknitých hub

*Candida albicans* CA ATCC 44859

*Candida tropicalis* CT 156

*Candida krusei* CK E28

*Candida glabrata* CG 20/l

*Trichosporon beigelii* TB 1188

*Aspergillus fumigatus* AF 231

*Absidia corymbifera* AC 272

*Trichophyton mentagrophytes* TM 445

V pokusu je zahrnuto osm kmenů hub. Referenční kmen *Candida albicans* CA ATCC 4859 pochází z americké sbírky mikroorganismů ATCC (American Type Culture Collection). Ostatní kmeny hub byly získány z klinických materiálů pacientů, u kterých byla prokázána houbová infekce. Všechny kmeny se inkubují při 37 °C ve tmě. Kvasinky se inkubují 24 hodin, plísně až 48 hodin a kmen TM až 5 dní.

### 3.5 Složení a příprava médií

#### 3.5.1 Sabouraudův glukózový agar

Složení:	pepton	10,0 g
	dextróza	40,0 g
	agar	15,0 g
	destilovaná voda	1000,0 ml

Jednotlivé složky se smíchají, rozvaří a sterilizují v autoklávu 15 min při 121 °C.

#### 3.5.2 RPMI 1640 (5x koncentrované růstové médium) KlinLab – Praha

1000 ml média obsahuje:

dusičnan vápenatý tetrahydrát	0,5 g
chlorid draselný	2,0 g
hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	5,015 g
síran hořečnatý heptahydrát	0,5 g
chlorid sodný	30,0 g
L- arginin hydrochlorid	1,21 g
L- asparagin monohydrát	0,27 g
L- cystin	0,25 g
L- glutamin	1,5 g
Glutathion	0,005 g
Glycin	0,05 g
L- histidin HCl H <sub>2</sub> O	0,102 g
L- hydroxyprolin	0,1 g
L- isoleucin	0,25 g
Kyselina L asparagová	0,1 g
Kyselina L- glutamová	0,1 g
L- leucin	0,25 g
L-lysin hydrochlorid	0,2 g
L- methionin	0,075 g
L- fenylalanin	0,075 g
L- prolin	0,1 g
L- serin	0,15 g

L-treonin	0,1 g
L- tryptofan	0,025 g
L- tyrosin	0,1 g
L- valin	0,1 g
Biotin	0,001 g
Kyanokobalamin	0,000025 g
Cholin chlorid	0,015 g
I- inositol	0,175 g
Kyselina listová	0,005 g
Kyselina para- aminobenzoová	0,005 g
Nikotinamid	0,005 g
D- Ca- Pantothenát	0,00125 g
Pyridoxin hydrochlorid	0,005 g
Riboflavin	0,001 g
Thiamid hydrochlorid	0,005 g
Glukóza	10,0 g
Fenol	0,05 g

### **3.6 Příprava MOPS (Sigma)**

Definované množství morfolinpropansulfomové kyseliny se rozpustí v destilované vodě a sterilizuje se autoklávováním 15 min při 121 °C a 0,1 MPa.

### **3.7 Příprava růstového média**

V den pokusu se asepticky přidá k 4 dílům MOPS s 1% glukózou 1 díl RPMI 1640. Celkový objem záleží na spotřebě, respektive na počtu testovaných kmenů. Pomocí několika kapek (cca 1ml NaOH na 100ml media) 10M NaOH se upraví pH do rozmezí 6,5 – 7,9. Původně žlutý roztok změní barvu na oranžovo – červenou.

### **3.8 Příprava suspenzí testovaných kmenů hub**

8 sterilních zkumavek se popíše zkratkami testovacích kmenů CA, CT, CK, CG, TB, AF, AC, TM a do každé se nepipetuje po 3ml sterilní vody.

Z kultury kvasinek, které narostly na Sabouraudově glukózovém agaru se odebere část kolonie, ta se resuspenduje ve sterilní vodě ve zkumavce. Suspenze se řádně promíchá na vertexu. Velikost inokula se ověří pomocí Bürkerovy komůrky, do

které se nepipetuje 12  $\mu\text{l}$  suspenze. Při zvětšení 200 se stanoví počet buněk na 50 čtverců. Hustota inokula vhodná pro testování je  $1,0 - 2,5 \times 10^{-5}$  cfu/ml, což při kontrole v Bürkerově komůrce odpovídá 25 – 50 cfu/50 čtverců.

Suspenze vláknitých hub se připraví shodně, jen hustota inokula by měla být cca 100 buněk na 50 čtverců.

Takto připravené suspenze hub vydrží v lednici přibližně 14 dní.

### **3.9 Příprava ředící řady testované látky – vlastní pokus**

Jako standardní rozpouštědlo pro přípravu roztoků testovacích látek bylo použito DMSO.

1. Navážka testované látky se rozpustí v takovém objemu DMSO, aby 1. testovaná koncentrace byla  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a zároveň koncentrace DMSO v jamce nepřesáhla 1%, proto se při přípravě pracovních roztoků přidává k růstovému médiu (1,98 ml) jen 1% látky rozpuštěné v DMSO (20  $\mu\text{l}$ ), z toho důvodu se musí připravit látka 100x koncentrovanější, aby 1. testovaná koncentrace byla  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Promíchá se na vortexu.

Výpočet objemu DMSO podle vzorce:

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

Kde  $m$  je navážka v gramech,  $c$  je první testovaná koncentrace  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  což je  $0,0005 \text{ mol.l}^{-1}$  a  $M$  je molární hmotnost testované látky.

2. Pokud se látka rozpustí nebo vytvoří homogenní suspenzi, může se přistoupit k dalšímu kroku. Pokud se ale látka vysráží nebo nerozpustí, přidá se 2. případně 3. ekvivalent rozpouštědla. Každým přidáním ekvivalentu rozpouštědla se posouvá 1. testovaná koncentrace o jedno ředění dozadu (z  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  atd.)
3. Do sterilní zkumavky, označené 1, se napipetuje 1,98 ml růstového média a přidá se 20  $\mu\text{l}$  rozpuštěné testované látky a promíchá se na vortexu.
4. Zkontroluje se, zda testovaná látka v růstovém médiu není vysrážená. Pokud ne, přistoupí se k dalšímu bodu, pokud ano, přidá se 2. případně 3. ekvivalent růstového média. Každým přidáním ekvivalentu růstového

média se posouvá 1. testovaná koncentrace o 1 ředění dozadu (z 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  atd.).

5. Tímto se získá pracovní roztok 1. testované koncentrace, ten se sterilně přemístí do 1. jamky 12 – ti jamkového rezervoáru.
6. Do deseti sterilních zkumavek, které jsou popsány 2 – 11, se připraví dvojkovou ředící řadou testované látky v DMSO, tzn.: do každé zkumavky se napipetuje 0,5 ml DMSO, do 1. zkumavky, která je označená 2, se přidá 0,5 ml testované látky rozpuštěné v DMSO (viz bod 1.), promíchá se a přenesse se 0,5 ml do zkumavky označené 3, opět se promíchá a přenesse se 0,5 ml do zkumavky označené 4 atd. až po zkumavku 11.
7. Do jamek 2 – 12 dvanácti jamkového rezervoáru se napipetuje 1,98 ml růstového média a přidá 20  $\mu\text{l}$  naředěné testované látky ze zkumavek tak, že ze zkumavky 2 do jamky 2, ze zkumavky 3 do jamky 3 atd. Do poslední 12. jamky se přidá 20  $\mu\text{l}$  samotného DMSO, to je kontrola.

V každé jamce rezervoáru se tak získají 2 ml pracovního roztoku s příslušnou koncentrací testované látky a kontrola.

### **3.9.1 Testované koncentrace látky:**

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

### **3.10 Pipetování do destičky**

Dalším krokem je rozplnění naředěné látky do sterilní mikrotitrační destičky. Nejvyšší koncentrace látek se napipetují do prvního sloupce, nižší do druhého atd.

1. Pomocí dvanácti kanálové pipety se napipetuje 200  $\mu\text{l}$  příslušného pracovního roztoku ze zásobního, dvanácti jamkového, rezervoáru do řádků A, B, C, D, E, G a H jedné mikrotitrační destičky (řádek F zůstává volný). Tzn., že z první jamky rezervoáru se přenesse 200  $\mu\text{l}$  roztoku do 1. jamky na titrační destičce, z druhé jamky rezervoáru se přenesse 200  $\mu\text{l}$  roztoku do 2. jamky na titrační destičce atd. Do druhé destičky se napipetuje tolik jamek, kolik je testovaných látek, tzn. pro 3 testované látky řádek A, B a C.
2. Do každé jamky řádku A první destičky se napipetuje 10  $\mu\text{l}$  připravené suspenze CA ATCC 44859.

3. Do každé jamky řádku B první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze CT 156.
4. Do každé jamky řádku C první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze CK E28.
5. Do každé jamky řádku D první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze CG 20/l.
6. Do každé jamky řádku E první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze TB 1188.
7. Do každé jamky řádku G první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze AF 231.
8. Do každé jamky řádku H první destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze AC 272.
9. Do každé jamky druhé destičky se napipetuje 10  $\mu$ l připravené suspenze TM 445.
10. Titrační destička se přiklopí víčkem a inkubuje v termostatu při 35  $^{\circ}$ C. První destička se odečítá po 24 h a 48 h a druhá destička s TM 445 po 72 h a 120 h.

Po uplynutí inkubační doby se hodnotí nárůst v jamkách. Koncentrace látky inhibující růst houby odpovídala jamce, ve které došlo k 80 % potlačení růstu kvasinky či plísně – MIC<sub>80</sub>.

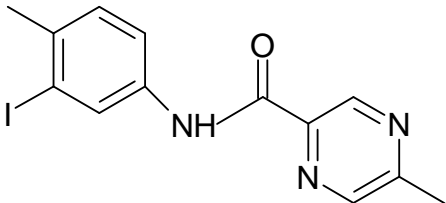
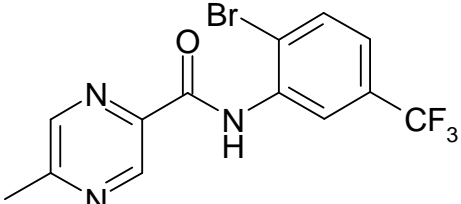
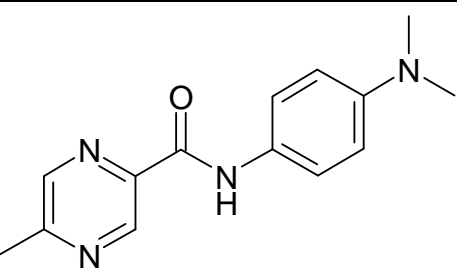
## 4 SEZNAM TESTOVANÝCH LÁTEK

Do pokusu byly zařazeny látky syntetizované na Katedře anorganické a organické chemie (Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc., Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc., Mgr. Aleš Imramovský) a na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D., Doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Chemické názvy diamidů, styrylbezoxazolů a benzoxazepin-dionů vytvořil program ChemDraw verze 8.0. Tento formát je akceptován Americkou chemickou společností (ACS).

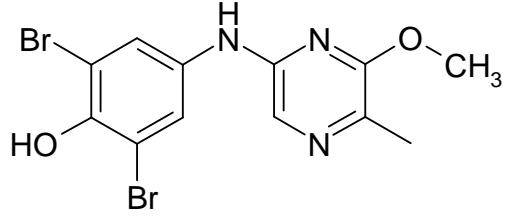
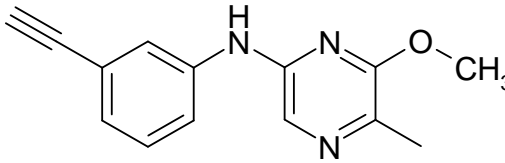
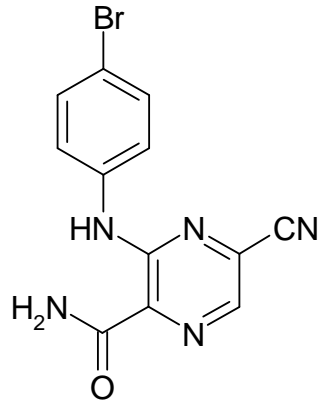
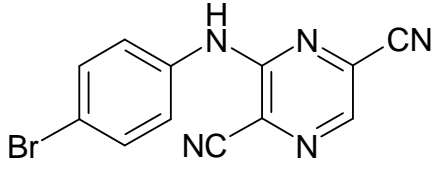
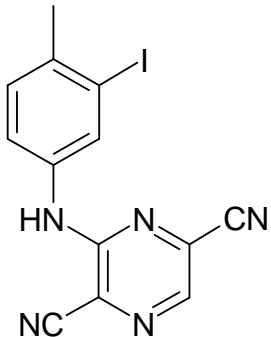
### 4.1 Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny

Tab. 1 Anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny

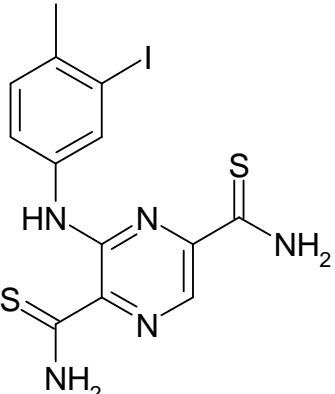
Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
MD 527/II 353,16		<i>N</i> -(3-jod-4-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid	21,80 mg
MD 548/II 360,13		<i>N</i> -(2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid	11,00 mg
MD 555/II 256,30		<i>N</i> -(4-(dimethylamino)fenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid	6,30 mg

## 4.2 Arylaminopyraziny

Tab. 2 Arylaminopyraziny

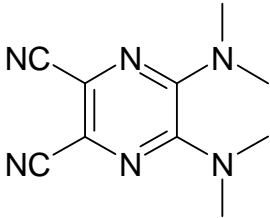
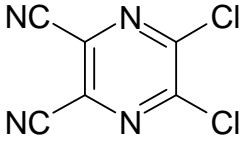
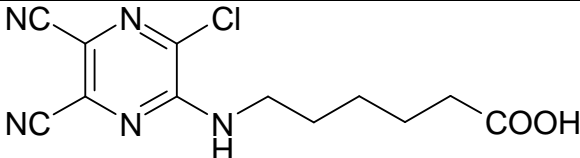
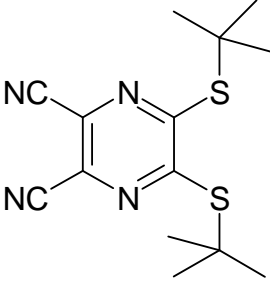
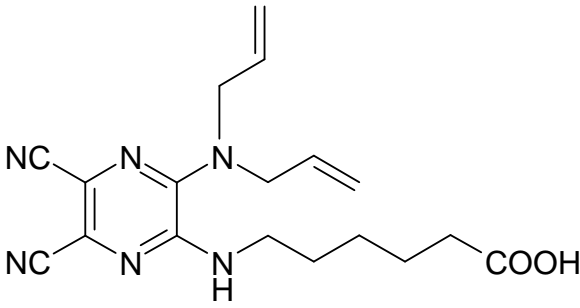
Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
MD 522/II  389,04		2,6-dibrom-4-(6-methoxy-5-methylpyrazin-2-ylamino)fenol	14,50mg
MD 578/II  239,27		N-(3-ethynylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin	8,10 mg
MD 443/II  318,13		3-(4-bromfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid	11,00 mg
MD 293/II  300,11		3-(4-bromfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril	12,00 mg
MD 441/II  361,15		3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril	15,50 mg



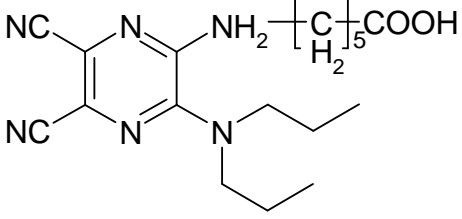
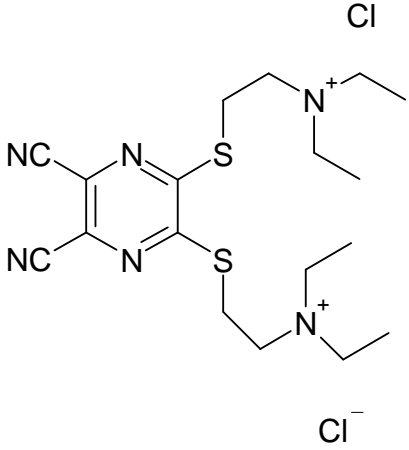
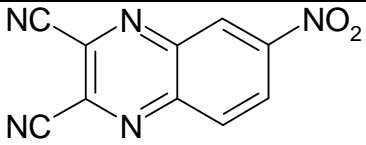
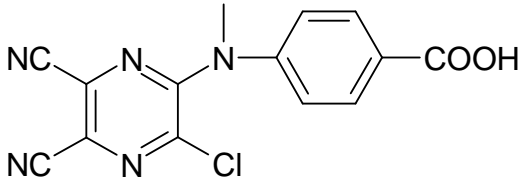
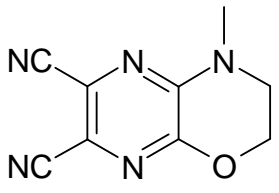
MD 442/II  429,31	 <p>The chemical structure shows a pyrazine ring substituted at the 2 and 5 positions with carbothioamide groups (-C(=S)NH<sub>2</sub>). At the 3-position, there is an amino group (-NH-) attached to a 3-iodo-4-methylphenyl ring.</p>	3-(3-jod-4- methylfenylamino)pyrazin- 2,5-bis(karbothioamid)	3,30 mg
----------------------------	---	--	---------

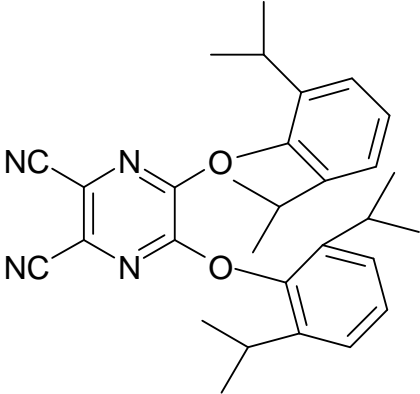
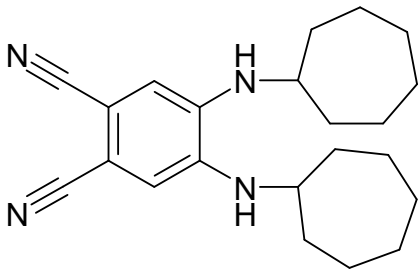
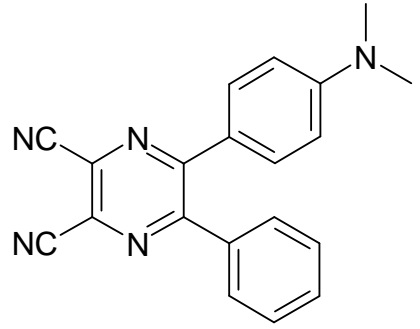
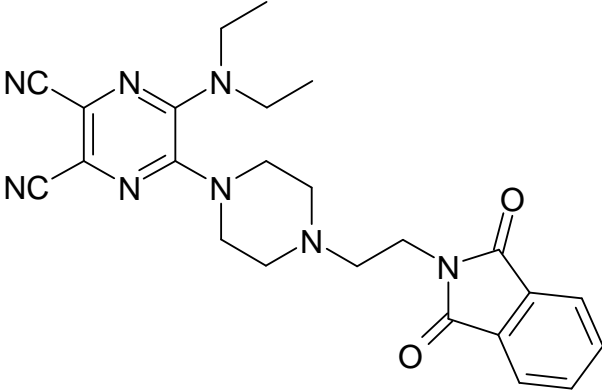
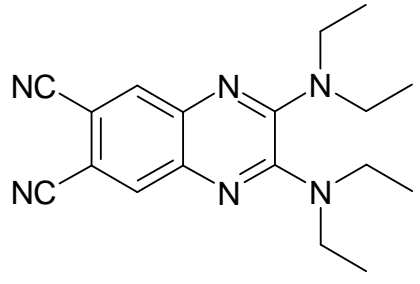
### 4.3 Pyrazin-2,3-dinitrily

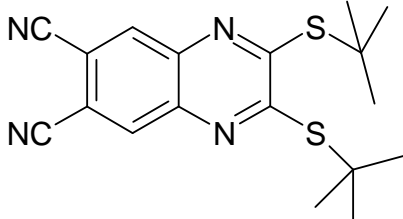
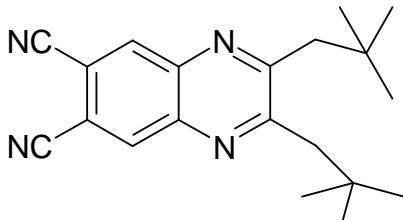
Tab. 3 Pyrazin-2,3-dinitrily

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
ZIP-13 216,25		5,6-bis(dimethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	9,30 mg
ZIP-17 199,00		5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril	9,10 mg
ZIP-20 293,71		5-[(3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)amino]hexanová kyselina	12,30 mg
ZIP-21 306,45		5,6-bis(tert-butylthio)pyrazin-2,3-dikarbonitril	12,60 mg
ZIP-25 354,42		6-(5,6-dikyan-3-(diallylamino)pyrazin-2-ylamino)hexanová kyselina	15,30 mg

ZIP-26 330,39		6-(5,6-dikyan-3-(diethylamin o)pyrazin-2-ylamino)hex anová kyselina	13,00 mg
ZIP-31 324,43		5,6-bis(cyklohex ylamino)pyr azin-2,3-dikarbonitril	13,10 mg
ZIP-33 384,57		5,6-bis(oktylami no)pyrazin- 2,3-dikarbonitril	15,20 mg
ZIP-37 274,33		5,6-dibutoxypyrazin-2,3-dikarbonitril	10,70 mg
ZIP-44 418,67		5,6-bis(oktylthio )pyrazin- 2,3-dikarbonitril	16,90 mg
ZIP-50 338,37		3,3'-(5,6-dikyanpyrazi n-2,3-diyl)bis(sulfa ndiyl)diprop anová kyselina	13,80 mg
ZIP-53 248,26		3-(5,6-dikyan-3-methylpyraz in-2-ylthio)propa nová kyselina	10,50 mg

ZIP-59 358,45		2-(5,6-dikyan-3-(dipropylamino)pyrazin-2-ylamino)hexanová kyselina	14,30 mg
ZIP-65 465,51		2,2'-(5,6-dikyanpyrazin-2,3-diyl)bis(sulfandiyl)bis(N,N-diethylethanamonium)-dichlorid	18,50 mg
ZIP-74 225,17		6-nitrochinoxalin-2,3-dikarbonitril	9,00 mg
ZIP-77 313,71		4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)(methylamino)benzoová kyselina	12,70mg
ZIP-80A 201,19		4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril	8,70 mg

<p>ZIP-87 482,63</p>		<p>5,6-bis(2,6-diisopropylphenoxy)pyrazin-2,3-dicarbonitril</p>	<p>19,10 mg</p>
<p>ZIP-99 352,49</p>		<p>5,6-bis(cycloheptylamino)pyrazin-2,3-dicarbonitril</p>	<p>14,50mg</p>
<p>ZIP-103 325,38</p>		<p>5-(4-(dimethylamino)phenyl)-6-phenylpyrazin-2,3-dicarbonitril</p>	<p>7,80 mg</p>
<p>ZIP-109 458,53</p>		<p>5-(diethylamino)-6-(4-(2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethyl)piperazin-1-yl)pyrazin-2,3-dicarbonitril</p>	<p>13,20 mg</p>
<p>MUZ-14 322,42</p>		<p>2,3-bis(diethylamino)chinoxalin-6,7-dicarbonitril</p>	<p>13,10 mg</p>

<p>MUZ-21 356,51</p>	 <p>The structure shows a chinoxaline ring system with two cyano groups (NC) at positions 6 and 7, and two tert-butylthio groups (S-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) at positions 2 and 3.</p>	<p>2,3-bis(<i>tert</i>-butylthio)chinoxalin-6,7-dicarbonitril</p>	<p>14,30 mg</p>
<p>MUZ-108 320,44</p>	 <p>The structure shows a chinoxaline ring system with two cyano groups (NC) at positions 6 and 7, and two neopentyl groups (CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) at positions 2 and 3.</p>	<p>2,3-di(neopentyl)chinoxalin-6,7-dicarbonitril</p>	<p>12,70 mg</p>

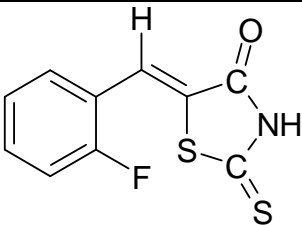
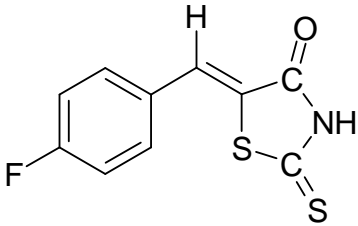
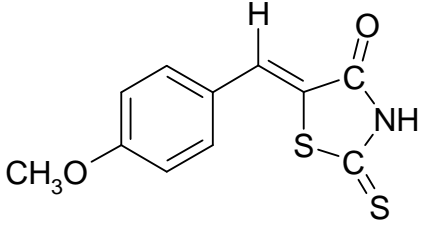
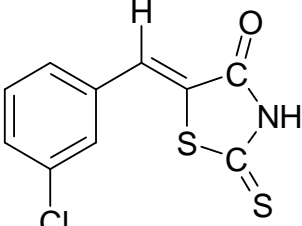
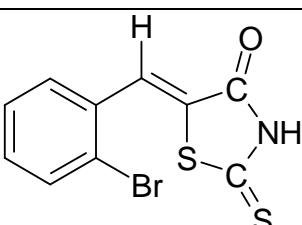
#### 4.4 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

Tab. 4 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
MD 571/II  270,76		butyl-5- <i>terc</i> - butyl-6- chlorpyrazin- 2-karboxylát	1,00 mg 10x méně naváženo
MD 569/II  284,78		isopentyl-5- <i>terc</i> -butyl-6- chlorpyrazin- 2-karboxylát	12,60 mg
MD 557/II  298,81		propyl-6- chlor-5- heptylpyrazin- 2-karboxylát	16,00 mg
MD 562/II  312,83		isobutyl-6- chlor-5- heptylpyrazin- 2-karboxylát	14,10 mg
MD 565/II  346,85		benzyl-6- chlor-5- heptylpyrazin- 2-karboxylát	17,70 mg
MD 560/II  298,81		isopropyl-6- chlor-5- heptylpyrazin- 2-karboxylát	16,00 mg

#### 4.5 Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu

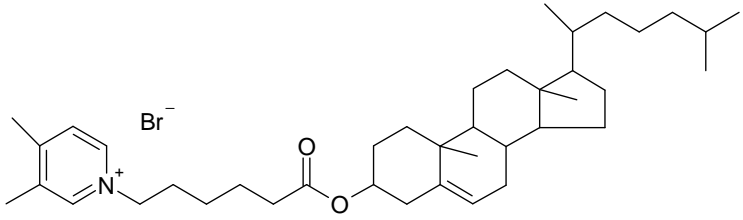
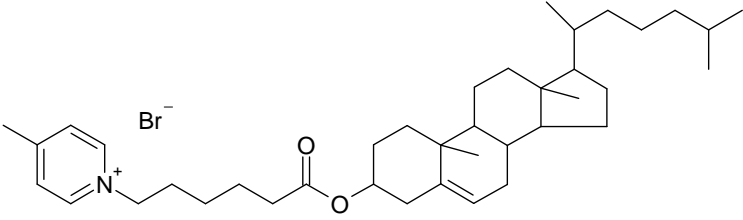
Tab. 5 Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
RHO-aa 239,29		(Z)-5-(2-fluorbenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	9,200 mg
RHO-cc 239,29		(Z)-5-(4-fluorbenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	9,600 mg
RHO-q 251,32		(Z)-5-(4-methoxybenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	10,800 mg
RHO-x 255,74		(Z)-5-(3-chlorbenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	10,100 mg
RHO-y 300,19		(Z)-5-(2-brombenzyliden)-2-thioxothiazolidin-4-on	11,800 mg



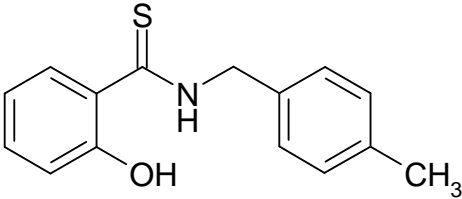
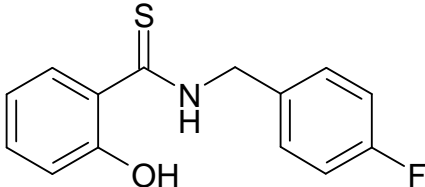
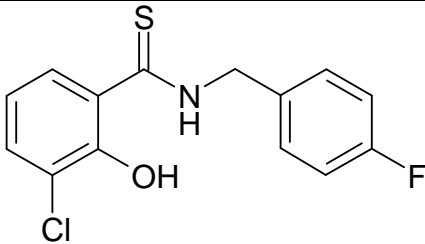
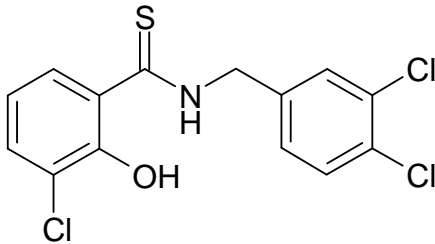
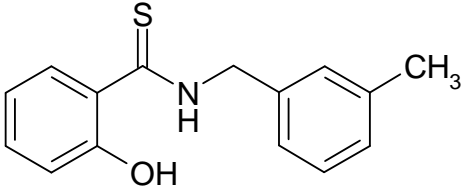
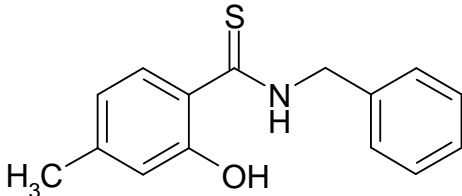
## 4.6 Estery cholesterolu a alkanových kyselin

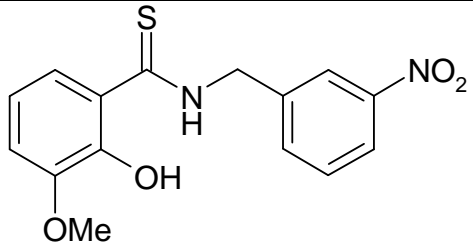
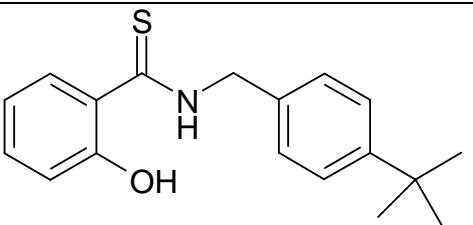
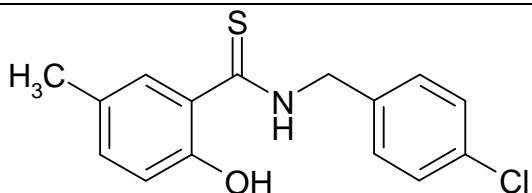
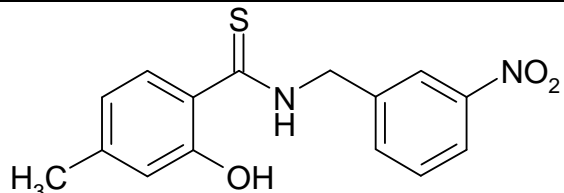
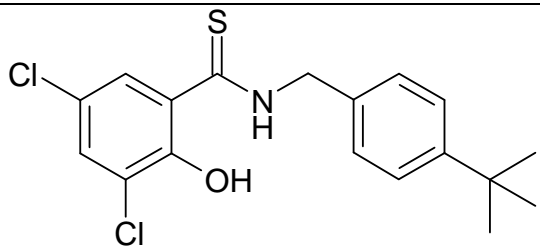
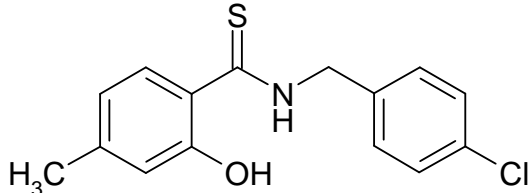
Tab. 6 Estery cholesterolu a alkanových kyselin

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
T 6181  669,41		1-(6-(10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyklopenta [a]phenanthren-3-yloxy)-6-oxohexyl)-3,4-dimethylpyridinium bromid	10 mg
T 6184  655,40		1-(6-(10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyklopenta [a]phenanthren-3-yloxy)-6-oxohexyl)-4-methylpyridinium bromid	10 mg

## 4.7 Deriváty thiosalicylamidu

Tab. 7 Deriváty thiosalicylamidu

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
T 5612  257,36		<i>N</i> -(4-methylbenzyl) salicylthioamid	10 mg
T 5617  261,32		<i>N</i> -(4-fluorbenzyl) salicylthioamid	10 mg
T 5619  295,75		5-chlor- <i>N</i> -(4- fluorbenzyl) salicylthioamid	10 mg
T 5621  356,66		5-chlor- <i>N</i> -(3,4- dichlorbenzyl) salicylthioamid	10 mg
T 5624  257,36		<i>N</i> -(3-methylbenzyl) salicylthioamid	10 mg
T 5626  257,36		<i>N</i> -benzyl-4- methylsalicylthioamid	10 mg

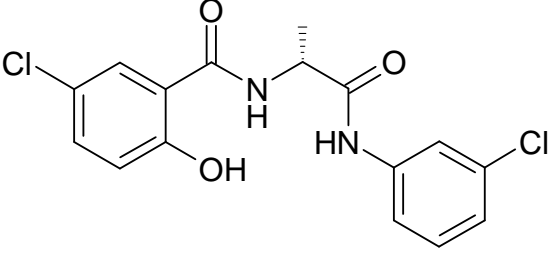
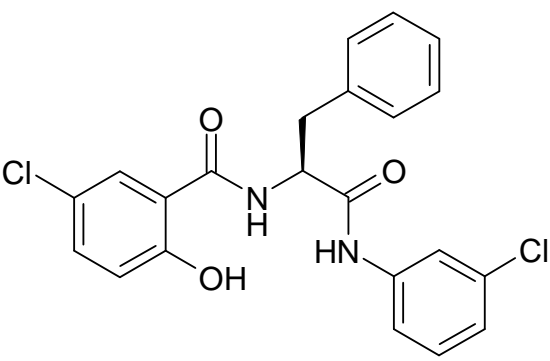
T 5628 318,35		<i>N</i> -(3-nitrobenzyl)-5-methoxysalicylthioamid	10 mg
T 5630 299,44		<i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)salicylthioamid	10 mg
T 5632 291,80		<i>N</i> -(4-chlorobenzyl)-3-methylsalicylthioamid	10 mg
T 6103 302,35		4-methyl- <i>N</i> -(3-nitrobenzyl)salicylthioamid	10 mg
T 6111 368,33		<i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)-3,5-dichlorosalicylthioamid	10 mg
T 6114 291,80		<i>N</i> -(4-chlorobenzyl)-4-methylsalicylthioamid	10 mg

## 4.8 Diamidy

Tab. 8 Diamidy

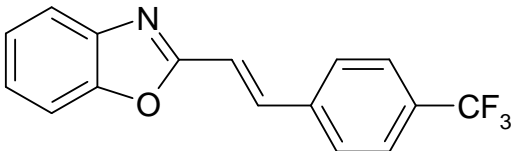
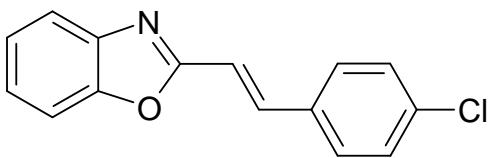
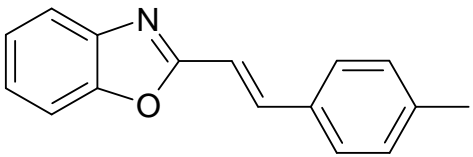
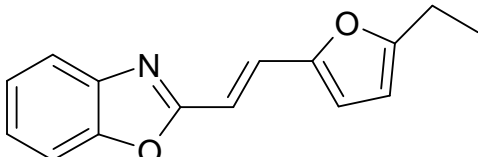
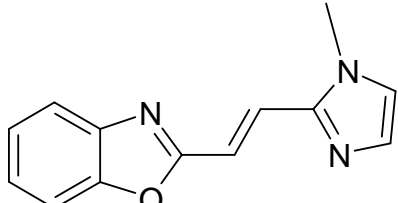
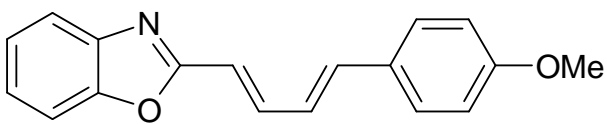
Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
AIM – 122  353,20		<i>N</i> -(( <i>R</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)ethyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	12,5 mg
AIM – 109  381,2		<i>N</i> -(( <i>R</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-2-methylpropyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	13,2 mg
AIM – 113  429,30		<i>N</i> -(( <i>R</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	12,5 mg
AIM – 106  473,75		<i>N</i> -(( <i>R</i> )-1-(4-bromofenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	12,5 mg

AIM – 116  463,74		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(3,4-dichlorofenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid	15,7 mg
AIM – 117  353,20		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)ethyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid	15,7 mg
AIM – 101  381,25		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-2-methylpropyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid	15,9 mg
AIM – 127  429,30		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(4-chlorofenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid	17,9 mg
AIM – 124  339,17		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(3-chlorofenylkarbamoyl)methyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid	14,7 mg

AIM – 108  353,20		<i>N</i> -(( <i>R</i> )-1-(3-chlorophenyl)ethyl)-5-chloro-2-hydroxybenzamid	10,8 mg
AIM – 76  429,30		<i>N</i> -(( <i>S</i> )-1-(3-chlorophenyl)ethyl)-2-phenylethyl-5-chloro-2-hydroxybenzamid	12,8 mg

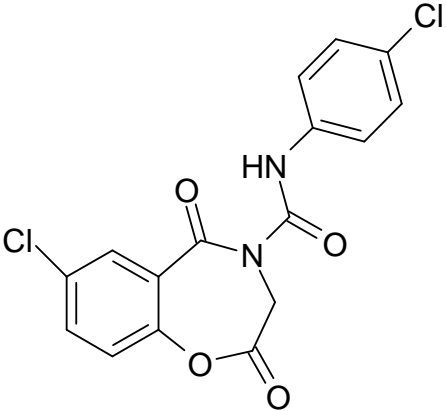
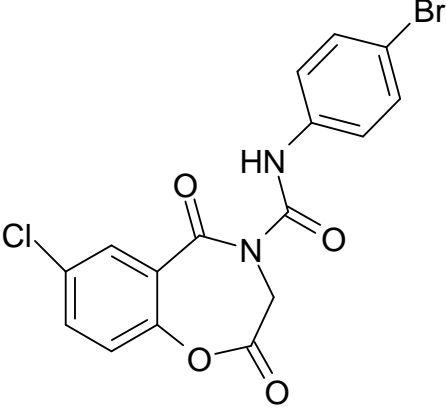
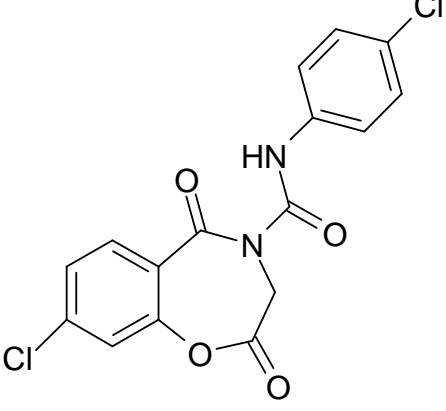
## 4.9 Styrylbenzoxazoly

Tab. 9 Styrylbenzoxazoly

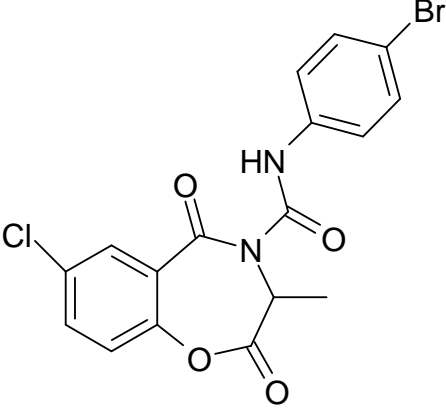
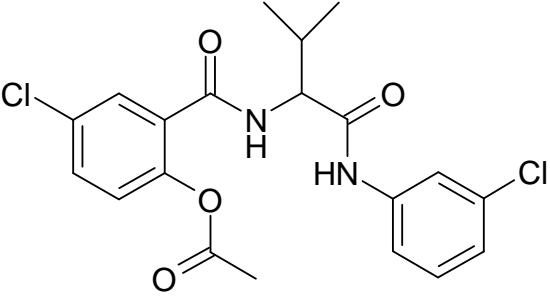
Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
AIM – 151  289,25		2-(4-(trifluormethyl)styryl) benzo[d]oxazol	9,8 mg
AIM – 153  255,70		2-(4- chlorostyryl)benzo[d]oxazol	8,4 mg
AIM – 155  235,28		2-(4-methylstyryl) benzo[d]oxazol	8,7 mg
AIM – 158  239,27		2-((E)-2-(5-ethylfuran-2- yl)vinyl)benzo[d]oxazol	8,6 mg
AIM – 161  225,25		2-((E)-2-(1-methyl-1 <i>H</i> - imidazol-2- yl)vinyl)benzo[d]oxazol	7,2 mg
AIM – 163  277,32		2-(4-(4- methoxyfenyl)buta-1,3- dienyl)benzo[d]oxazol	8,1 mg

## 4.10 Benzoxazepin-diony

Tab. 10 Benzoxazepin-diony

Kód + mol. hm.	vzorec	chemický název	navážka
AIM – 1 365,17		7-chlor- <i>N</i> -(4-chlorfenyl)-2,3-dihydro-2,5-dioxobenzo[f][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i> )-karboxamid	13,3 mg
AIM – 17 409,6		<i>N</i> -(4-bromfenyl)-7-chlor-2,3-dihydro-2,5-dioxobenzo[f][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i> )-karboxamid	5,2 mg
AIM – 12 365,17		8-chlor- <i>N</i> -(4-chlorfenyl)-2,3-dihydro-2,5-dioxobenzo[f][1,4]oxazepin-4(5 <i>H</i> )-karboxamid	16,0 mg



AIM – 84  423,65		<i>N</i> -(4-bromfenyl)-7-chlor- 2,3-dihydro-3-methyl-2,5- dioxobenzo[f][1,4]oxazepin- 4(5 <i>H</i> )-karboxamid	13,7 mg
Ac – AIM – 110  423,29		2-(1-(3- chlorfenylkarbamoyl)-2- methylpropylkarbamoyl)-4- chlorofenyl acetát	16,3 mg

## 5 VÝSLEDKY

Tučně jsou znázorněny hodnoty MIC v rámci testovaného rozmezí. Znaménko „>“ s číslem určuje, že v této nejvyšší koncentraci je látka neúčinná. Odečet nárůstu v jamkách se hodnotil po 24h a 48 h a kmen TM po 72 h a 120 h.

### 5.1 Anilidy pyrazinkarboxylových kyselin

Tab. 11 Stanovení MIC anilidů pyrazinkarboxylových kyselin

KMEN (kód)		MD 527/II	MD 548/II	MD 555/II
CA	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
CT	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
CK	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
CG	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
TB	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
AF	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
AC	24 h	>125	>125	>500
	48 h	>125	>125	>500
TM	72 h	>125	>125	>500
	120 h	>125	>125	>500

Skupina anilidů pyrazinkarboxylových kyselin se jevila jako velmi málo účinná. Žádná z látek v daném koncentračním rozmezí nejevila antifungální aktivitu.

## 5.2 Arylaminopyraziny

Tab. 12 Stanovení MIC arylaminopyrazinů

KMEN (kód)		MD 522/II	MD 578/II	MD 443/II	MD 293/II	MD 441/II	MD 442/II
CA	24 h	<b>125</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
CT	24 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	>500	>500	>125	>125	>125	>62,5
CK	24 h	<b>250</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	<b>250</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
CG	24 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	>500	>500	>125	>125	>125	>62,5
TB	24 h	<b>250</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
AF	24 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	>500	>500	>125	>125	>125	>62,5
AC	24 h	<b>500</b>	>500	>125	>125	>125	>62,5
	48 h	>500	>500	>125	>125	>125	>62,5
TM	72 h	<b>125</b>	>500	>125	<b>15,62</b>	>125	>62,5
	120 h	<b>125</b>	>500	>125	<b>15,62</b>	>125	>62,5

Ze skupiny arylaminopyrazinů se jevila jako nejvíce účinná látka MD 522/II, kdy nejnižší MIC byla dosažena u kmene TM ( $\text{MIC}_{\text{MD 522/II}} = 125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 i 120 hod), na který působila i látka MD 293/II s nižší hodnotou MIC a to dokonce 15,62  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 i 120 hod.

### 5.3 Pyrazin-2,3-dinitrily

Tab. 13 Stanovení MIC pyrazin-2,3-dinitrilů

KMEN (kód)		ZIP – 13	ZIP – 17	ZIP – 20	ZIP – 21	ZIP – 25	ZIP - 26
CA	24 h	>250	>500	>500	<b>62,5</b>	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	<b>125</b>	>500	>500
CT	24 h	>250	>500	>500	<b>62,5</b>	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	<b>125</b>	>500	>500
CK	24 h	>250	>500	>500	<b>125</b>	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500
CG	24 h	>250	>500	>500	<b>125</b>	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	<b>125</b>	>500	>500
TB	24 h	>250	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500
AF	24 h	>250	>500	>500	>250	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>250	>500	>500
AC	24 h	>250	>500	>500	>250	>500	>500
	48 h	>250	>500	>500	>250	>500	>500
TM	72 h	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500
	120 h	>250	<b>250</b>	<b>500</b>	>250	>500	>500

Tab. 14 Stanovení MIC pyrazin-2,3-dinitrilů (pokračování)

KMEN (kód)		ZIP – 31	ZIP – 33	ZIP – 37	ZIP - 44	ZIP - 50	ZIP - 53
CA	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
CT	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
CK	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
CG	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
TB	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
AF	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
AC	24 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
TM	72 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	120 h	>250	>125	>500	>125	>500	>500

Tab. 15 Stanovení MIC pyrazin-2,3-dinitrilů (pokračování)

KMEN (kód)		ZIP – 59	ZIP – 65	ZIP – 74	ZIP – 77	ZIP – 80A	ZIP - 87
CA	24 h	>500	>250	<b>15,62</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>31,25</b>	>500	>500	>125
CT	24 h	>500	>250	<b>62,5</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>125</b>	>500	>500	>125
CK	24 h	>500	>250	<b>15,62</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>31,25</b>	>500	>500	>125
CG	24 h	>500	>250	<b>125</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>125</b>	>500	>500	>125
TB	24 h	>500	>250	<b>31,25</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>125</b>	>500	>500	>125
AF	24 h	>500	>250	<b>31,25</b>	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	<b>125</b>	>500	>500	>125
AC	24 h	>500	>250	>500	>500	>500	>125
	48 h	>500	>250	>500	>500	>500	>125
TM	72 h	>500	>250	<b>7,81</b>	<b>125</b>	>500	>125
	120 h	>500	>250	<b>62,5</b>	<b>500</b>	>500	>125

Tab. 16 Stanovení MIC pyrazin-2,3-dinitrilů (pokračování)

KMEN (kód)		ZIP – 99	ZIP – 103	ZIP – 109	MUZ – 14	MUZ – 21	MUZ – 108
CA	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
CT	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
CK	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
CG	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
TB	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
AF	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
AC	24 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	48 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
TM	72 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500
	120 h	>250	>125	>125	>125	>125	>500

Rozsáhlá skupina pyrazin-2,3-dinitrilů obsahuje 24 látek, které můžeme souhrnně označit jako velmi slabě účinné. Látka ZIP – 21 účinkovala na kmeny CA, CT, CK, CG a TB, nejnižší MIC dosáhla sloučenina u CA a CT ( $MIC_{ZIP-21} = 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hodinách). Látka ZIP – 74 působila na všechny kmeny kromě kmenu AC, na který neúčinkovala vůbec. Nejnižší hodnota  $MIC_{ZIP-74} = 7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 hodinách byla u kmenu TM. Nejnižších hodnot MIC bylo dosaženo u kmene TM i u látek ZIP – 13, ZIP – 17, ZIP – 20 a ZIP – 77.

## 5.4 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny

Tab. 17 Stanovení MIC esterů pyrazinkarboxylové kyseliny

KMEN (kód)		MD 557/II	MD 562/II	MD 565/II	MD 560/II	MD 571/II	MD 569/II
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CG	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
TB	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
TM	72 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>125	>500

Při hodnocení série látek, esterů pyrazinkarboxylových kyselin, nevykázaly tyto sloučeniny žádnou antimykotickou aktivitu.



## 5.5 Deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu

Tab. 18 Stanovení MIC derivátů (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu

KMEN (kód)		RHO – aa	RHO – cc	RHO – q	RHO – x	RHO - y
CA	24 h	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>500	<b>125</b>	<b>62,5</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	>500	>125	<b>250</b>
CT	24 h	<b>125</b>	>125	>500	>125	<b>125</b>
	48 h	<b>125</b>	>125	>500	>125	<b>250</b>
CK	24 h	>250	>125	>500	>125	>250
	48 h	>250	>125	>500	>125	>250
CG	24 h	>250	>125	>500	>125	<b>125</b>
	48 h	>250	>125	>500	>125	<b>250</b>
TB	24 h	<b>125</b>	>125	>500	>125	<b>125</b>
	48 h	<b>250</b>	>125	>500	>125	>250
AF	24 h	<b>250</b>	>125	>500	>125	<b>62,5</b>
	48 h	<b>250</b>	>125	>500	>125	<b>250</b>
AC	24 h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	>500	<b>125</b>	<b>31,25</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>125</b>	>500	>125	<b>62,5</b>
TM	72 h	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	>500	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>
	120 h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	>500	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>

Kromě látky RHO – q vykázaly antifungální aktivitu všechny sledované sloučeniny. Na většinu testovaných kmenů byla nejvíce citlivá látka RHO – y a RHO – aa. Nejnižší MIC byly dosaženy u kmene TM ( $MIC_{RHO-y} = 31,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 i 120 hodinách).

## 5.6 Estery cholesterolu a alkanových kyselin

Tab. 19 Stanovení MIC esterů cholesterolu a alkanových kyselin

KMEN (kód)		T 6181	T 6184
CA	24 h	<b>62,5</b>	>125
	48 h	>125	>125
CT	24 h	<b>62,5</b>	>125
	48 h	<b>62,5</b>	>125
CK	24 h	<b>31,25</b>	>125
	48 h	<b>62,5</b>	>125
CG	24 h	<b>125</b>	>125
	48 h	<b>125</b>	>125
TB	24 h	<b>125</b>	>125
	48 h	>125	>125
AF	24 h	<b>125</b>	>125
	48 h	>125	>125
AC	24 h	>125	>125
	48 h	>125	>125
TM	72 h	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>
	120 h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>

V rámci dané skupiny byly testovány pouze 2 látky, sloučenina T 6184 byla účinná pouze na kmen TM, druhá sloučenina působila téměř na všechny námi testované kmeny. Nejcitlivěji reagoval *Trichophyton mentagrophytes* (MIC<sub>T6181</sub> = 15,62 μmol.l<sup>-1</sup> po 72 hodinách).

## 5.7 Deriváty thiosalicylamidu

Tab. 20 Stanovení MIC derivátů thiosalicylamidu

KMEN (kód)		T 5612	T 5617	T 5619	T 5621	T 5624	T 6126
CA	24 h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
CT	24 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>125</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
CK	24 h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>250</b>	<b>125</b>
CG	24 h	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>125</b>	<b>125</b>
	48 h	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
TB	24 h	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>3,9</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>
	48 h	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>7,81</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>
AF	24 h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>3,9</b>	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>
	48 h	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>
AC	24 h	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	<b>62,5</b>	<b>7,81</b>
	48 h	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>7,81</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>
TM	72 h	<b>31,25</b>	<b>7,81</b>	<b>15,62</b>	<b>0,98</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>
	120 h	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>0,98</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>

Tab. 21 Stanovení MIC derivátů thiosalicylamidu (pokračování)

KMEN (kód)		T 5628	T 5630	T 5632	T 6103	T 6111	T 6114
CA	24 h	<b>125</b>	>500	<b>62,5</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	<b>125</b>	>500	>500	>500
CT	24 h	<b>250</b>	>500	<b>125</b>	>500	>500	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500
CK	24 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500
TB	24 h	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>500
	48 h	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	<b>500</b>	<b>62,5</b>	>500
AF	24 h	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>62,5</b>	>500	<b>15,62</b>	>500
	48 h	<b>250</b>	>500	<b>125</b>	>500	<b>15,62</b>	>500
AC	24 h	<b>31,25</b>	<b>15,62</b>	<b>31,25</b>	<b>250</b>	<b>3,9</b>	>500
	48 h	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	<b>500</b>	<b>3,9</b>	>500
TM	72 h	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>3,9</b>	>500
	120 h	<b>62,5</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>	<b>62,5</b>	<b>3,9</b>	>500

Deriváty thiosalicylamidu byly nejvíce působící skupinou ze všech látek, které byly testovány. Největší antifungální účinek byl nalezen u derivátu T 5621, který inhiboval velmi silně kmen TM ( $MIC_{T\ 5621} = 0,98\ \mu\text{mol.l}^{-1}$  za 72 h i 120 h). U ostatních kmenů byla MIC také velmi nízká.

## 5.8 Diamidy

Tab. 22 Stanovení MIC diamidů

KMEN (kód)		AIM – 122	AIM – 109	AIM – 113	AIM – 106	AIM – 116	AIM – 117
CA	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
CT	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
CK	24 h	>125	<b>62,5</b>	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	<b>125</b>	>125	>500	>125	>250
CG	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
TB	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
AF	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
AC	24 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
	48 h	>125	>125	>125	>500	>125	>250
TM	72 h	>125	<b>62,5</b>	<b>125</b>	>500	>125	>250
	120 h	>125	<b>62,5</b>	>125	>500	>125	>250

Tab. 23 Stanovení MIC diamidů (pokračování)

KMEN (kód)		AIM - 101	AIM - 127	AIM – 124	AIM - 108	AIM - 76
CA	24 h	>125	<b>125</b>	>125	>125	>125
	48 h	>125	<b>125</b>	>125	>125	>125
CT	24 h	>125	<b>125</b>	>125	<b>31,25</b>	<b>31,25</b>
	48 h	>125	>125	>125	<b>125</b>	<b>125</b>
CK	24 h	>125	<b>125</b>	>125	<b>31,25</b>	<b>1,95</b>
	48 h	>125	>125	>125	<b>62,5</b>	<b>3,9</b>
CG	24 h	>125	>125	>125	>125	<b>125</b>
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
TB	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
AF	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
AC	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
TM	72 h	<b>7,81</b>	>125	>125	>125	<b>125</b>
	120 h	<b>7,81</b>	>125	>125	>125	>125

Ze skupiny diamidů nemělo žádnou antimykotickou aktivitu 5 sloučenin z 11. Látka AIM – 101 působila pouze na kmen TM ( $MIC_{AIM-101} = 7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  za oba časové úseky). Jako sloučenina s nejlepším antimykotickým účinkem se jevila AIM – 76, která působila nejvíce na kmene CT, CK a částečně na kmene CG a TM. Nejnižší hodnota MIC byla dosažena u kmene CK ( $MIC_{AIM-76} = 1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hodinách).

## 5.9 Styrylbenzoxazoly

Tab. 24 Stanovení MIC styrylbenzoxazolů

KMEN (kód)		AIM – 151	AIM – 153	AIM – 155	AIM – 158	AIM – 161	AIM – 163
CA	24 h	>250	>125	>500	<b>500</b>	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
CT	24 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
CK	24 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
CG	24 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
TB	24 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
AF	24 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	>500	>125	>125
AC	24 h	>250	>125	>500	<b>250</b>	>125	>125
	48 h	>250	>125	>500	<b>250</b>	>125	>125
TM	72 h	>250	>125	>500	<b>250</b>	>125	>125
	120 h	>250	>125	>500	<b>500</b>	>125	>125

Pouze látka AIM – 158 jevila mírné antifungální účinky a to na kmeny AC a TM ( $MIC_{AIM-158} = 250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  za oba časové úseky u kmene AC). Ostatní sloučeniny nevykázaly aktivitu proti sledovaným kmenům v daném koncentračním rozmezí.

## 5.10 Benzoxazepin-diony

Tab. 25 Stanovení MIC benzoxazepin-dionů

KMEN (kód)		AIM - 1	AIM - 12	AIM - 17	AIM - 84	Ac – AIM - 110
CA	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
CT	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
CK	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
CG	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
TB	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
AF	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
AC	24 h	>125	>125	>125	>125	>125
	48 h	>125	>125	>125	>125	>125
TM	72 h	>125	>125	>125	<b>31,25</b>	>125
	120 h	>125	>125	>125	<b>62,5</b>	>125

Tato série látek se jevila jako velmi málo účinná. Sloučenina AIM – 84 ukázala střední účinnost na kmen TM (po 72 h i 120 h).  $MIC_{AIM-84} = 31,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  za 72 hodin.



## 6 DISKUSE

Vývoj antibiotik, protinádorových léků, pokroky v oblasti intenzivní péče, pokrok v imunosupresivní potransplantační terapii a virová pandemie HIV, to vše přispělo ke snížení obranyschopnosti a k rozvoji invazivních mykotických infekcí. Zjevný zvyšující se výskyt rezistentních kmenů hub k některým antifungálním látkám vede k zavedení nových antimykotik. V důsledku toho existuje větší potřeba opakovat *in vitro* citlivosti metody jako vodítka pro výběr a monitoring těchto léků (Colombo et al., 1995). Hlavním cílem *in vitro* citlivosti je předpovědět dopad podání testovaného léku na výsledek onemocnění (Cormican, Pfaller, 1996).

K velké skupině látek, která lze zahrnout mezi deriváty pyrazinu, patří anilidy pyrazinkarboxylové skupiny, arylaminopyraziny, pyrazin-2,3-dinitrily a estery pyrazinkarboxylové kyseliny. Tyto látky jsou syntetizovány a testovány na naší fakultě již řadu let.

Z dřívějších studií bylo prokázáno, že alkylace, amidace, acylace pyrazinového kruhu nebo substituce chlorem zvyšuje antifungální účinnost (Doležal et al., 1999, Doležal et al., 2000, Doležal et al., 2002). V jedné z těchto studií se autoři zabývali syntézou řady heterocyklických amidů, které byly připraveny substitucí pyrazin-2-karboxylové kyseliny a 2-aminothiazolu, 2-amino-4-methyl nebo 2-amino-5-methylthiazolu, 2-bromanilinu (Doležal et al., 2006). Cílem těchto prací bylo stanovit vztah mezi chemickou strukturou a antifungálním účinkem. Vyhodnocení *in vitro* antifungální aktivity bylo provedeno na 8 houbových kmenech pomocí mikrodiluční bujónové metody. Výsledky neukázaly žádnou zajímavou účinnost sloučenin na většinu testovaných kmenů, pouze látky 5-*terc*-butyl-6-chloro-*N*-(5-methyl-1,3-thiazol-2-yl) pyrazin-2-karboxamid a 5-*terc*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl) pyrazin-2-karboxamid ukázaly některé silné *in vitro* antifungální účinnosti proti TM (MIC = 31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 h. a 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 120 hod.). Tyto výsledky nedovolily učinit podrobné závěry o možném vztahu chemické struktury na účinnosti látky (Doležal et al., 2006).

Studie z roku 2008 (Doležal et al., 2008) testovala další řadu derivátů pyrazinkarboxamidů (anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny), látka s nejvyšším antifungálním efektem proti TM byla 5-*terc*-butyl-*N*-(3-trifluoromethylphenyl) pyrazin-2-karboxamid (MIC = 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech).

V roce 2006 byly připraveny 3-arylamino-pyrazin-2,5-dikarbonitrily, tyto látky ukázaly významné antifungální a antimykobakteriální účinky, byly analyzovány pomocí reverzní fáze vysoce účinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) (Jampílek, Pálek, Doležal, 2006). V předchozí studii z roku 2005 (Pálek et al., 2005) byly testovány sloučeniny odvozené od pyrazin-2,5-dikarbonitrilu, respektive 3-arylamino derivátu. Nejlepší fungicidní výsledky dal 3 - [2,4-dibrom-6-nitro-fenylamino] pyrazin-2,5-dikarbonitril, testy se prováděly opět mikrodiluční bujónovou metodou (Espinel-Ingroff et al., 1992) na 8 testovaných kmenech hub (CA, CT, CK, CG, TB, AF, AC, TM). MIC této látky byly: CA (1,95  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CT (7,82  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 7,82  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CK (3,91  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CG (7,82  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), TB (3,91  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), AF (3,91  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), AC (7,81  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a TM (15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 15,63  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

Estery pyrazinkarboxylových kyselin jsou také velmi zkoumanou skupinou látek, zatím se jejich účinky projevily proti mykobakteriím, např. účinek látky *terc*-butylester 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny prokázal 100x větší účinnost než samotný pyrazinamid proti *Mycobacterium tuberculosis* (Bergmann, Cynamon, Welch, 1996).

V našem testování se zcela neúčinnou skupinou staly anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny (Tab. 1 a Tab. 11). Hodnocení probíhalo i v roce 2001 (Bajerová, 2001), kdy neaktivnější látka měla substituci chlorem v poloze 6' pyrazinového jádra a v poloze 3' substituci metylové skupiny na fenylovém jádře. Tato látka projevila slabou aktivitu proti všem testovaným kmenům v obou sledovaných časech. V našem testování měly všechny látky na pyrazinovém jádře metylové substituenty vždy v poloze 5', na fenylovém jádře se substituenty měnily. Přesto nebyla žádná z látek aktivní.

Druhou testovanou skupinou byly arylaminopyraziny (Tab. 2 a Tab. 12). Látky MD 441/II, MD 442/II, MD 443/II a MD 578/II neměly žádnou antifungální aktivitu. Látka MD 293/II měla středně účinnou aktivitu pouze na kmen TM, hodnota MIC se nezměnila ani po druhém čase (120 h), můžeme hovořit o fungicidním účinku na daný kmen. Slabou účinnost jsme pozorovali u MD 522/II, tato sloučenina má v poloze 2' a 6' na benzenovém jádře bromy. Tato látka vykazovala slabou aktivitu proti všem kmenům. Nejnižších hodnot MIC bylo dosaženo u vláknité mikromycety *Trichophyton mentagrophytes*.

Třetí zkoumanou skupinou patřící do derivátů pyrazinu byly pyrazin-2,3-dinitrily (Tab. 3 a Tab. 13,14,15,16). Hodnoceno bylo 24 látek s odlišným substituentem

v poloze 5' a 6' pyrazinového jádra. Kromě látek ZIP-21a ZIP-74 nebyly účinné žádné jiné. ZIP-21 má v polohách 5' a 6' *terc*-butylthioskupinu, sloučenina působila na kmeny CA, CT, CK, CG a TB, hodnoty MIC byly nejnižší u kmenů CA a CT, kde dosahovaly hodnot  $62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hodinách a  $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 48 hodinách. Podle toho můžeme soudit, že látka ZIP-21 má slabou antifungální aktivitu. Mnohem výraznějších hodnot bylo dosaženo u sloučeniny ZIP-74 (6 – nitrochinoxalin-2,3-dikarbonitril), která kromě kmenu AC působila na všechny dané kmeny. Nejnižší hodnoty MIC patřily opět ke kmenu *Trichophyton mentagrophytes* -  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 hodinách a  $62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 120 hodinách. Tato sloučenina jako jediná z látek obsahovala nitroskupinu.

Estery pyrazinkarboxylové kyseliny (Tab. 4 a Tab. 17) neměly žádný účinek na kmeny CA, CT, CK, CG, TB, AF, AC a TM.

Rhodaninový skelet je přítomen v mnoha třídách biologicky aktivních látek, řada z nich prokázala i antifungální aktivitu (Orchard et al., 2004). Některé 5-arylkyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on deriváty byly připraveny jako potenciální antimikrobiální sloučeniny (Jampílek et al., 2007). Podle studie z roku 2009 (Doležel et al., 2009) byly některé deriváty [(Z5)-(arylkyliden-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)] octové kyseliny připraveny jako potenciálně antifungální látky. Většina sloučenin ale neprokázala nijak výraznou antifungální aktivitu kromě látky ((Z5)-[4-oxo-5-(pyridin-2-ylmethylidín)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl]), která silně inhibovala růst CT, CK a CG. Tyto výsledky se neshodují s výzkumy Sortino et al., 2007, který studoval antifungální vlastnosti 3-nesubstituovaného 5-arylkylidenrhodaninu a zjistil, že nahrazením benzenového kruhu za pyridinový má za následek ztrátu antifungálních vlastností.

V naší práci byly testovány deriváty (Z)-5-arylmethyliden-2-thioxothiazolidin-4-onu (Tab. 5 a Tab. 18) lišily se od sebe různou substituční skupinou na různém místě benzenového jádra. Látka RHO-q, která má v poloze 4' methoxy – skupinu neúčinkovala na žádný testovaný kmen. Ostatní sloučeniny měly za substituent halogeny. Nejlepších výsledků dosáhla látka RHO-aa mající v poloze 2' fluor a RHO-y mající v poloze 2' brom. Nejvíce citlivým kmenem se ukázal být TM. Méně citlivým se stal kmen CG a necitlivým kmen CK. Středně účinnými látkami byly RHO-cc a RHO-x, první uvedená měla v poloze 4' fluor, druhá v poloze 3' chlor. RHO-cc působila na kvasinku CA a kmen AC a TM, hodnoty MIC se pohybovaly po inkubaci

48 hodin v hodnotě 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  u CA a TM a v hodnotě 125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 48 hodinách u AC.

Studie z roku 2007 (Adamec et al., 2007) prokázala, že hybridní molekuly estronu vykázaly značnou biologickou aktivitu. Sloučeniny 1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid, 4-Benzylsulfanyl-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid, 4-(4-hlorobenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-triene-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid a 4-(4-Methylbenzylsulfanyl)-1-[(17-oxo-estra-1,3,5(10)-trien-3-yloxy)-heptyl]-pyridinium bromid vykázaly významnou antifungální aktivitu. Průměrné hodnoty MIC po 48 hod. inkubace u všech sloučenin se pohybovaly v rozmezí u CA (3,9 - 7,8  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CT (7,8 - 15,6  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CK (7,8 - 31,3  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), CG (7,8 - 15,6  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), TB (7,8  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), AF (7,8 - 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), AC (15,2 - 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a TM po 120 hod. inkubace 7,8 – 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Podle těchto výsledků můžeme soudit, že steroidní část je odpovědná za biologickou aktivitu.

V naší práci byly testovány 2 estery cholesterolu a alkanových kyselin (T 6181 a T 6184). Ty se navzájem lišily tím, že na pyridinovém jádře měly methylové skupiny. Látka T 6181 ji měla v poloze 3' a 4' a látka T 6184 pouze v poloze 4'. T 6181 měla mnohem větší účinnost, působila na všechny testované kmeny kromě kmenu AC, nejcitlivěji účinkovala na TM. Sloučenina T 6184 byla účinná pouze na kmen *Trichophyton mentagrophytes*.

N-benzylsalicylthioamidy byly již testovány jako vysoce potenciální antituberkulotika (Dolezal et al., 2009) a jako potenciálně antibakteriální sloučeniny (Petrlíková et al., 2010). Bylo zjištěno, že vysoká antibakteriální aktivita je nejspíše způsobena přítomností a určitou polohou substituentu na benzylaminovém jádře, konkrétně přítomností halogenu v pozici *para*.

Naše obsáhlá skupina derivátů thiosalicylamidu byla nejvíce účinná ze všech testovaných skupin látek. Jako výchozí sloučeniny byly použity substituovaná kyselina salicylová a substituovaný benzylamin. Jejich reakcí (rozpuštědlem chlorbenzen, přítomnost chloridu fosforitého, reflux 3 hodiny) vznikly N-benzylsalicylamidy, ty dále v mikrovlnném reaktoru reagovaly a došlo k thionaci – záměně kyslíku za síru.

Nejvyšší účinnost proti všem testovaným kmenům projevila látka T 5621, která měla v poloze pět fenolového jádra chlor a v polohách 3' a 4' benzylaminového jádra

chlory dva. Tato látka měla nejnižší hodnoty MIC u kmenů CA (31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech), CT (31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod.), CK (3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod.), CG (31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech.), TB (3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod.), AF (3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod.) a TM (0,98  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech). Nejnižších hodnot MIC u kmenu AC bylo dosaženo u derivátu T 6111 (3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod. i 48 hod.).

Nejvyšší antimykotickou aktivitu projevovaly látky, které měly na fenolovém i benzylaminovém jádře za substituenty halogeny. Na benzylaminovém jádře se vyskytovaly halogeny pouze v poloze 4', u látky T 5621 i v poloze 3'. Na fenolovém jádře se halogeny vyskytovaly v poloze pět a u látky T 6111 i v poloze tři. Převažujícím halogenem byl chlor, jen deriváty T 5619 a T 5617 měly v poloze 4' benzylaminového jádra fluor.

Ostatní látky měly za substituenty alkylovou či alkoxylovou skupinu, ty prokazovaly nižší aktivitu v porovnání s halogenderiváty.

Sloučeniny T 6103 a T 5628 měly v poloze 4' benzylaminového jádra nitroskupinu, jejich účinek byl celkem nízký, nejnižších hodnot MIC dosáhly v případě T 6103 u kmenu TM (15,62 po 72 hod.), v případě T 5628 byla nejnižší hodnota MIC u kmenu AC (31,25 po 24 hod.).

Na Katedře anorganické a organické chemie byly připraveny nové sloučeniny, deriváty salicylanilidu – hydroxy-*N*-(fenylamino)-oxo-alkyl-benzamidy (Vinšová et al., 2009). Testováno bylo 11 látek ze skupiny diamidů, z toho 5 bylo zcela neúčinných na všechny testované kmeny hub. Sloučenina AIM-101 byla účinná pouze na kmen TM (MIC = 7,81  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech), látka AIM-109 byla slabě účinná také na kmen TM (MIC = 62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 i 120 hodinách) a stejnou hodnotu MIC po 24 hodinách měla i u kmenu CK. Nejnižší hodnota MIC u látky AIM-108 byla 31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hodinách u kmenu CT a CK. Pouze látka AIM-76 (*N*-((*S*)-1-(3-chlorfenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid) vykazovala silné účinky na *Candida krusei* (MIC = 1,95  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 hod. a 3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 48 hod.). Podobnou strukturu má AIM-127 (*N*-((*S*)-1-(4-chlorfenylkarbamoyl)-2-fenylethyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid), kde jsou změněné pouze polohy substituentů – chlorů, přesto tato látka nevykazovala žádné účinky na testované kmeny hub.

Studie z roku 2009 (Klimešová et al., 2009) hodnotila deriváty benzylsulfanylbenzoxazolu jako potenciální antituberkulotika. Látka 2-(3,5-

dinitrobenzylsulfanyl) benz[*d*]oxazol vykázala silnou aktivitu vůči testovaným druhům mykobakterií.

Styrylbenzoxazoly jsou využívány k neinvazivní detekci senilních plaků, které předcházejí Alzheimerově chorobě, konkrétně se jedná o sloučeninu 6-(2-fluorethoxy)-2-[2-(4-methylaminofenyl)ethenyl]benzoxazol (Okamura et al., 2004).

V naší studii bylo testováno 6 látek styryl benzoxazolů, avšak žádná z nich neprokázala vyšší účinnost proti testovaným kmenům hub. Pouze sloučenina AIM – 158 (2-((E)-2-(5-ethylfuran-2-yl)vinylyl)benzo[*d*]oxazol) měla velmi nízkou aktivitu vůči kmenu AC (MIC = 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v obou časech), což se zdá být zanedbatelné.

Esterifikací salicylanilidů vznikly nečekané formace nových sedmičlenných kruhů – tzv. benzoxazepiny (Imramovský et al., 2006). Jak již bylo zmíněno, salicylanilidy disponují silnou antifungální i antimykotickou aktivitou, v naší studii byly testovány benzoxazepin-diony, které však neprokázaly žádnou účinnost na testované kmeny hub, kromě látky AIM - 84, která působila na kmen TM (MIC = 31,25  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 72 hodinách). Stejnou strukturu měla i látka AIM – 17, jen v pozici 3' na sedmičlenném kruhu chyběla methylová skupina. Tato látka neprokázala žádnou účinnost na testované kmeny. Zda má methylová skupina na benzoxazepinovém kruhu vliv na antifungální aktivitu nemůžeme potvrdit, k dispozici jsme měli totiž jen 5 látek, z toho pouze jedna jediná měla methylovou skupinu na sedmičlenném kruhu, ostatní sloučeniny se lišily polohou substituentů.

## 7 ZÁVĚR

- Pomocí mikrodiluční bujónové metody jsme vyhodnotili *in vitro* antifungální aktivitu deseti skupin chemických sloučenin proti osmi kmenům potenciálně patogenních hub.
- Nejvýraznější antifungální aktivitu vykazovaly deriváty thiosalicylamidu, konkrétně derivát T 5621, který inhiboval velmi silně kmen TM ( $MIC_{T\ 5621} = 0,98\ \mu\text{mol.l}^{-1}$  za 72 h i 120 h).
- Z testovaného souboru hub byl nejcitlivějším a zároveň nejčastěji inhibovaným kmenem dermatofyt *Trichophyton mentagrophytes*.
- Pro antimykotický účinek se jevila výhodná substituce halogenem, nejvíce chlorem.
- Z dosažených výsledků nelze vyvozovat jednoznačné závěry, pro potvrzení účinku těchto látek *in vitro* je nutné provést další testování na druhově a kmenově širším souboru houbových organismů.

## 8 LITERATURA

Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Gill, C. J., Kong, L., Smith, J. G., Pikounis, V. B., Balkovec, J. M., Bouffard, A. F., Dropinski, J. F., Rosen, H., Kropp, H., Bartizal, K.: Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997, 41(11), 2333-8.

Adamec, J., Beckert, R., Weiß, D., Klimesova, V., Waissner, K., Möllmann, U., Kaustova, J., Buchta, V.: Hybrid molecules of estrone: new compounds with potential antibacterial, antifungal, and antiproliferative activities. *Bioorganic a Medicinal Chemistry.* 2007, 15, 2898-2906.

Bajerová, K.: *Vyhodnocení aktivity potenciálně antifungálních látek pomocí mikrodiluční bujónové metody VII.* Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2001.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie.* Praha: Marvil. 1996, 166 – 173, 344 – 360.

Bergmann, K. E., Cynamon, M. H., Welch, J. T.: Quantitative structure-activity relationships for the in vitro antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters. *J. Med. Chem.* 1996; 39, 3394–3400.

Beyer, J., Schwartz, S., Heineman, V., Siegert, W.: Strategies in prevention of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed or neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994, 38, 314–319.

Bolmström, A., Karlsson, A., Mills, K., Edsberg, K., Wiman, A.: Antifungal susceptibility testing of yeasts with Etest. ICAAC poster 260, New Orleans, October 1993.

Borgers, M., Van den Bossche, H., De Brabander, M.: The mechanism of action of the new antimycotic ketoconazole. *Am J Med.* 1983; 74(1B): 2-8.



Bouffard, F. A., Zambias, R. A., Dropinski, J. F., Balkovec, J. M., Hammond, M. L., Abruzzo, G. K., Bartizal, K. F., Marrinan, J. A., Kurtz, M. B., McFadden, D. C.: Synthesis and antifungal activity of novel cationic pneumocandin B(o) derivatives. *J Med Chem.* 1994, 37(2), 222-5.

Buchta, V.: *Studium interakcí potenciálně patologických hub s antifungálními látkami a faktorů ovlivňujících stanovení parametrů citlivosti in vitro.* Disertační práce, Hradec Králové, 1993.

Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty.* Praha: Karolinum. 1998, 143 – 157.

Buchta, V., Slezák, R., Špaček, J., Košťálová, M., Vejsová, M., Doležal, M.: Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Medicína pro praxi.* 2009, 6(3), 155 – 164.

Burgess, D. S., Hastings, R. W., Summers, K. K., Hardin, T. C., Rinaldi, M. G.: Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn, Microbiol. Infect.* 2000, 36, 13–18.

Colombo, A. L., Barchiesi, F., McGough, D. A., Rinaldi, M. G.: Comparison of Etest and national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology.* 1995, 33, 535-540.

Cormican, M. G., Pfaller, M. A.: Standardization of antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1996, 38, 561-578.

Deresinski, S. C., Lilly, R. B., Levine, H. B., Galgiani, J. N., Stevens, D. A.: Treatment of fungal meningitis with miconazole. *Arch. Intern. Med.* 1977, 137, 1180-1185.

Doležal, M., Buchta, V.: Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství.* 1/2006, 10 – 14.

Doležal, M., Cmedlova, P., Palek, L., Vinsova, J., Kunes, J., Buchta, V., Jampilek, J., Kralova, K.: Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2008, 43, 1105-1113.

Dolezal, M., Hartl, J., Miletin, M., Machacek, M., Kralova K.: Synthesis and photosynthesisinhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* 1999, 53, 126-130.

Dolezal, M., Miletin, M., Kunes, J., Kralova, K.: Synthesis and biological evaluation of some amides of pyrazine-2-carboxylic acids. *Molecules.* 2002, 7, 363-373.

Dolezal., M., Palek, L., Vinsova, J., Buchta, V., Jampilek, J., Kralova, K.: Substituted Pyrazinecarboxamides: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* 2006, 11, 242-256

Dolezal, M.; Vicik, R.; Miletin, M.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* 2000, 54, 245-248.

Dolezel, J., Hirsova, P., Opletalova, V., Dohnal, J., Vejsova, M., Kunes, J., Jampilek, J.: Rhodanineacetic acid derivatives as potential drugs: preparation, hydrophobic properties and antifungal activity of (5-arylalkylidene-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl) acetic acids. *Molecules.* 2009, 14, 4197-4212.

Domínguez, J. M., Kelly, V. A., Kinsman, O. S., Marriott, M. S., Gómez de las Heras, H. F., Martín, J. J.: Sordarins: a new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 2274–2278.

Espinel-Ingroff, A., Kish, C. W., Kerkering, T. M., Fromtling, R. A., Bartizal, K., Galgiani, J. N., Villareal, K., Pfaller, M. A., Gerarden, T., Rinaldi, M. G., Fothergill, A.: Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 3138–3145.

Ferrari, M. J., Turnidge, J. D.: Section V. Antibacterial agents and susceptibility test methods, 1037-1196. In: Manual of clinical microbiology Vol. 1. Editor Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Tenover, R. C., Tenover, R. H., ASM Press Washington, D. C., 2003, 1212.

Fostel, J. M., Lartey, P. A.: Emerging novel antifungal agents. *Drug Develop. Ther.* 5/2000, 25 – 32.

Fragner, P.: *Malá lékařská mykologie.* Praha: Avicenum. 1984, 18 – 152.

Francis, P., Walsh, T. J.: Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients - new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis.* 1992, 15, 1003–1018.

Graybill, J. R., Craven, P. C., Taylor, R. L., Williams, D. M., Magee, W. E.: Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B, *J. Infect. Dis.* 1982, 145, 748-52.

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Herbrecht, R., Denning, D. W., Patterson, T. F., Bennett, J. E., Greene, R. E., Oestmann, J. W., Kern, W. V., Marr, K. A., Ribaud, P., Lortholary, O., Sylvester, R., Rubin, R. H., Wingard, J. R., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., Thiel, E., Chandrasekar, P. H., Hodges, M. R., Schlamm, H. T., Troke, P. H.: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002; 347(6): 408-15.

Hospenthal, D. R., Bennett, J. E.: Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27, 260–264.

Chumchalová, J. a kol.: *Miniatlas mikroorganismů* [online]. Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze, 2004 [cit. 2010-02-23].  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/uvod-h.htm>  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-trop.htm>

Ikai K, Takesako, K., Shiomi, K., Moriguchi, M., Umeda, Y., Yamamoto, J., Kato, I., Naganawa, H.: Structure of aureobasidin A. *J Antibiot* (Tokyo). 1991, 44, 925–933.

Imramovsky, A., Vinsova, J., Ferriz, J. M., Kunes, J., Pour, M., Dolezal, M.: Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Letters.* 2006, 47, 5007-5011.

Jampilek, J., Opletalova, V., Dolezel, J., Dohnal, J.: *Preparation and hydrophobic properties of 5-arylalkylidenerhodanines.* [online] 2007 [cit. 2010-03-18]  
[http://www.usc.es/congresos/ecsoc/11/hall\\_aGOS/a012/](http://www.usc.es/congresos/ecsoc/11/hall_aGOS/a012/)

Jampilek, J., Palek, L., Dolezal, M.: *Synthesis and hydrophobic properties of some substituted 3-arylaminopyrazine-2,5-dicarbonitriles.* [online] 2006 [cit. 2010-03-18]  
<http://www.usc.es/congresos/ecsoc/10/GOS/a019/>

Jílek, P., Buchta, V., Kubanová, P., Förstl, M.: *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum. 2002, 30 – 34, 82 – 84.

Klepser, M. E., Wolfe, E. J., Jones, R. N., Nightingale, C. H., Pfaller, M. A.: Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41, 1392–1395.

Klimesova, V., Koci, J., Waisser, K., Kaustova, J., Möllmann, U.: Preparation and in vitro evaluation of benzylsulfanyl benzoxazole derivatives as potential antituberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2009, 44, 2286-2293.

Krausová, L., Grim, J., Pávek, P.: Azolová antimykotika: mechanismy lékových interakcí. *Klinická farmakologie a farmacie.* 2009, 23(2), 86 – 89.

Lass-Flörl, C., Nagl, M., Speth, C., Ulmer, H., Dierich, M. P., Würzner, R.: In vitro activities of voriconazole and itraconazole against *Aspergillus hyphae* using viability staining. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 2001, 45, 124–128.

Lozano-Chiu, M., Paetznick, V. L., Ghannoum, M. A., Rex, J. H.: Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performance of three different media assessed by using Etest and national committee for clinical laboratory standards M27-A methodologies. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2817–2822.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. 2004, 2. vydání, 527 – 534.

Marco, F., Pfaller, M. A., Messer, S. A., Jones, R. N.: Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, 32, 33–37.

Martínková, J., Chládek, J., Mičuda, S., Chládková, J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2007, 1. vydání, s. 321 – 324.

Maschmeyer, G.: New antifungal agents – treatment standards are beginning to grow old. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2002, 49, 239 – 241.

Mašata, J., Jedličková, A., Kolečka, T.: Infekce v gynekologii. *Forum medicinae*. 2001, 2, 23 – 38.

Mieslerová, B., Lebeda, A., Sedlářová, M., Petrželová, I.: *Systém houbových organismů – část 4* [online]. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, 2006 [cit. 2010-02-23]. [http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/4\\_t.pdf](http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/4_t.pdf)

Nosanchuk, J. D.: Current Status and Future of Antifungal Therapy for Systemic Mycoses. *Recent Patents on Anti – Infective Drug Discovery*. 2006, 1, 75 – 84.

Okamura, N., Suemoto, T., Shimadzu, H., Suzuki, M., Shiomitsu, T., Akatsu, H., Yamamoto, T., Staufenbiel, M., Yanai, K., Arai, H., Sasaki, H., Kudo, Y., Sawada, T.: Styrylbenzoxazole derivatives for In vivo imaging of amyloid plaques in the brain. *The Journal of Neuroscience*. 2004, 24(10), 2535–2541.

Orchard, M. G., Neuss, J. C., Galley, C. M. S., Carr, A., Porter, D. W., Smith, P., Scopes, D. I. C., Haydon, D., Vousden, K., Stubberfield, C. R., Young, K., Page, M.: Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT 1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3975–3978.

Otčenášek, M.: *Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních*. Praha: Avicenum, 1990, 1. vydání, 113 – 128.

Palek, L., Dolezal, M., Dvorak, J., Buchta, V., Cermak, P.: *Substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles as new antiinfectives*. [online] 2005 [cit. 2010-03-18] <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/9/BOCNP/c009/index.htm>.

Petrlíková, E., Waisser, K., Jílek, P., Dufková, I.: High Antibacterial Compounds: N-benzylsalicylthioamides. *Folia microbiologica*. 2010, in press.

Pfaller, M., Wenzel, R.: Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 1992, 11, 287-91.

Ráčil, Z., Kocmanová, I., Weinbergerová, B., Bohatá, Š., Winterová, J., Mayer, J.: Terapie invazivních mykóz. *Interní medicína pro praxi*. 2008, 10(4), 167 – 171.

Rehany, U., Balut, G., Lefler, E., Rumelt, S.: The prevalence and risk factors for donor corneal button contamination and its association with ocular infection after transplantation. *Cornea*. 2004, 23 (7), 649–654.

Rex, J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., Chaturvedi, V., Spinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Warnock, D. W.: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical microbiology reviews*. 2001, 14 (4), 643-658.

Rozsypal, H.: Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2008, 22(1), 40 – 44.

Říhová Ambrožová, J.: *Houby, Fungi*. [Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník](http://encyklopediehydrobiologie.vykladovy.slovník.cz) [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-02-23]. [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=H007](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=H007)

Sedlářová, M., Vašutová, M.: *Atlas houbových organismů* [online]. Oddělení fytopatologie [Katedry botaniky PřF UP v Olomouci](http://katedrybotaniky.prf.upol.cz), 2007 [cit. 2010-02-23]. <http://botany.upol.cz/atlas/system/uvod.php>

Skalický, V. a kol.: *Záznamy z přednášek předmětu Obecná mykologie* [online]. UK Praha. 1991 [cit. 2010-02-23]. <http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/mykolog.htm>

Sortino, M., Delgado, P., Juarez, S., Quiroga, J., Abonía, R., Insuasty, B., Nogueras, M., Roredo, L., Garibotto, F. M., Enriz, R. D., Zacchino, S. A.: Synthesis and antifungal activity of (Z)-5-arylidenerhodanines. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 484–494.

Špaček, J., Buchta, V., Veselský, Z., Kalousek, I.: Interakce kvasinek s hostitelem ve vztahu k urogenitálnímu traktu a vulvovaginální kandidóze, urologické aspekty mykotických onemocnění. *Česká gynekologie*. 2003, 68 (6), 432 – 439.

Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y., Kato, I., Uchida, K., Hiratani, T., Yamaguchi, H.: Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *J Antibiot* (Tokyo). 1993, 46, 1414–1420.

Vinsova, J., Imramovsky, A., Kratky, M., Ferriz, J. M., Palat, K., Lycka, A., Ruzicka, A.: An unprecedented rearrangement of salicylanilide derivatives: imidazolinone intermediate formation. *Tetrahedron letters*. 2010, 51, 23-26.

Vokurka, M., Hugo, J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. Praha: Maxdorf. 2008, 8, 1144 stran.

Votava, M., Obdržálek, V., Ondrovčík, P., Růžička, F., Zahradníček, O., Woznicová, V.: *Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Vydavatelství MU, Brno – Kraví hora, 2000, 263 – 294.

Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 2003, s. 210 - 233 .

Waisser, K., Doležal, R., Petříková, E., Kuneš, J., Kubicová, L., Macháček, M., Kaustová, J., Dahse, H. M.: N-Benzylsalicylthioamides: highly active potential antituberculotics. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. 2009, 342, 113 – 119.

Wanger, A., Mills, K., Nelson, P. W., Rex, J. H.: Comparison of Etest and national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995, 39, 2520–2522.