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

Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykotických látek pomocí mikrodiluční bujónové metody III

Diplomová práce

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

Hradec Králové, 2015 Alena Zavřelová

Prohlášení

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

V Hradci Králové, datum: podpis:

Poděkování

Mé velké poděkování patří vedoucí diplomové práce Mgr. Kláře Konečné, Ph.D. za pomoc a cenné rady, kterými přispěla k vypracování mé diplomové práce. Dále mé poděkování patří paní laborantce Idě Dufkové za ochotu, vstřícnost a pomoc při výkonu experimentální části. Zároveň bych chtěla poděkovat kolektivu z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za poskytnutí látek sloužících k testování a pomoc s tvorbou chemické nomenklatury. V neposlední řadě mé velké díky patří rodině a blízkým za psychickou podporu a trpělivost.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd
Název diplomové práce: Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykotických léčiv mikrodiluční bujónovou metodou III
Autor diplomové práce: Alena Zavřelová
Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Cíl: Cílem této práce, díky narůstajícímu počtu mykotických onemocnění a narůstajícímu výskytu rezistence, bylo zjistit aktivitu u potenciálně antimykoticky působících látek. Testovaly se nově syntetizované látky, strukturně vycházející z molekuly pyrazinamidu, což je významné antituberkulotikum.

Metody: Testování látek probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody na osmi kmenech patogenních hub, tvořené pěti kmeny kvasinek: *Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida glabrata, Trichosporon asahii* a třemi kmeny vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus, Absidia corymbifera, Trichophyton mentagrophytes.*

Výsledky: V rozsahu testovaných koncentrací, z celkového počtu třiceti testovaných látek, vykazovala nejvýraznější antifungální aktivitu látka 5-methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril. Všechny kmeny, kromě *Trichophyton mentagrophytes*, vykazovaly poměrně slibnou citlivost vůči testovaným látkám. Obecně, nejcitlivějším kmenem byl kmen *Candida krusei*, kde bylo dosaženo hodnot MIC 3,9 μmol/l po 24 hodinové a 7,81 μmol/l po 48 hodinové inkubaci.

Závěry: Deriváty pyrazin-2-karboxamidu a deriváty pyrazin-2,3-dikabonitrilu, především 5-methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril, se zdají být velmi nadějnými skupinami látek. V rámci našeho skríninkového testování byla u těchto látek prokázána antimykotická aktivita a minimálně z tohoto důvodu si tyto látky zaslouží být předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova: mykotická onemocnění, antimykotické látky, rezistence, minimální inhibiční koncentrace, mikrodiluční bujónová metoda

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences
Title of thesis: Evalution of activity of potentional antimycotic substances through the use of microdilution broth method III
Autor of thesis: Alena Zavřelová
Supervisor: Mgr. Klára Konečná, Ph.D.

Background: The aim of this thesis, due to the growing incidence of fungal diseases and the growing incidence of resistance, was to determine the activity of potentially antimycotic active substances. We tested newly synthesized compoused, structurally based on the substance of pyrazinamide which is significant antituberculotic.

Methods: Testing of substances was carried out using a broth microdilution method on eight strains of pathogenic fungi consisting of five yeast strains: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii* and three strains of filamentous fungi: *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Results: From the range of tested concentrations and from the total number of the thirty tested substances, the most noticeable antifungal aktivity was revealed in the substance of 5-methyl-6-(2-phenylhydrazinyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile. All strains, except *Trichophyton mentagrophytes* strain, showed a relatively promising sensitivity to the tested substances. Generally, the most sensitive strain was *Candida krusei* strain, in that the MIC (minimum inhibitory concentration) values of 3,9 μmol/l after 24 hours and 7,81 μmol/l after 48 hours of incubation was achieved.

Conclusion: Derivates of pyrazine-2-carboxamide and derivates of pyrazine-2,3-dicarbonitrile, especially 5-methyl-6-(2-phenylhydrazinil)pyrazine-2,3-dicarbonitrile, seems to be very promising group of substances. Within our screening testing the antifungal activity of these compounds was releaved and at least for this reason these substances deserve to be the subject of further research.

Key words: fungal infections, antifungal agents, resistance, minimal inhibitory concentration, microdilution broth method

OBSAH

ABSTRAKT **4**

ABSTRACT **5**

OBSAH **7**

1. ÚVOD **9**

1. 1. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE 11

2. TEORETICKÁ ČÁST **12**

2.1. HOUBY – OBECNÁ CHARAKTERISTIKA 12

2.2. INFEKCE VYVOLANÉ HOUBAMI 14

2.2.1. Mykózy 14

2.2.1.1. Povrchové (kožní) mykózy 15

2.2.1.2. Subkutánní (podkožní) mykózy 16

2.2.1.3. Systémové mykózy 16

2.2.2. Mykoalergózy 17

2.2.3 Mycetismy 18

2.2.4. Mykotoxikózy 18

2.3. LÉČBA INFEKCÍ VYVOLANÝCH HOUBAMI 20

2.3.1. Azoly 22

2.3.1.1. Imidazolová systémová antimykotika 22

2.3.1.2. Triazolová systémová antimykotika 23

2.3.2. Polyeny 24

2.3.3. Echinokandiny 25

2.3.4. Antimetabolity 26

2.3.5. Allylaminy 26

2.4. MECHANISMY REZISTENCE MYKOTICKÝCH AGENS VŮČI ANTIMYKOTICKÝM LÁTKÁM 28

2.4.1. Mechanismus rezistence k azolům 30

2.4.2. Mechanismus rezistence k polyenům 33

2.4.3. Mechanismus rezistence k echinokandinům 33

2.4.4. Mechanismus rezistence k 5- flucytosinu 34

2.4.5. Mechanismus rezistence k allylaminům 34
2.5. METODY PRO IN VITRO TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI MYKOTICKÝCH AGENS VŮČI ANTIFUNGÁLNÍM LÁTKÁM 35
2.5.1. Mikrodiluční bujónová metoda 41
2.5.2. Disková difúzní metoda 43
2.5.3. Gradientová difúzní metoda – E-test 45
2.6. PYRAZINAMID A JEHO DERIVÁTY 47
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 49
3.1. MATERIÁL 49
3.1.1. Pomůcky 49
3.1.2. Přístroje 49
3.1.3. Chemikálie 49
3.1.4. Modelové kmeny kvasinek a vláknitých hub 50
3.1.5. Testované látky 50
3.2. PRACOVNÍ POSTUP 59
3.2.1. Příprava růstového média 59
3.2.2. Příprava suspenzí modelových kmenů 59
3.2.3. Příprava ředící řady testované látky 59
3.2.4. Naplnění mikrotitračních destiček 62
3.2.5. Vyhodnocení 64
4. VÝSLEDKY 65
5. DISKUZE 78
6. ZÁVĚR 80
7. POUŽITÁ LITERATURA 82
SEZNAM ZKRATEK 90

1. Úvod

Některé houby u člověka vyvolávají vážné až smrtelné onemocnění. Výskyt mykotických onemocnění a počet pacientů neustále narůstá. Obecně, k této skutečnosti může přispívat fakt, že čím dál více pacientů užívá mnohdy zcela neúčelně antibakteriální širokospektrá antibiotika a kortikoidy. Přibývá imunosuprimovaných pacientů užívajících cytostatika a čím dál více žen užívá hormonální antikoncepci. Další faktor, který může mít vliv na zvýšeném výskytu mykotických infekcí, souvisí s rostoucím počtem pacientů podstupujících transplantační zákroky, či pacientů s AIDS (acquired immune deficiency syndrome, syndrom získaného imunodeficitu) [3].

Na zvýšený výskyt mykotických infekcí úzce navazuje další problematika související se zvýšenou spotřebou antimykoticky působících léků a s možným rozvojem rezistence antimykotik [41, 43].

Z výše uvedeného vyplývá, že je více než žádoucí soustředit pozornost na vývoj nových léčebných postupů, které také zahrnují zavádění nových antimykotických látek do klinické praxe [50]. V současné době je celkově rezistence na antibakteriální a antimykotické látky velkým problémem, který se s největší pravděpodobností bude navyšovat i v době budoucí. Výskyt rezistence vede k intenzivnímu výzkumu a vývoji nových, účinnějších antimikrobních látek, které by bylo možno použít zejména u obtížně léčitelných systémových infekcí, jejichž počet obecně narůstá.

Součástí základního výzkumu je testování citlivosti modelových mikrobiálních kmenů ke kandidátním antimikrobním látkám, v laboratorních podmínkách *in vitro*, a to pomocí referenčních a nereferenčních metod [26, 40].

Cílem této diplomové práce bylo určit antimykoticky působící látky. Sloučeniny, které byly testovány, byly syntetizovány a poskytnuty Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze. Tyto nově nasyntentizované sloučeniny vycházejí ze struktury pyrazinamidu a jejich antimykotická aktivita byla testována pomocí mikrodiluční bujónové metody. Pomocí mikrodiluční bujónové metody je možno určit minimální inhibiční koncentraci látek. Tato metoda je zároveň považována při testování antimykotické aktivity nových látek za standard.

K testování účinnosti nově syntetizovaných látek bylo použito vcelku osm různých mykotických kmenů kvasinek a vláknitých hub. Jmenovitě šlo o kvasinky: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii* a vláknité houby: *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, *Trichophyton mentagrophytes*.

1. 1. Zadání diplomové práce a cíl diplomové práce

- ✓ Rešerše odborné literatury na dané téma – práce s odborným textem, s relevantními, recentními informačními zdroji.
- ✓ Testování antimykotické aktivity *in vitro* potenciálních antimykotik na modelových kmenech kvasinek a vláknitých hub pomocí mikrodiluční metody (metoda zavedena dle mezinárodního standardu CLSI).
- ✓ Vyhodnocení aktivity potenciálně antimykoticky působících látek mikrodiluční bujónovou metodou.

2. Teoretická část

2.1. Houby – obecná charakteristika

Houby jsou velká a různorodá skupina eukaryotických heterotrofních organismů zahrnujících jak saprofyty, tak parazity či komenzály. Houby tvoří přibližně 25 % biomasy země. Houby s bakteriemi jsou zodpovědné za rozklad organické hmoty [45].

V rámci celého taxonu, říše hub, lze nalézt zástupce lišící se výrazně jak ve velikosti, tak i v buněčné formě. Od bakterií se houby liší morfologicky a chemickým složením. Základní rozdíl je v odlišnosti základní stavební jednotky, tedy buňky. Houby jsou eukaryotní, bakterie prokaryotní organismy [17].

Od rostlin se houby liší zejména tím, že neobsahují chlorofyl. Na rozdíl od rostlin obsahují ve svých buňkách složité cukry, hlavně chitin, dále mannany, glukany, dextrany. To jsou hlavní komponenty, které tvoří buněčnou stěnu a tímto složením buněčné stěny hub se zásadně liší od buněk živočišných a rostlinných. Další důležitou vlastností hub je přítomnost steroidních alkoholů v cytoplazmatické membráně. Sterol, typický pro cytoplazmatickou membránu hub a nezbytný pro zdárný život hub, je ergosterol [17, 51].

Patogenní houby schopné vyvolávat infekční onemocnění jak u zvířat, tak i u člověka dělíme v zásadě do dvou skupin, na plísně (vláknité mikromycety) a kvasinky. Strukturním základem těla hub jsou vlákna neboli hyfy. Tato vlákna, tedy hyfy, tvoří spletitou hmotu zvanou mycelium. Mycelium může být dvojího typu, a to septované (tvořené výrazně oddělenými buňkami) a neseptované. Plísně se rozmnožují sexuální reprodukcí pomocí spór nebo nepohlavním dělením. Pro každý druh vláknité mikromycety je specifický určitý způsob tvorby spór a typ spór [17]. Zajímavou vlastností hub je schopnost střídat pohlavní a nepohlavní způsoby rozmnožování [51]. Kvasinky jsou zejména jednobuněčné organismy, množící se většinou nepohlavně. Nepohlavní množení je označováno jako pučení. Jde o proces, při kterém se na buňce vytvoří stále se zvětšující výčnělek, který se nakonec oddělí. Některé

kvasinky jsou schopné vytvářet nepravé mycelium, tzv. pseudomycelium, jehož základem jsou jednotlivé pučící buňky řetízkovitě uspořádané [17].

2.2. Infekce vyvolané houbami

Houby obecně mohou u člověka vyvolávat širokou škálu onemocnění. Například, po požití plodnic jedovatých hub může dojít k otravě organismu (mycetismu). Po požití potravin kontaminovaných toxickými produkty sekundárního metabolismu vláknitých mikromycet může rovněž dojít k životu ohrožujícímu onemocnění (mykotoxikóze) [17].

Především vláknité houby mohou stát za rozvojem alergického onemocnění dýchacích cest (mykoalergózy), které se rozvíjí především po opakované inhalační expozici spórami těchto hub [17].

Dalším typem infekčního onemocnění jsou mykózy, na kterých se podílí jak fakultativně patogenní houby (*Candida*, *Aspergillus*), tak i primárně patogenní houby (dimorfní houba *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, dermatofyt *Trichophyton mentagrophytes*) [17].

Infekce vyvolané houbami tvoří velmi pestrou a různorodou skupinu. Infekce obvykle dělíme do 4 skupin [3]:

1. Mykózy
2. Mykoalergózy
3. Mycetismy
4. Mykotoxikózy

2.2.1. Mykózy

Mykózy lze řadit, co důležitosti se týče, z výše zmíněných onemocnění na první místo. Ze všech mykóz jsou nejčastější a nejrozšířenější onemocnění kůže, nehtů, vlasů a sliznic [17].

Mezi nejčastější původce patří houby vřeckaté (vřeckovýtrusné, řád: *Ascomycetes*), výjimečně stopkovýtrusné (řád: *Basidiomycetes*). Spolehlivě doloženou skutečností je, že počet případů mykóz neustále roste. Příčiny rostoucího počtu infekcí jsou různé a mohou být jak přímé, tak nepřímé [3].

Přímé příčiny jsou ovlivněny několika následujícími faktory. Lze mezi ně řadit pasivní přenos původců, týkající se zejména mykóz s endemickým výskytem na velkých vzdálenostech. Určitou roli hraje podobnost ekologických

podmínek nové lokality s původní lokalitou. Ovlivnění iatrogenními faktory je též velmi časté, zejména u etyliků, žen užívajících hormonální antikoncepci, či při užívání antibakteriálních širokospektrých antibiotik, cytostatik, či kortikoidů. Iatrogenní faktory mohou souviset s transplantačními zákroky či mykotickými nákazami u diabetiků a pacientů s AIDS. Svou roli zde hraje působení ekologických faktorů, zejména vnějšího prostředí. Možná příčina může pramenit ze znečištěného ovzduší, narušení přírodní rovnováhy, technického pokroku, kontaminace potravin patogenními houbami, apod. [3].

2.2.1.1. Povrchové (kožní) mykózy

Povrchové mykózy patří mezi nejčastější formy mykóz. Tyto mykózy jsou vyvolané především vláknitými mikromycetami, dermatofyty, které napadají stratum corneum vlasů, nehtů a kůže. Tyto infekce se nazývají dermatofytózy neboli lat. *tinea* s přídomkem určující postiženou strukturu nebo část těla, např.: *tinea capitis* – infekce vlasů vyvolaná dermatofyty, *tinea pedis* – infekce vyskytující se nejčastěji na prstech, meziprstí nohou nebo na chodidlech, *tinea unguinum* - infekce nehtů [3, 17].

Mezi klinicky důležité rody skupiny hub, dermatofytů, patří *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* [3].

Dermatofyty mohou infikovat jak člověka, tak zvíře. K nákaze dochází buď přímým kontaktem nebo nepřímým kontaktem s nakaženou osobou, zvířetem nebo stykem s kontaminovanou plochou. Dochází tak k pronikání dermatofytů do keratinu. K nepřímému přenosu může dojít na podlaze sprch, veřejných koupališť, použitím neosobních ručníků, hřebenů. Dermatofyty přežívají dlouho a k nákaze, kromě infekčního agens, je zapotřebí „porušená“ epidermis, drobné poranění nebo slabé olupovaní vrchní vrstvy kůže [17].

Mezi další časté původce povrchových mykóz jsou řazeny kvasinky, které napadají sliznice úst, pochvy, kůži či nehty. Nejrozšířenější kvasinkovou mykózou je povrchová kandidóza způsobená kvasinkami rodu *Candida*, kde za 80-90% všech kvasinkových kandidových infekcí stojí druh *Candida albicans* [3,17].

Dalším častým původcem kožních kvasinkových infekcí je kvasinka *Malassezia furfur.* Infekce způsobená touto kvasinkou se nazývá *pytiriasis versicolor*. Na kůži postižené infekcí touto kvasinkou zůstávají depigmentové skvrny. Jiná kvasinka, *Trichosporon beigelii*, způsobuje kožní infekci nazývanou bílá piedra. Takzvanou černou piedru, která se projevuje vznikem tmavých nodul v kštici nebo ochlupených místech, způsobuje vláknitá houba *Piedraia hortae* [3, 17].

2.2.1.2. Subkutánní (podkožní) mykózy

Subkutánní mykózy vznikající zanesením patogenních hub, které se běžně vyskytují v půdě či na rostlinách, přímo do podkoží. Proces onemocnění, vznikající zanesením mikrobů z půdy nebo rostlin do podkoží, je velmi pomalý. Nejčastěji k tomuto přenosu dochází při poranění [3, 17].

Vyskytují se hlavně v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie, Střední Ameriky [3].

Významnou podkožní mykózou je sporotrichóza, chronické hnisavé onemocnění kůže a podkoží, vyvolané dimorfní houbou *Sporothrix schenckii*. Dalšími příklady podkožních mykóz jsou chromoblastomykózy (chromomykózy). Jedná se o chronické infekce kůže s charakteristickými bradavičnatými lézemi pokrytými strupy. Původcem chromomykózy jsou například *Fonsecaea pedrosoi* či *Phialophora verrucosa* [17].

Dalším příkladem subkutánní mykózy je rhinosporidióza, chronická granulomatózní infekce sliznic nosu nebo spojivky spojená s tvorbou polypů, vyvolaná *Rhinosporidium seeberi* [17].

2.2.1.3. Systémové mykózy

Na systémových mykotických infekcích se může podílet široká škála patogenních hub.

Příkladem mohou být dimorfní houby, jako jsou *Blastomyces dermatitidis* (vyvolává onemocnění zvané blastomykóza), *Coccidioides immitis* (vyvolává onemocnění zvané kokcidioidomykóza), či *Histoplasma capsulatum* (vyvolává

onemocnění zvané histoplazmóza). K přenosu infekce dochází vdechnutím spór, které se vyskytují v půdě a na rostlinách. Blastomykóza je chronické onemocnění plic, ke kterému dochází vdechnutím spór. Šíří se do tkání, hlavně na kůži a do kostí. Kokcidiomykóza může mít často asymptomatický ráz, která může ale rovněž vyústit v progresivní sekundární smrtelnou infekci. Histoplazmóza je onemocnění, většinou bez příznaků nebo relativně mírné plicní onemocnění, které samo odezní. Vdechované spóry jsou nejčastěji obsažené v ptačím a netopýřím trusu [17].

Dalšími velmi častými původci mykóz jsou zástupci rodů *Candida*, *Aspergillus* či *Cryptococcus*. Infekce vyvolané těmito původci se objevují především u osob se sníženou imunitou, ke které může docházet jednak v důsledku nemoci (vrozené imunodeficity, získané imunodeficity, například infekce vyvolané virem HIV, human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti, hematologické poruchy) či imunosupresivní léčby [3].

Kandidóza, jejíž původcem jsou kvasinky rodu *Candida*, patří mezi nejčastější systémové mykózy. Závažnost těchto infekcí v poslední době vzrůstá. Onemocnění se objevuje u osob se sníženou imunitou nebo osob oslabených jiným onemocněním. V poslední době se ale objevuje i u zdravých lidí, kteří jsou infikovány vysoce virulentními kmeny *Candida albicans* [3].

Aspergilóza je infekční onemocnění postihující hlavně dýchací cesty. Rod *Aspergillus* ohrožuje člověka nejen infekcí, ale i intoxikací, při které některé kmeny aspergilů produkují kancerogenní a hepatotoxické aflatoxiny [3].

Kryptokokóza je onemocnění, které narůstá hlavně u pacientů s AIDS. U těchto pacientů je hlavním původcem mykotických komplikací právě *Cryptococcus neoformans*. Postiženy bývají hlavně plíce, ale rozšířit se může do dalších orgánů [3].

2.2.2. Mykoalergózy

Mykoalergózy představují stavy přecitlivělosti na částice mykotického charakteru, zejména tedy spóry, ale i na metabolické produkty hub. Tato alergie se podobá alergiím, které byly vyvolány jinými alergeny. Projevují se především astmatickými záchvaty doprovázenými nejčastěji bronchokonstrikcí. Od

běžných alergických reakcí mohou spóry hub způsobovat ale i jiná onemocnění, jako například alergickou bronchopulmonální mykózu, alergický zánět vedlejších nosních dutin, hypersenzitivní pneumonitidu, či atopickou dermatitidu. Mykoalergózu vyvolávají různé typy spór, jako jsou například konidie či artrospóry [3, 44].

2.2.3 Mycetismy

Mycetismus je označení pro otravu houbami, ke které dochází po požití plodnic, zejména vyšších makroskopických hub produkujících toxiny. Nejčastěji se jedná o neurotoxiny a cytotoxiny. Do skupiny neurotoxinů řadíme například muskarin, do skupiny cytotoxinů řadíme například phalloidin, či amanitin. Významnými zástupci způsobující otravu houbami, nacházející se v našich zeměpisných podmínkách, jsou Muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*), Muchomůrka červená (*Amanita muscaria*), Závojenka olovová (*Entoloma lividum*), či Hřib satan (*Boletus satanas*) [4]. Těžké a středně těžké otravy houbami se mohou nejčastěji projevovat mimo jiné zvracením, průjmem, zvýšeným slněním, miózou, tachykardií, či halucinací [15].

2.2.4. Mykotoxikózy

Vlastní mykotoxikózy jsou vyvolány, na rozdíl od výše zmíněných mycetismů, hlavně mikromycetami. Představují otravy vzniklé toxickými metabolity hub, které jsou uvolňovány do prostředí [3]. Nejčastěji se jedná o aflatoxiny, ochratoxiny, či námelové alkaloidy. Tyto mykotoxiny jsou charakterizovány různým spektrem účinku. Aflatoxiny se vyznačují mutagenním, kancerogenním a imunosupresivním účinkem. Ochratoxiny mohou mít teratogenní, karcinogenní i nefrotoxické účinky. Námelové alkaloidy díky vazokonstrikci cév mohou vést k nekróze či gangréně tkání [4, 55].

Otrava může být akutní, až smrtelná nebo chronická, způsobená opakujícími se otravami nižšími dávkami mykotoxinů [3]. K otravě dochází nejčastěji pozřením potravy kontaminovanou plísněmi, které produkují příslušné

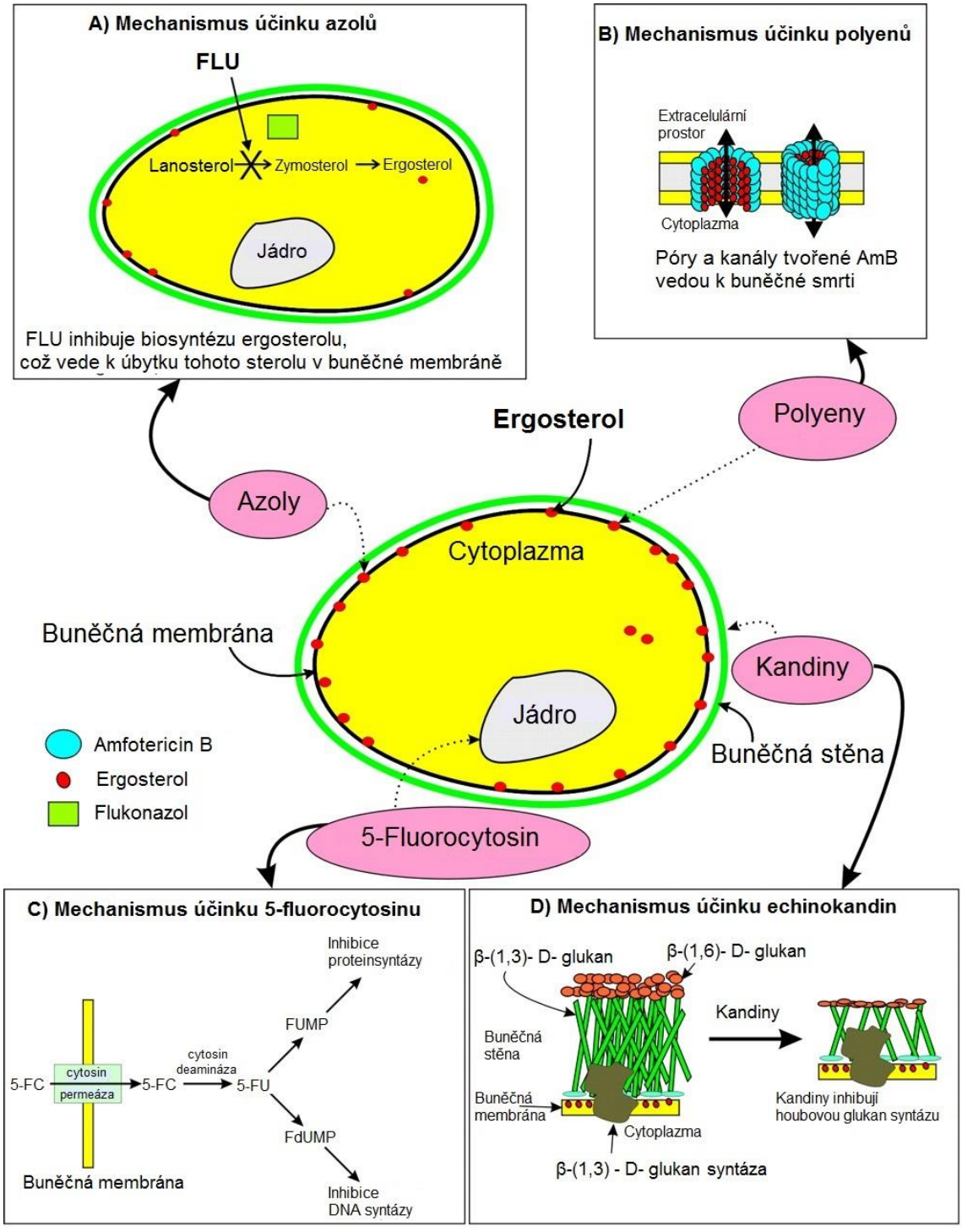
mykotoxiny [45]. Významnými zástupci produkující mykotoxiny jsou vláknité houby rodu *Aspergillus* či *Penicillium* [4].

2.3. Léčba infekcí vyvolaných houbami

Antimykotika jsou léčiva, která působí na plísně a kvasinky. Působí specificky, v určitém místě metabolismu, anebo nespecificky. Podle chemické stavby je lze rozdělit do čtyř skupin na imidazoly, triazoly, polyenová antimykotika a ostatní antimykotika. Pak se mohou dělit ještě dle způsobu podávání na lokální a systémová [52].

Mechanismus účinku většiny antimykotik spočívá v narušení integrity buněčné stěny, kdy inhibují funkci sterolů nebo častěji zasahují do samotné syntézy sterolů (viz. Obr. 1). I přes neustálý vývoj nových antimykotik je zde ale dlouhotrvající problém, jímž je rezistence na antimykotické látky. Rezistence neustále narůstá a to zejména u nejpoužívanějších, azolových antimykotik. I přes zavádění nových antimykotických látek narůstající rezistence komplikuje efektivní léčbu [46].

Obr. 1: Schématické znázornění mechanismů účinku vybraných antimykotik, převzato z: MUKHERJEE, P. K. *et al*., 2005, Combination treatment of invasive fungal infections [35] a upraveno



Legenda: 5-FC: 5-flucytosin; 5-FU: 5-fluorouracil; FUMP: fluorouridin monofosfát; FdUMP: fluorodeoxyuridin monofosfát; DNA: deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

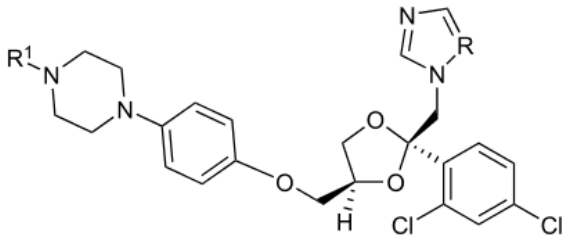
2.3.1. Azoly

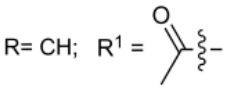
Azoly se dělí dle chemické struktury na imidazolová a triazolová antimykotika. Imidazolová antimykotika mají ve struktuře centrálního pětičlenného heterocyklu přítomny dva dusíky, triazolová antimykotika mají ve struktuře centrálního pětičlenného heterocyklu zastoupeny tři dusíky. Atomy dusíku přítomné zejména v polohách 3 a 4 se účastní vazby na atom železa, který je součástí enzymu. Aby tyto sloučeniny mohly snadno pronikat do membrány, musí být bohatě substituovány lipofilními skupinami [20]. Mechanismus účinku je u obou skupin velmi podobný. Je založen na inhibici syntézy ergosterolu (hlavní složky buněčné membrány hub) z lanosterolu, konkrétně na inhibici enzymu lanosteroldemetylázy. V důsledku této inhibice je porušena tvorba buněčné membrány a následně zastaven růst buňky [5]. Vyšší selektivita tohoto procesu je u triazolů, což se projevuje i menším výskytem a menší závažností nežádoucích účinků než u imidazolů [10].

2.3.1.1. Imidazolová systémová antimykotika

Mezi imidazolová antimykotika první generace, využívaná hlavně v dermatologii a gynekologii, řadíme klotrimazol, ekonazol, mikonazol a jiné. Do druhé generace řadíme ketokonazol, což je první perorální derivát této skupiny. Po chemické stránce jde o imidazoldioxolanový derivát (viz. Obr. 2) [10].

Obr. 2: Chemická struktura ketokonazolu – imidazolového antimykotika převzato z: LIANG, H., 2008, Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action [31] a upraveno





Spektrum těchto antimykotik tvoří zejména dermatofyty, histoplazmy a blastomycety, kandidy i někteří prvoci [52].

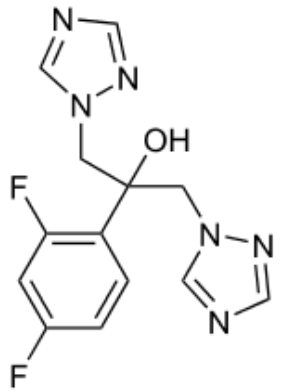
Kromě ketokonazolu se všechna imidazolová antimykotika používají lokálně, k terapii jasně ohraničených ložisek, nebo doplňují celkovou terapii jinými antimykotiky. U chronických forem onychomykóz bývá vysoký podíl relapsů [5, 6]. Imidazolová antimykotika hrají nezastupitelnou roli v léčbě kožních a slizničních kandidóz, endemických mykóz, či vulvovaginálních mykóz [10].

2.3.1.2. Triazolová systémová antimykotika

Třetí generace azolových antimykotik patří triazolovým derivátům [10]. Spektrum těchto antimykotik je širší [52]. Významnými zástupci této skupiny antimykotik jsou flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, terkonazol [5].

Flukonazol, fluorovaný derivát odvozený od imidazolových derivátů (viz. Obr. 3), je lékem volby u infekcí vyvolaných kryptokokoky. Používá se při léčbě vulvovaginálních a orofaryngeálních kandidóz. Profylakticky se podává u pacientů s AIDS, kteří trpí orofaryngeální kandidózou. Itrakonazol se uplatňuje při léčbě dermatomykóz, onychomykóz, slizničních kandidóz nebo jako alternativní léčba u aspergilóz [10, 18].

Obr. 3: Chemická struktura flukonazolu – triazolového antimykotika, převzato z: LIANG, H., 2008, Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action [31] a upraveno

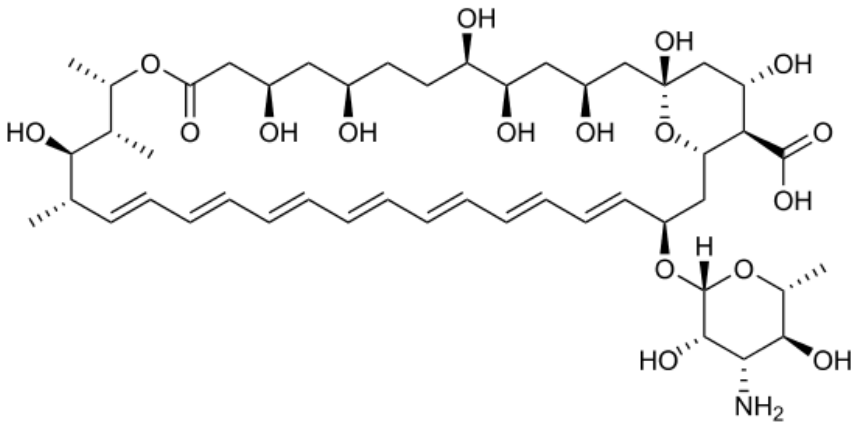


Triazolové deriváty se používají kromě terkonazolu výhradně celkově, perorálně u systémových infekcí nebo intravenózně. Aplikují se u rozsáhlých postižení kůže a sliznice [5].

2.3.2. Polyeny

Polyeny neboli polyenová antimykotika jsou látky, které mají vlastnosti ionoforů. Základ struktury polyenů tvoří 26-40ti členný makrocyklický laktonový kruh, který je složený z hydrofilního polyhydroxylového řetězce a lipofilního „polyenového“ fragmentu (viz. Obr. 4). Hydrofilní část ve své molekule obsahuje glykosidicky vázaný aminocukr a karboxylovou skupinu [10, 30].

Obr. 4:: Chemická struktura amfotericinu B – makrocyklického laktonového kruhu s oběma typy řetězců, převzato z: LIANG, H., 2008, Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action [31] a upraveno



Mechanismus jejich účinku spočívá ve vazbě na ergosterol, kde se v důsledku toho vytváří póry a tím je ovlivněna permeabilita buněčné stěny a cytoplazmatické membrány [52].

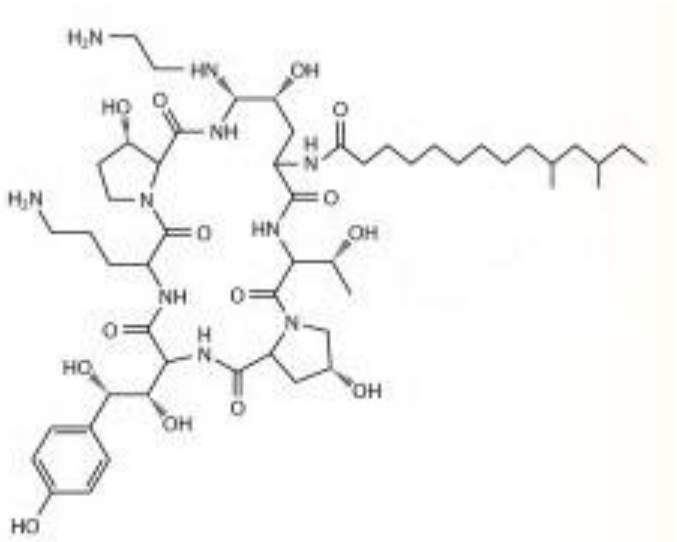
Mezi polyenová antimykotika patří amfotericin B, natamycin, nystatin. Amfotericin B se aplikuje při terapii život ohrožujících mykóz intravenózní formou, topická aplikace je typická u natamycinu a nystatinu. Polyeny se uplatňují u kožních a slizničních infekcí velmi málo, zejména kvůli své toxicitě. Po parenterálním podání se mohou vyskytnout velmi závažné nežádoucí

účinky, jimiž jsou nefrotoxicita, hepatotoxicita, anémie, případně anafylaktický šok [10]. Výskyt a intenzita nežádoucích účinků u amfotericinu B a nystatinu byla snížena vyvinutím léčivých přípravků v lipozomální lékové formě. Natamycin se uplatňuje u keratomykóz a zánětech vnějšího zvukovodu [5]. Natamycin s nystatinem se aplikují pouze topicky a využití nachází i v léčbě poševních infekcí a selektivní dekontaminaci gastrointestinálního traktu [10].

2.3.3. Echinokandiny

Mezi další systémová antimykotika patří echinokandiny a pneumokandiny. Mechanismus účinku těchto látek spočívá v inhibici syntézy (1,3)-beta-glukanu, která následně vede k poruše syntézy buněčné stěny hub [51]. Významným zástupcem je kaspofungin, derivát mastných kyselin a cyklických hexapeptidů (viz. Obr. 5). Dalšími léčivy této skupiny jsou mikafungin, či anidulafungin [10, 36].

Obr. 5: Chemická struktura kaspofunginu – derivátu mastných kyselin a cyklických hexapeptidů, převzato z: SHAPIRO, R. S. *et al*., 2011, Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance and disease [43] a upraveno

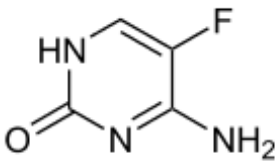


U aspergilóz se využívá jejich fungistatického účinku a u kandidóz fungicidního účinku [10].

2.3.4. Antimetabolity

Dalším zástupcem systémových antimykotik, tentokrát ze skupiny antimetabolitů, je flucytosin. Flucytosin je analog cytosinu (viz. Obr. 6), který je v buňce deaminován na 5- fluorouracil, který inhibuje syntézu RNA. Flucytosin je fungistatický lék s úzkým spektrem účinnosti [52].

Obr. 6: Chemická struktura flucytosinu – analogu cytosinu, převzato z: LIANG, H., 2008, Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action [31] a upraveno

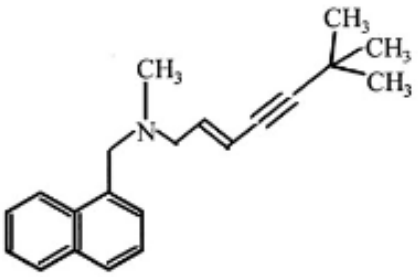


Flucytosin působí především na kandidy, kryptokoky, částečně aspergily a některé původce subkutánních mykóz. Aplikuje se v perorální, ale i intravenózní formě v kombinaci s jinými antimykotiky [10].

2.3.5. Allylaminy

Do skupiny allylaminů patří antimykotika jako naftifin, či terbinafin. Společnou charakteristikou těchto látek je naftylmethylaminové uspořádání (viz. Obr. 7) [20]. Mechanismus účinku těchto antimykotik spočívá v inhibici tvorby ergosterolu, a to blokací enzymu skvalenepoxidázy, což se následně odráží v narušení funkce buněčné stěny [52].

Obr. 7: Chemická struktura terbinafinu – naftylmethylaminového uspořádání, převzato z: GHANNOUM, M. A. *et al*., 1999, Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistence [16] a upraveno



Terbinafin se uplatňuje zejména v léčbě dermatofytóz a onychomykóz, a to jak v perorální, tak topické formě. Rozsáhlé onychomykózy, dermatofytózy je potřeba léčit systémově a dlouhodobě [5, 19].

2.4. Mechanismy rezistence mykotických agens vůči antimykotickým látkám

Na světě je zhruba 1,5 milionu druhů hub. Nejčastějšími patogenními houbami, které působí na člověka, jsou *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus*. Nejen výše zmíněné houby si postupným vývojem vytvořily mnohočetné způsoby, jak přežít v hostitelském nepřátelském prostředí. K těmto obranným mechanismům patří bezesporu také různé způsoby, na základě kterých jsou schopny odolávat působení antimykotických látek, tedy vůči kterým odolávají nebo se stávají rezistentními [21, 43].

Vyvíjející se a šířící se mechanismy rezistence velmi výrazně přispívají nejen k nárůstu počtu infekčních onemocnění, ale také k terapeuticky špatně zvladatelnému průběhu infekce, která může končit až smrtí postiženého jedince. S vývojem nových antimykotik v důsledku rostoucí rezistence je důležité pochopit vlastní mechanismy rezistence na molekulární úrovni [43]. K pochopení molekulárních mechanismů může přispět znalost evolučních mechanismů, které s molekulárními mechanismy souvisí [7]. Mechanismů rezistence vůči antimykotikům je vícero (viz. Tab. 1). Přičemž léková rezistence neustále narůstá [39, 41].

Tab. 1: Přehled mechanismů rezistence a mechanismů účinku vybraných antimykotik, převzato z: Mallátová N. *et al*., 2011,Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP [32] a upraveno

Antimykotikum	Mechanismus účinku	Mechanismus rezistence
antimetabolity flucytosin	buněčná smrt inhibice DNA a RNA syntézy	genově podmíněná enzymatická modifikace
azoly flukonazol itrakonazol vorikonazol posakonazol	poškození buněčné stěny zábrana syntézy ergosterolu inhibicí 14 alfa-demetylázy na cytochromu P450	aktivací efluxní pumpy (geny *CDR*, *MDR*) snížení afinity k vazebným místům (geny *ERG11*, *CYP51*) změna regulace cílových enzymů (geny *ERG11*, *CYP51*) aktivace vedlejší cesty (geny *ERG3*)
echinokandiny anidulafungin kaspofungin mikafungin	vznik defektní buněčné stěny ruptura buňky inhibice beta-1,3-D-glukansyntázy	bodová mutace na genech *FKS1* a *FKS2*
polyeny amfotericin B lipozomální AmB AmB v lipidovém komplexu koloidní AmB	buněčná smrt zábrana tvorby ergosterolu v membráně oxidativní destrukce buněčné membrány	změna ve struktuře ergosterolu kumulace nefunkčních sterolů v membráně

Legenda: AmB: amfotericin B; DNA: deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina; RNA: ribonucleic acid, ribonukleová kyselina; *CDR*: *Candida* drug resistance, *Candida* léková rezistence; *MDR*: multi-drug resistance protein, protein multi-lékové rezistence; *ERG3*: gen kódující enzym sterol ∆5,6desaturázu; *ERG11*: gen kódující 14 alfa-demetylázu; *CYP51*: cytochrome P450, family 51, jedná se o enzym 14 alfa-demetylázu, který patří do skupiny cytochromu P450, rodiny 51; *FKS1*: gen kódující podjednotku enzymu β-1,3-D-glukansyntázy; *FKS2*: gen kódující podjednotku enzymu β-1,3-D-glukansyntázy

Rezistence k antimykotickým látkám se dá obecně vysvětlit tak, že infekce přetrvává i přes zdánlivě vhodnou léčbu antimykotiky. Z laboratorního hlediska rezistenci můžeme vyjádřit jako schopnost růst a množit se v přítomnosti antimikrobiální látky. Citlivost, či rezistenci testovaného mikroorganismu vůči antimykotiku, lze určit pomocí řady laboratorních testů, mimo jiné pomocí mikrodiluční bujónové metody [43].

Mechanismy rezistence jsou studovány na základě genetických, biochemických a klinických studií. Sledování molekulárních mechanismů, které úzce souvisí s klinickými a buněčnými faktory, se neustále vyvíjí [36].

Obecně lze říci, že studium a pochopení molekulárních mechanismů rezistence je důležité nejen z pohledu volby vhodné terapeutické strategie, ale také z důvodu prevence vzniku a šíření těchto mechanismů [26].

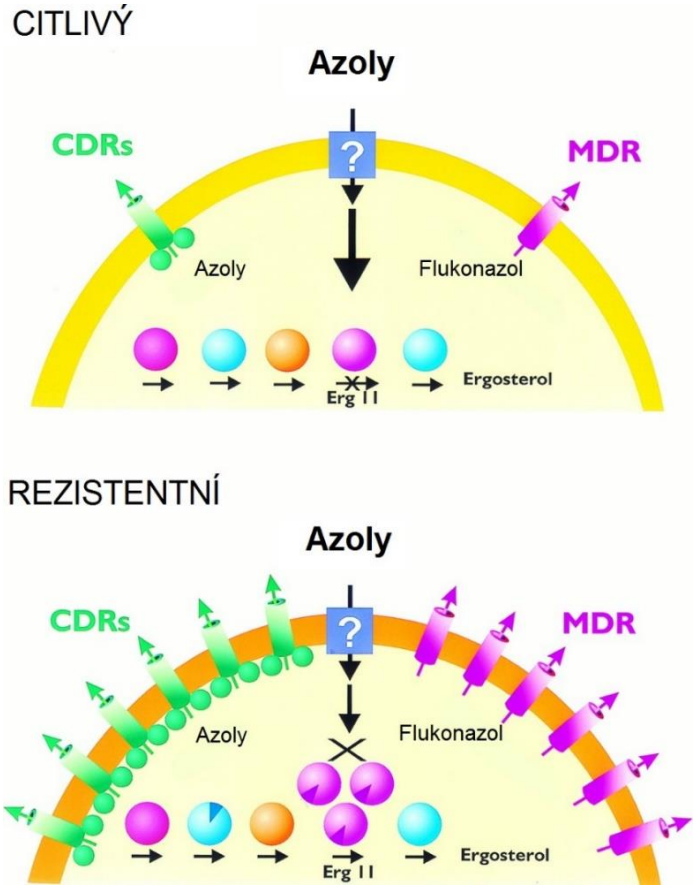
Rezistenci většinou můžeme dělit na primární a sekundární, neboli na vrozenou a získanou. Primární rezistenci lze nalézt u takových hub, u kterých nedošlo k předchozí expozici antimykotickou látkou. Sekundární rezistenci lze očekávat u takových kmenů, které již byly vystaveny antimykotické látce [25].

Při studiu mikrobiologické rezistence je potřeba znát přesné definice rezistence na léky; přezkoumat mechanismy, kterými působí aktuálně používaná antimykotika; přesné a účinné metody, kterými můžeme testovat citlivost antimykotik; zjistit a pochopit mechanismy, jimiž vzniká rezistence hub na antimykotické látky [41].

2.4.1. Mechanismus rezistence k azolům

Jeden z molekulárních mechanismů rezistence vůči azolovým antimykotikům může vycházet z genetických změn na úrovni genu *ERG11* (viz. Obr. 8). Tento gen kóduje protein, lanosterol 14 alfa-demethylázu, což je cílový enzym pro vazbu azolů. V případě *ERG11* se jedná hlavně o bodové mutace [53].

Obr. 8: Schématické znázornění molekulárních mechanismů rezistence vůči azolům, převzato z: WHITE, T. C. *et al*., 1998, Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance [53] a upraveno



Legenda: V případě citlivých buněk azoly inhibují enzymy kódované genem *ERG11* (fialové kolečko) a tím blokují syntézu ergosterolu. Rozeznáváme dva typy efluxních pump, ABC transportér (zelený pruh) s dvěma ABC doménami (zelená kolečka) a MDR protein (fialový proužek). V případě rezistentních buněk, v důsledku bodových mutací (tmavé klínky ve fialovém kolečku) genu *ERG11* a zvýšené expresi je účinnost azolů nižší. Může také docházet ke změnám jiných enzymů (tmavé klínky v modrém kolečku), či ke změnám sterolů v buněčné membráně (oranžová membrána). *CDRs* geny se zdají být specifické k mnoha azolům, geny *MDRs* pouze k flukonazolu [53]. Vysvětlivky: *ERG 11*: gen z rodiny *ERG* kódující 14 alfa-demetylázu; ABC transportér: ATP binding cassette, transportní protein vázající ATP; MDR protein: multi-drug resistance protein, protein multi-lékové rezistence; CDR: *Candida* drug resistance, *Candida* léková rezistence

Výzkumnými studiemi byly například zjištěny bodové mutace v *ERG11* u kmene *Candida albicans*, které vedly na pozici 467 k náhradě aminokyseliny argininu za lysin. Tato mutace pravděpodobně vede ke strukturálním a funkčním změnám hem kofaktoru [49, 53].

Další mechanismus rezistence může vycházet z bodové mutace, která byla zjištěná u azol rezistentních laboratorních kmenů *Candida albicans*, a to na aminokyselině v pozici 315 (jde o nahrazení threoninu za alanin, mutace je označena T315A, kde T je threonin a A je alanin). Mutace T315A snížením enzymatické aktivity a vazbou azolů na aktivní místo vede k rezistenci k flukonazolu [29, 33].

Aby tyto mutace byly co nejvíce efektivní, je potřeba, aby byla snížena afinita k léčivu, aniž by byla poškozena funkce buňky. Podobné mutace byly zjištěny i u kmenů *Candida neoformans* a *Aspergillus fumigatus* [33].

K lékové rezistenci u azolů mohou přispívat také dva typy efluxních pump. Prvním typem je ABC transportér (ATP binding cassette, transportní protein vázající ATP a druhým typem je MFS transportér (major facilitator superfamily, nadrodina předních zprostředkovatelů). ABC transportér je tvořen čtyřmi proteinovými doménami, z toho dvě jsou membránové a dvě jsou nukleotidové vazebné domény. Výše zmíněné dvě membránové domény jsou každá zvlášť tvořeny šesti až sedmi segmenty. Zdrojem energie pro ABC transportér je ATP (adenosine triphosphate, adenosin trifosfát) [34, 53].

ABC transportéry jsou kódovány geny *CDRs* (*Candida* drug resistance, *Candida* léková rezistence), z nichž za lékovou rezistencí mohou stát konkrétně dva geny, kterými jsou *CDR1* a *CDR2 a r*ezistence je podmíněna jejich zvýšenou expresí [34].

Efluxní pumpy tvořené MFS proteiny jsou tvořeny dvanácti až čtrnácti transmembránovými segmenty a nejsou zde obsaženy, na rozdíl od ABC transportérů, nukleotidové vazebné domény. Zdrojem energie u MFS je protonová hnací síla v membráně. Gen, který kóduje MFS je gen *MDR1* (multi-drug resistance, gen kódující protein multi-lékové rezistence) [53].

Mezi mechanismy rezistence patří i vznik biofilmu. Biofilmy jsou tvořeny mimo jiné extracelulární matricí a mechanismy rezistence mykotických agens schopných tvořit biofilm zůstávají dodnes zcela neobjasněné. Mykotická agens,

které jsou součástí biofilmu, který samy vytváří, se vyznačují tím, že jsou rezistentní vůči většímu množství antimykotik, což znamená velký problém týkající se terapie [34].

Mechanismus rezistence u azolů může souviset i se změnami v jiných enzymech stejné ergosterolové dráhy [53].

2.4.2. Mechanismus rezistence k polyenům

Rezistence na polyeny není až tak zásadním problémem. Většinou je rezistence spojena se sníženým obsahem ergosterolu v membráně. Dále rezistence může být spojována se změnami ve struktuře membrány nebo poměrem sterolů a fosfolipidů v membráně, dále se záměnou ergosterolu za jiný sterol, změnou orientace, maskováním stávajících sterolů. Na základě analýz tyto změny pravděpodobně souvisí s mutacemi genů *ERG2* (gen z rodiny *ERG* kódující enzym ∆7,8isomerázu) a *ERG3* (gen z rodiny *ERG* kódující enzym sterol ∆5,6desaturázu). Konkrétně rezistence k amfotericinu B je poměrně ojedinělá, ale jsou zjištěny vrozené rezistence u *Candida guilliermondii* a *Candida lusitaniae* [48, 53].

Rezistence vůči amfotericinu B může být navíc posílena zvýšenou aktivitou katalázy (enzym katalyzující rozklad peroxidu vodíku), následkem je pak snížení oxidačního poškození mykotické buňky [25].

2.4.3. Mechanismus rezistence k echinokandinům

Rezistence k echinokandinům je pravděpodobně způsobena mutacemi v genu, který kóduje β-1,3-D-glukan syntázu. Může se kupříkladu jednat o bodovou mutaci genů *FKS1* (gen kódující podjednotku enzymu beta-1,3-D-glukan syntázy) a *FKS2* (gen kódující podjednotku enzymu beta-1,3-D-glukan syntázy). Tento druh rezistence byl zdokumentován u několika druhů kvasinky rodu *Candida*, například *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. metapsilosis* [33].

U *C. glabrata* byly prokázány mutace obou výše zmíněných genů a s tím souvisejících dvou „hot-spot“ oblastí, HS1 (hot-spot1) a HS2 (hot-spot2). Tato souvislost genů a „hot-spot“ oblastí, týkající se rezistence a nižší citlivosti

kandid k echinokandinům, byla prokázána různými studiemi [37].

Rezistence k echinokandinům z hlediska mechanismu může souviset i s efluxními pumpami [25].

2.4.4. Mechanismus rezistence k 5- flucytosinu

Primární, vrozená rezistence k 5- flucytosinu je poměrně běžným fenoménem. Odhaduje se, že až 10% klinických izolátů *C. albicans* je primárně rezistentních k 5- flucytosinu [53]. Sekundární rezistence se vyskytuje přibližně u 30 % izolátů a primární rezistence, která je běžným jevem, se vyskytuje zhruba u 10 % izolátů kmene *C. albicans*. Získaná rezistence 5- flucytosinu může být zprostředkována několika mechanismy. Za tímto typem rezistence mohou být mutace v genech kódujících enzymy jako je cytosin permeáza, či cytosin deamináza [25]. Za rezistenci 5- flucytosinu jsou konkrétně zodpovědné mutace genů *FCY1* a *FCY2. FCY1* kóduje cytosin deaminázu, *FCY2* kóduje cytosin permeázu [53].

Dále může být rezistence vůči 5- flucytosinu způsobena sníženou aktivitou enzymu uracil fosforibosyltransferázy [25].

2.4.5. Mechanismus rezistence k allylaminům

Přesný mechanismus rezistence vůči allylaminům u lidských patogenních hub nebyl prozatím objasněn, ale lze jej předpokládat v důsledku zvyšujícího se využití těchto antimykotik [17].

2.5. Metody pro *in vitro* testování citlivosti mykotických agens vůči antifungálním látkám

Metody pro *in vitro* testování citlivosti byly primárně vyvinuty za účelem určení citlivosti klinických izolátů vůči běžně používaným antimikrobním látkám [39]. K dnešní době je dostupných více metod, které se liší jednak uspořádáním (makro vs. mikrodiluční uspořádání), či způsobem hodnocení (kvalitativní vs. kvantitativní metody). Ideálně, metoda pro antifungální testování citlivosti, by měla být standardizovaná, přesná, reprodukovatelná. Cílem je dosáhnout těchto podmínek a vycházet z nich při zkoumání rezistence k lékům [38, 40].

V klinické praxi se běžně využívá metod standardizovaných institucemi jako je „The Clinical and Laboratory Standard Institute“ (CLSI, Ústav pro klinické a laboratorní standardy) a „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (EUCAST, Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). CLSI působí ve Spojených Státech a EUCAST je výbor působící v Evropě [39].

Tyto instituce se mimo jiné zabývají standardizací metod určených k testování různých mikrobiálních agens s cílem vytvořit, zavést a v rámci Evropské unie, či celosvětově tyto metody harmonizovat. Stejně tak tyto instituce v kontextu se standardizovanými metodami shromažďují a uvádí hraniční hodnoty pro hodnocení rezistence (tzv. breakpointy), které se běžně využívají v praxi [39, 47]. Tyto hraniční hodnoty se vyjadřují buď v jednotkách mg/l, případně μg/ml a jsou neustále aktualizovány na základě nových studií [28, 47].

Důležitý je vztah mezi hraničními hodnotami a vlastní účinností *in vivo*. To vše je třeba neustále sledovat a tím se řídit při stanovení antimikrobiální citlivosti referenčními postupy, které jsou stanoveny výbory EUCAST a CLSI [8]. Testování citlivosti antifungálních látek prostřednictvím referenčních metod CLSI a EUCAST je také důležitým nástrojem pro zkoumání *in vitro* aktivity nových sloučenin a studia rezistence antimykoticky působících látek [40].

Samozřejmě, jak je zmíněno výše, rovněž pro testování citlivosti kvasinek, tak i vláknitých hub byly v rámci organizace CLSI vytvořeny laboratorní metodické standardy. V roce 1997 byl v USA organizací CLSI vydán

dokument s označením M27A, který popisuje stanovení citlivosti vláknitých hub diluční metodou. V roce 2002 byl vydán další dokument, označený M38A, který popisuje stanovení citlivosti vláknitých hub diluční metodou [22].

Komise EUCAST vyvinula dvě standartní metody, s označením E. def 7 a s označením E. def 9, k testování citlivosti antifungálních látek. Jak EUCAST, tak CLSI zahrnují standardizované postupy stanovení citlivosti a interpretační kritéria pro jednotlivá antimykotika. Až na pár odlišností se oba dva postupy shodují. Odlišnosti jsou uvedeny v tabulkách (viz. Tab. 2, 3). Základní odlišnosti se týkají složení média, inkubačního času, inokula a způsobu hodnocení MIC (minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace) [14, 22].

Tab. 2: Rozdíly mezi metodickými přístupy, pro testování citlivosti kvasinek k antifungálně působícím látkám, rozdíly mezi CLSI a EUCAST, metodický přístup CLSI M27-A3 vs. EUCAST E. def 7.2, převzato z: ESPINEL - INGROFF, A. E. *et al*., 2013, , EUCAST and CLSI: Working together towards a harmonized method for antifungal susceptibility testing [14] a upraveno

	CLSI M 27- A3	EUCAST E. def 7.2
mikrotitrační destičky	kulaté dno	ploché dno
růstové médium	RPMI 1640 s 0,2% glukózou	RPMI 1640 s 2% glukózou
velikost inokula	0,5–2,5*10^3 cfu/ml	0,5–2,5*10^5 cfu/ml
doba inkubace	24-48 hod.	24-48 hod.
teplota	35°C	35°C
odečítání	vizuální	spektrofotometrické
MIC kritéria	amfotericin B: nejnižší léková koncentrace zabraňující růstu; azoly, echinokandiny, flucytosin: nejnižší léková koncentrace inhibující růst z více jak 50%	amfotericin B: nejnižší léková koncentrace zabraňující růstu; azoly, echinokandiny, flucytosin: nejnižší léková koncentrace inhibuje růst z více jak 50%

Legenda: CLSI M27-A3: Clinical and laboratory standard institute, document M27-A3, Institut pro klinické a laboratorní standardy, dokument označený M27-A3; EUCAST E. def 7.2: European committee on antimicrobial susceptibility testing, document E. def 7.2, Evropská komise pro antimikrobiální testování citlivosti, dokument označený E. def 7.2; cfu: colony forming unit, kolonii tvořící jednotka; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

Tab. 3: Rozdíly mezi metodickými přístupy, pro testování citlivosti vláknitých hub k antifungálně působícím látkám, rozdíly mezi CLSI a EUCAST, metodický přístup CLSI M38-A2 vs. EUCAST E. def 9.1, převzato z: ESPINEL - INGROFF, A. E*. et al*., 2013, EUCAST and CLSI: Working together towards a harmonized method for antifungal susceptibility testing [14] a upraveno

	CLSI M38 – A2	EUCAST E.def. 9.1
mikrotitrační destičky	kulaté dno	ploché dno
růstové médium	RPMI 1640 s 0,2% glukózou	RPMI 1640 s 2% glukózou
velikost inokula	0,4-5x10^4 cfu/ml	2-5x10^5 cfu/ml
doba inkubace	24-48 hod	24-48 hod
teplota	35°C	35°C
odečítání	vizuální	vizuální
MIC kritéria	amfotericin B, azoly MIC: nejnižší léková koncentrace zabraňující růstu; echinokandiny: MEC, nejnižší léková koncentrace vedoucí k morfologickým změnám	amfotericin B, azoly MIC: nejnižší léková koncentrace zabraňující růstu; echinokandiny: MEC, nejnižší léková koncentrace vedoucí k morfologickým změnám

Legenda: CLSI M38-A2: Clinical and laboratory standard institute, document M38-A2, Institut pro klinické a laboratorní standardy, dokument označený M38-A2; EUCAST E. def 9.1: European committee on antimicrobial susceptibility testing, document E. def 9.1, Evropská komise pro antimikrobiální testování citlivosti, dokument označený E. def 9.1; cfu: colony forming unit, kolonii tvořící jednotka; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace; MEC: minimal effective concentration, minimální efektivní koncentrace

V současné době jsou kromě standardních referenčních metod k dispozici mimo jiné nereferenční metody, jimiž jsou například komerčně dostupné testy (viz. Tab. 4), či nové metody (viz. Tab. 5a, 5b). Každá další vyvinutá metoda, či test vyžaduje porovnání s výsledky minimální inhibiční koncentrace, které byly získány CLSI a EUCAST metodou. Mezi komerčně dostupné testy patří Sensititre YEASTOne (SYO, MCS Diagnostics BV,

Německo), E-test (bioMérieux, Francie), Vitek 2 (bioMérieux, Francie). K metodám a analytickým instrumentacím patří průtoková cytometrie (FC, flow cytometry), MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry, laserová desorpce/ ionizace za účasti matrice – průletová hmotnostní spektrometrie) či IMC (isothermal microcalorimetry, izotermální mikrokalorimetrie), 4D (4-well azole-agar dilution, 4D azol-agarová diluční metoda) a další [40].

Tab. 4: Nereferenční komerční testy k testování citlivosti klinických izolátů rodu *Candida* a *Aspergillus* k antifungálně působícím látkám, převzato z: POSTERARO, B. *et al*., 2014, Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective [40] a upraveno

Charakteristika	Komerční testy		
	SYO	E-test	Vitek 2
vhodné pro	kvasinky a plísně	kvasinky a plísně	kvasinky
technika	bujónová mikrodiluce	agarová metoda	bujónová mikrodiluce
teplota	35-37°C	35-37°C	přístrojový inkubátor – 35-37°C
doba inkubace	24-48 hod	24-48 hod	12-24 hod
hodnocení výsledků	vizuální	Vizuální	automatické - kolorimetrická detekce
závěr	MIC, MEC(echinokandiny)	MIC	MIC
využití	pouze běžné testování izolátů	pouze běžné testování izolátů	pouze běžné testování izolátů

Legenda: SYO: Sensititre YEASTone; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace; MEC: minimum effective concentration, minimální efektivní koncentrace

Tab. 5a: Nereferenční nové analytické metody k testování citlivosti klinických izolátů rodu *Candida* k antifungálně působícím látkám, převzato z: POSTERARO, B. *et al*., 2014, Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective [40] a upraveno

Charakteristika	Nové metody	
	FC	MALDI-TOF MS
vhodné pro	*Candida albicans*	*Candida albicans*
technika	bujónová diluce	bujónová diluce
teplota	35°C	37°C
doba inkubace	1-4 hod	3 hod
měření výsledků	fluorescenční detekce	hmotnostní spektrometrie
hodnotící parametry	MFEC	CCI
využití	rychlá detekce rezistence antifungálních látek (neslouží k využití v rutinní praxi)	rychlá detekce rezistence ke kaspofunginu (neslouží k využití v rutinní praxi)

Legenda: FC: flow cytometry, průtoková cytometrie; MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spektrometry, laserová desorpce/ ionizace za účasti matrice – průletová hmotnostní spektrometrie; MFEC: minimum fluorescence enhancing concentration, minimální fluorescenční koncentrace; CCI: composite correlation index, složený korelační index

Tab. 5b: Nereferenční nové analytické metody k testování citlivosti klinických izolátů rodu *Candida* k antifungálně působícím látkám, převzato z: POSTERARO, B. *et al*., 2014, Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective [40] a upraveno

Charakteristika	Nové metody	
	IMC	4D
vhodné pro	*Aspergillus sp*.	*Aspergillus sp*.
technika	bujónová diluce	agarová diluce
teplota	37°C	37°C
doba inkubace	48 hod	48 hod
měření výsledků	isotermický mikrokalorimetr	vizuální
hodnotící parametry	MHIC	žádný růst
využití	potenciální detekce rezistentních izolátů, metodika v raném stadiu vývoje	skrínink potenciálně rezistentních izolátů k azolům, k tomu je potřeba potvrzení referenční metodou

Legenda: IMC: isothermal microcalorimetry, izotermální mikrokalorimetrie; 4D: 4-well azole-agar dilution, 4D agar-azolová diluční metoda; MHIC: minimal heat inhibitory concentration, minimální tepelná inhibiční koncentrace

2.5.1. Mikrodiluční bujónová metoda

Základem této metody je práce s mikrotitračními destičkami (nejčastěji s 96 jamkovým panelem). Uvnitř jamek mikrotitrační destičky dochází k interakci antimikrobní látky o různých koncentracích s testovaným mikroorganismem. Do testu jsou vždy zavedeny také pozitivní růstové kontroly, tj. jamky obsahující pouze živné médium a testovaný mikroorganismus, kde testovaný mikroorganismus není inhibován v růstu antimikrobní látkou [24].

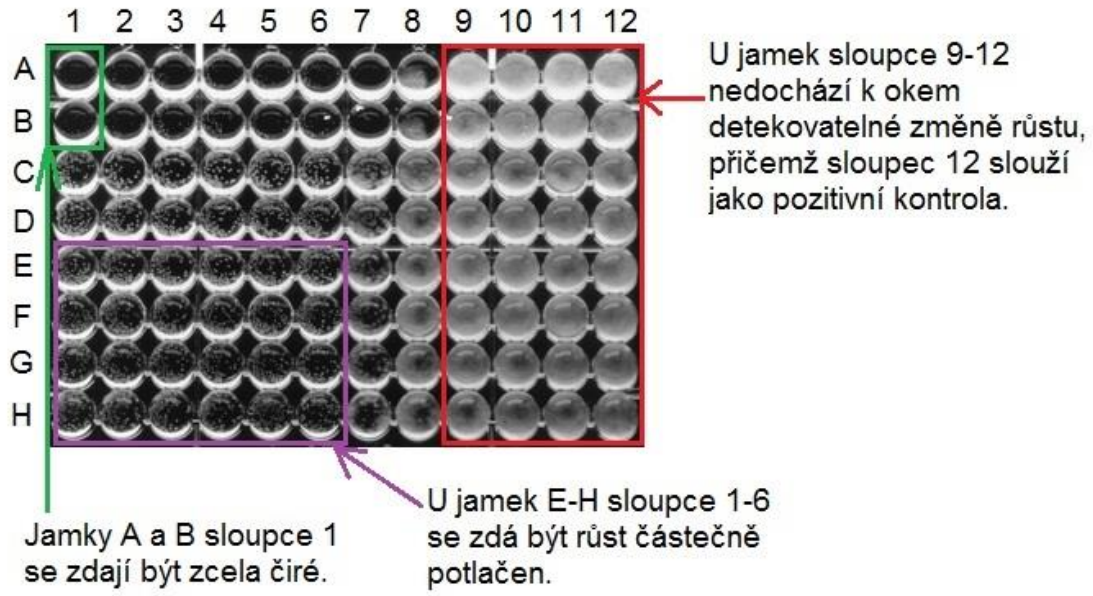
V rámci této metody dochází ke dvojkovému ředění antimikrobních látek. Používají se mikrotitrační destičky, které mají buď kónické, nebo kulaté dno. Již připravené destičky s antimikrobní látkou lze získat od výrobce nebo ji připravit v laboratoři [24].

Po určité době, většinou po inkubaci přes noc (tj. 16-24 hodin), při 35°-37°C, se odečítá hodnota MIC. Přesněji, buď vizuálně, nebo pomocí

instrumentace (spektrofotometr, měření denzity) se zkoumá zákal, kterým je charakterizován růst buněk (viz. Obr. 9). Hodnota MIC pak odpovídá jamce s nejvyšším ředěním antimikrobní látky (tedy první jamka snižujícího se koncentračního sledu testované jamky), kde již došlo k inhibici růstu mikroorganismu, tedy ve které nebyl detekován zákal, který je markerem toho, že dochází k pomnožování mikrobiálních agens [24]. V případě našeho experimentu se po uplynutí stanoveného času vizuálně odečítala první čirá jamka bez zákalu, kde nic neroste. Všeobecně se rozlišoval buď zákal (jakýkoliv i mírný) nebo čiré růstové médium.

Mezi výhody této metody patří jednoduchost provedení, možnost automatizace, reprodukovatelnost, možnost standardizace, velká totožnost s výsledky agarové diluční metody, dlouhodobé uchovávání destiček a také nezanedbatelně nižší spotřeba materiálu, ať už se jedná o růstové médium, či se jedná o antimikrobní látky. Nevýhodou může být případné nerozpoznání kontaminace, vyšší cena (především v případě komerčně dostupných kitů) a možnost vytvoření chyby při přípravě ředění [24].

Obr. 9: Ilustrativní snímek znázorňující vyhodnocení mikrotitrační destičky mikrodiluční bujónovou metodou. Testování citlivosti různých klinických izolátů vláknité mikromycety *Aspergillus* spp. vůči kaspofunginu, převzato z: ESPINEL - INGROFF, A. E., 2003, Evalution of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. To Caspofungin Acetate (MK-0991) [13] a upraveno



2.5.2. Disková difúzní metoda

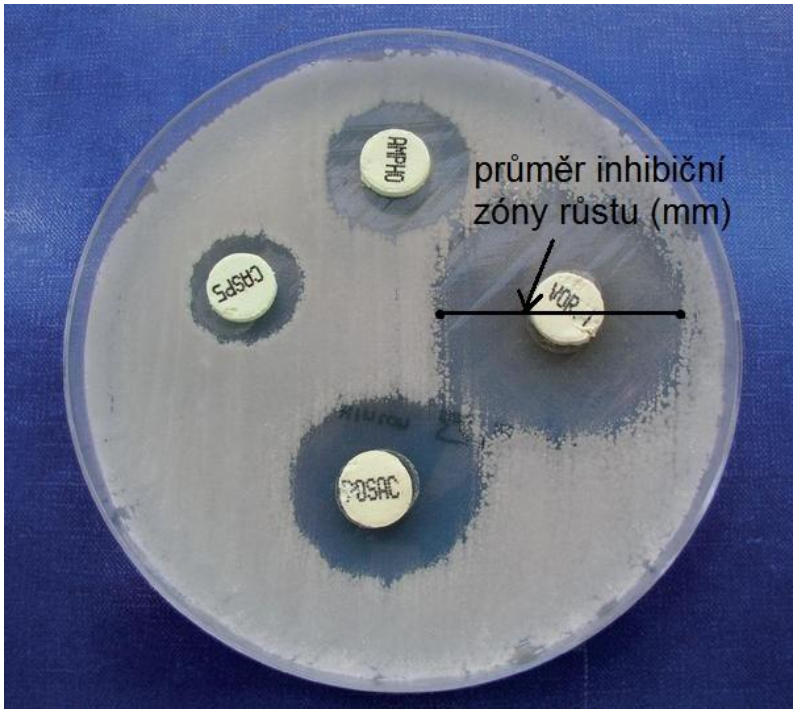
Disková difúzní metoda se vyznačuje praktičností, jednoduchostí a možností standardizace [24].

U této metody se využívá Mueller-Hintonova agaru v Petriho misce, který je očkován modelovým kmenem, nejčastěji přelitím suspenze modelového kmene o vhodné optické denzitě a na jehož povrch se dále aplikují papírové disky napuštěné antimikrobiální látkou. Inkubace probíhá běžně 18-24 hodin při 35°-37°C . Během této inkubace dochází k uvolňování antimikrobiální látky do agaru a tím pozastavuje růst na danou antimikrobní látku citlivých testovaných mikroorganismů. Dochází ke vzniku inhibičních zón, tj. většinou zcela projasněný prostor okolo disku bez viditelného nárůstu mikroorganismů (viz. Obr. 10). Tyto zóny se pak tabulkově porovnávají s hraničními hodnotami. Zóny se měří s přesností na milimetry. Výsledky této metody jsou kvalitativní, kdy se

určuje jedna ze tří kategorií citlivosti organismu: rezistence, střední (intermediátní) citlivost, citlivost organismu [24, 27].

Hlavní výhodou je jednoduchost nevyžadující speciální přístrojové vybavení a rychlost provedení. Další výhodou jsou nižší náklady. Nevýhodou je znemožnění automatizace této metody [24].

Obr. 10: Ilustrativní snímek varianty diskové difúzní metody, Neo-Sensitabs systému, převzato z: MALLÁTOVÁ, N. *et al*., 2011, Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP [32] a upraveno



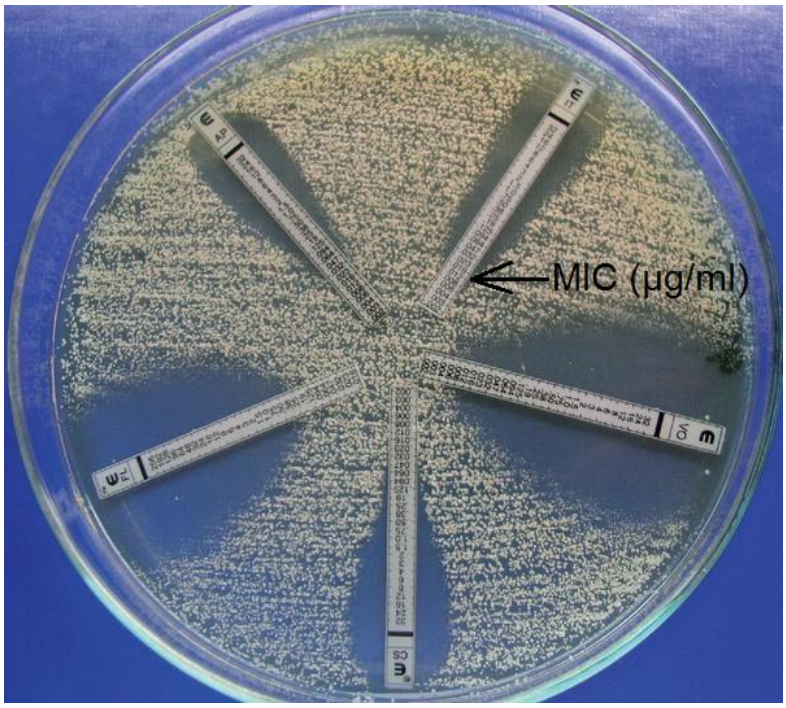
Legenda: Neo-Sensitabs systém je variantou diskové difúzní metody, kde místo papírových disků se využívají tablety napuštěné antimykotiky. Výrobce poskytuje plně vypracované pracovní postupy a také interpretační kritéria. Naočkovaný kmen: *Candida krusei*; AMPHO – amfotericin B; VOR. 1 – vorikonazol; POSAC – posakonazol; CASP5 – kaspofungin.

2.5.3. Gradientová difúzní metoda – E-test

E-test je metoda, která kombinuje základní postupy diskové difúzní metody a základní postupy diluční metody. Jde o metodu, která dovoluje kvantitativní hodnocení. Základ tohoto testu tvoří plastikový inertní proužek, kde na jedné straně je naimpregnován gradient antimikrobiální látky s určitou koncentrací. Na druhé straně proužku je znázorněna kontinuální stupnice, která slouží k odečítání MIC. Princip této metody spočívá v tom, že nejdříve se Mueller-Hintonovův agar přelije suspenzí modelového kmene o vhodné optické denzitě a poté se na disk klade proužek napuštěný antimikrobní látkou. Následně dochází k difúzi antimikrobní látky z proužku do agaru v koncentračním gradientu. Inkubace běžně probíhá přes noc. Po inkubaci se kolem proužku vytvoří inhibiční zóna ve tvaru elipsy (viz. Obr. 11). MIC se pak vyhodnocuje v místě, kde elipsa vytváří průsečík se stupnicí proužku [24].

Výhodou metody je jednoduchost a díky podobnosti s diskovou difúzní metodou slouží k upřesnění výsledků. Za nevýhody této metody lze považovat vysokou cenu a důležitá je přesná příprava hustoty suspenze modelových mikrobiálních kmenů [2, 24].

Obr. 11: Ilustrativní snímek gradientové difúzní metody – E-testu, převzato z: : MALLÁTOVÁ, N. *et al*., 2011, Testování citlivosti mikromycet k antimykotikům *in vitro* u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP [32] a upraveno

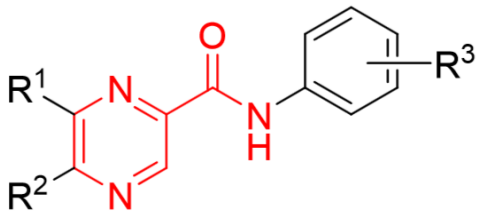


Legenda: naočkovaný kmen *Candida albicans* na Mueller-Hintonově agaru, kladené E-test proužky: AP- amfotericin B; IT- itrakonazol; VO- vorikonazol; CS- kaspofungin; FL- flucytosin

2.6. Pyrazinamid a jeho deriváty

Většina testovaných látek je odvozena od derivátů pyrazinu. Deriváty pyrazinu se vyznačují širokým spektrem účinků. Mohou působit diureticky, analgeticky, hypnoticky, antivirově, protirakovinotvorně, antibakteriálně, ale hlavně antimykoticky, antimykobakteriálně. Počet léčiv na pyrazinové bázi roste, zkoumají se látky jako takové a jejich biologická aktivita [12]. Dochází tak k častým modifikacím pyrazinamidové struktury. Nejčastěji je substituováno pyrazinové jádro, ale i samotné benzenové jádro (viz. Obr. 12).

Obr. 12: Modifikace pyrazinamidové struktury, možnosti substituce pyrazinového jádra (R^1, R^2), možnosti substituce benzenového jádra (R^3). Pyrazinamidová část je zbarvena červeně, převzato z: DOLEŽAL, M. *et al.*, 2009, Substituted N-Phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and antimycobacterial evaluation [11]



Konkrétně pyrazinamid byl objeven při nalézání nových antituberkulotik z derivátů nikotinamidu, což je analog pyrazinamidu. Mechanismus účinku pyrazinamidu pravděpodobně souvisí s kyselinou pyrazinkarboxylovou, která vzniká z pyrazinamidu. Tato kyselina narušuje energii membrán a funkci membránového transportu. Samotný účinek je závislý na pH vnějšího prostředí, kdy aktivita pyrazinkarboxylové kyseliny se projevuje při pH 5,5. Při tomto pH je aktivita pyrazinkarboxylové kyseliny nejvyšší. Pokud je pH neutrální, je neaktivní [11].

Pyrazinamid je díky svému antimykobakteriálnímu účinku velmi účinné antituberkulotikum, které má ale i své nevýhody. Hlavní nevýhody vychází z jeho možných nežádoucích účinků - z poměrně vysokého výskytu jaterních dysfunkcí a hyperurikémie. Další nevýhodou je to, že je neúčinný proti *Mycobacterium avium* komplexu [54].

Tuberkulóza je stále jedna z hlavních příčin úmrtí nejen v rozvojových zemích, ale i vyspělých zemích. Proto se neustále syntetizují nové deriváty pyrazinu a pyrazinamidu. Hledají se nová léčiva, účinnější léčiva než je pyrazinamid, léčiva účinná proti *Mycobacterium tuberculosis*, ale i *Mycobacterium avium* komplexu. U nově syntetizovaných látek na bázi pyrazinamidu se, mimo jiné, testuje antimykobakteriální aktivita *in vitro*. Hledání nových léčebných alternativ je důležité také z pohledu toho, že dochází k robustnímu nárůstu nozokomiálních infekcí a v důsledku toho také k narůstající multirezistenci mykobakteriálních kmenů tuberkulózy [54].

Rezistence mykobakterií na pyrazinamid vzniká v důsledku mutace genu *pncA*, který kóduje enzym pyrazinamidázu. Pyrazinamidáza je enzym, který se účastní metabolizace pyrazinamidu na pyrazinkarboxylovou kyselinu [11].

Situace je alarmující, proto je nezbytné vyvíjet nové prostředky, které budou účinné proti rezistentním bakteriím a budou disponovat jiným mechanismem účinku, než stávající antimykotika, na jejichž efekt se již mykobakterie dokázaly adaptovat [11].

Antimykotické vlastnosti se objevují jak u přírodních derivátů pyrazinamidu, tak i u derivátů připravených synteticky. Nadějnými deriváty jsou např.: terc-butylester-5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny nebo arylsulfanyl-5-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril [9].

Předmětem zkoumání jsou například deriváty N-benzylpyrazin-2-karboxamidu [42], deriváty N-fenylpyrazin-2-karboxamidu [11], deriváty 5-amino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu [23].

3. Experimentální část

3.1. Materiál

3.1.1. Pomůcky

sterilní mikrotitrační destičky s víčky – P-Lab a.s., Česká republika
mikropipety zn. Socorex a Eppendorf - P-Lab a.s., Česká republika
sterilní špičky - P-Lab a.s., Česká republika
12- ti jamkový rezervoár na médium - P-Lab a.s., Česká republika
sterilní zkumavky - P-Lab a.s., Česká republika
stojany na zkumavky - P-Lab a.s., Česká republika
očkovací kličky - P-Lab a.s., Česká republika
Bürkerovy komůrky - P-Lab a.s., Česká republika

3.1.2. Přístroje

laminární box ESCO class ll type 2 – Dynex laboratories, s.r.o., Česká republika
termostat Binder – Fisher Scientific s.r.o., Česká republika
mikroskop Olympus BX 40 – Olympus Czech Group s.r.o., Česká republika
vortex – Dynex laboratories, s.r.o., Česká republika

3.1.3. Chemikálie

RPMI 1640 – Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika
MOPS (3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina) – Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika
DMSO (dimetylsulfoxid) – Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika
glukóza – Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika
NaOH (hydroxid sodný) – Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika
sterilní voda – příprava z MilliQ deionizované vody autoklávováním

3.1.4. Modelové kmeny kvasinek a vláknitých hub

Testování potenciální antimykotické aktivity se provádělo na 8 kmenech kvasinek a vláknitých hub (viz. Tab. 6).

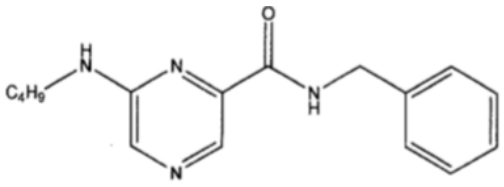
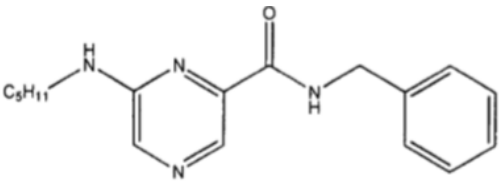
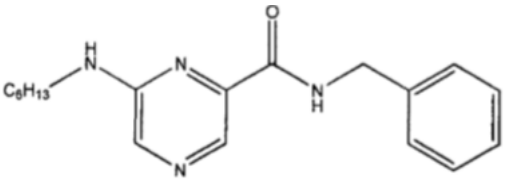
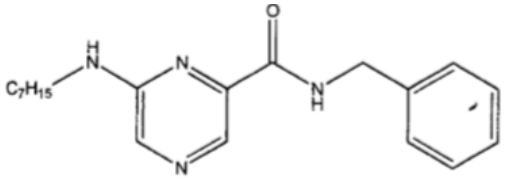
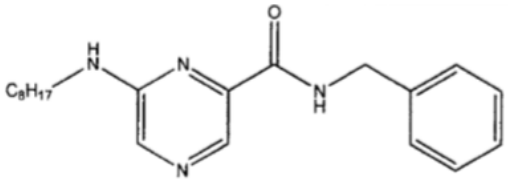
Tab. 6: Modelové kmeny hub, jejich sbírkové kódy a zavedené zkratky

	MODELOVÝ KMEN	KÓD	ZKRATKA
KVASINKY	*Candida albicans*	ATCC 44859	CA
	Candida tropicalis	156	CT
	Candida krusei	E28	CK
	Candida glabrata	20/I	CG
	Trichosporon asahii	1188	TA
VLÁKNITÉ HOUBY	*Aspergillus fumigatus*	231	AF
	Absidia corymbifera	272	AC
	Trychophyton mentagrophytes	445	TM

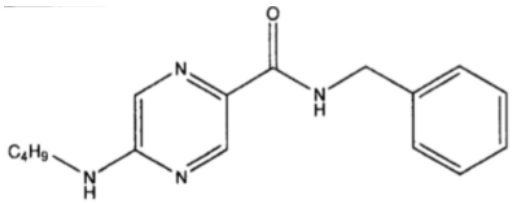
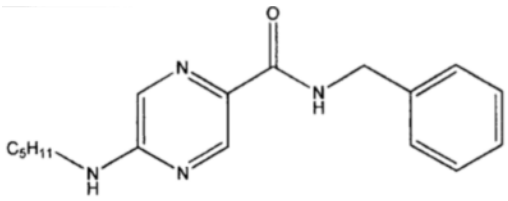
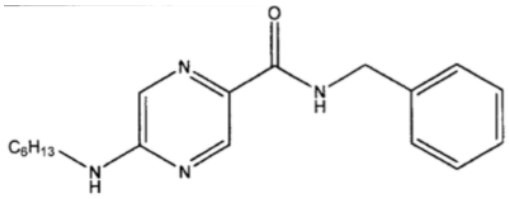
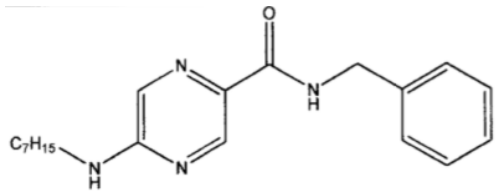
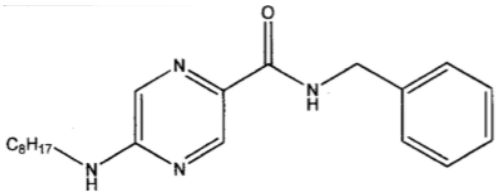
3.1.5. Testované látky

V rámci své diplomové práce jsem testovala třicet látek poskytnutých Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze. Testované látky byly odvozeny od derivátů pyrazin-2-karboxamidu a derivátů pyrazinu-2,3-dikarbonitrilu. Jejich chemická struktura, molekulová hmotnost, a také kód, pod kterým byly v rámci experimentů vedeny, je uvedena v následujících tabulkách (viz. Tab. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

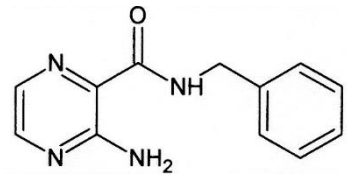
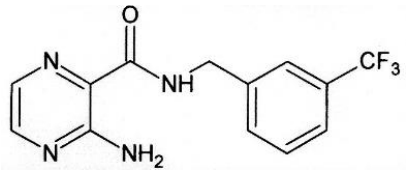
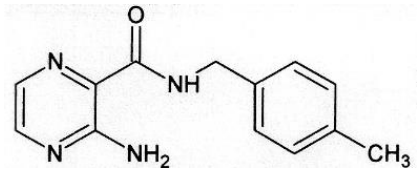
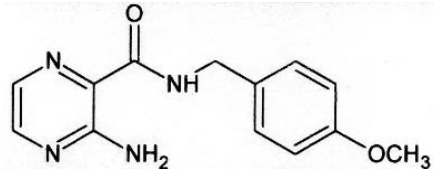
Tab. 7: Deriváty N-benzyl-6-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
BS 78 N-benzyl-6-(butylamino)pyrazin-2-karboxamid		284,36
BS 79 N-benzyl-6-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid		298,38
BS 80 N-benzyl-6-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid		312,41
BS 81 N-benzyl-6-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid		326,44
BS 82 N-benzyl-6-(octylamino)pyrazin-2-karboxamid		340,46

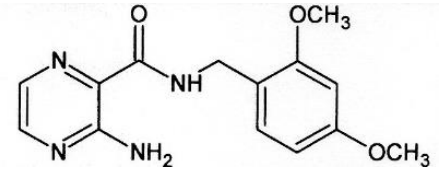
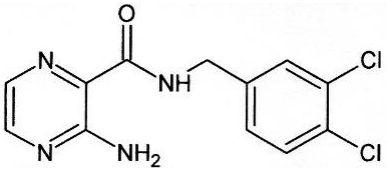
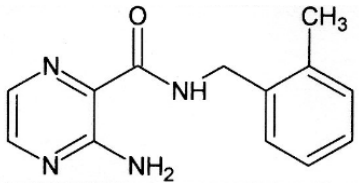
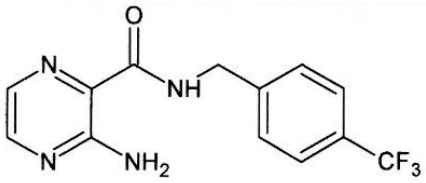
Tab. 8: Deriváty N-benzyl-5-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
BS 83 N-benzyl-5-(butylamino)pyrazin-2-karboxamid		284,36
BS 84 N-benzyl-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid		298,38
BS 85 N-benzyl-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid		312,41
BS 86 N-benzyl-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid		326,44
BS 87 N-benzyl-5-(octylamino)pyrazin-2-karboxamid		340,46

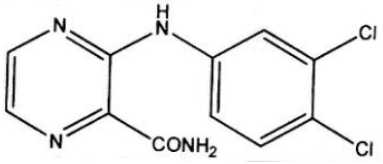
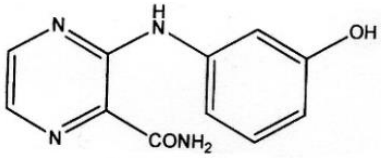
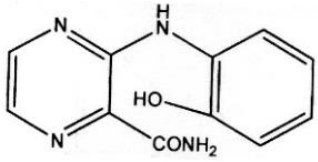
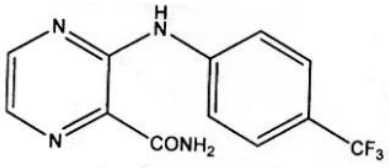
Tab. 9: Deriváty 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu I.

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
LS1MD/II 3-amino-N-benzyl pyrazin-2-karboxamid		228,25
MD706/II 3-amino-N-[3-(trifluormethyl)benzyl] pyrazin-2-karboxamid		296,25
MD707/II 3-amino-N-(4-methylbenzyl) pyrazin-2-karboxamid		242,28
MD708/II 3-amino-N-(4-methoxylbenzyl) pyrazin-2-karboxamid		258,28

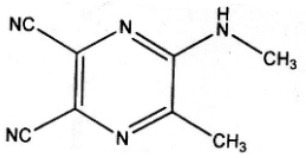
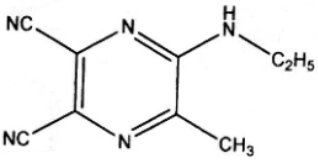
Tab. 10: Deriváty 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu II.

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
MD709/II 3-amino-N-(2,4-dimethoxylbenzyl) pyrazin-2-karboxamid		297,14
MD710/II 3-amino-N-(3,4-dichlorbenzyl) pyrazin-2-karboxamid		288,30
MD711/II 3-amino-N-(2-methylbenzyl) pyrazin-2-karboxamid		242,28
MD712/II 3-amino-N-[4-(trifluormethyl)benzyl] pyrazin-2-karboxamid		296,25

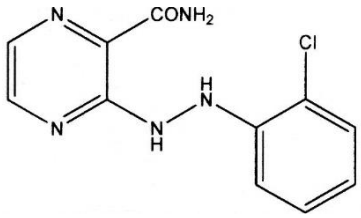
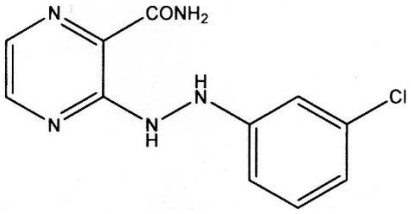
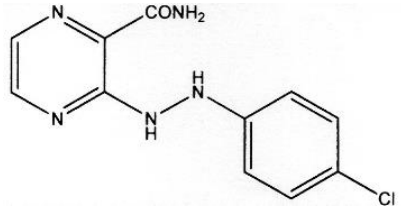
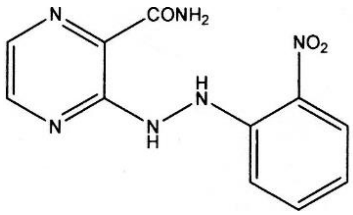
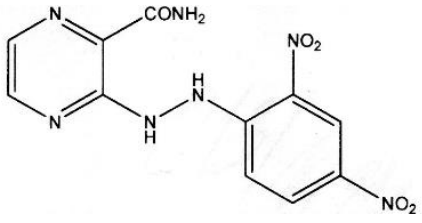
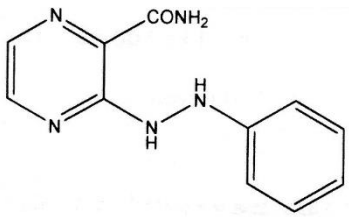
Tab. 11: Deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
OJ 34 3-[(3,4-dichlorfenyl)amino] pyrazin-2-karboxamid		283,11
OJ 36 3-[(3-hydroxyfenyl)amino] pyrazin-2-karboxamid		230,22
OJ 41 3-[(2-hydroxyfenyl)amino] pyrazin-2-karboxamid		230,22
OJ 42 3-{[4-(trifluormethyl)fenyl] amino}pyrazin-2-karboxamid		282,22

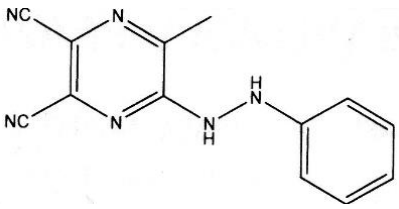
Tab. 12: Deriváty 5-alkyl-6-alkylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
OJ 80 5-methyl-6-(methylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril		173,17
OJ 81 5-(ethylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril		187,20

Tab. 13: Deriváty 3-hydrazinylpyrazin-2-karboxamidu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
OJ 75 3-[2-(2-chlorfenyl) hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamid		263,68
OJ 76 3-[2-(3-chlorfenyl) hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamid		263,68
OJ 77 3-[2-(4-chlorfenyl) hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamid		263,68
OJ 78 3-[2-(2-nitrofenyl) hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamid		274,24
OJ 79 3-[2-(2,4dinitrofenyl) hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamid		319,23
OJ 16 3-(2-fenylhydrazinyl) pyrazin-2-karboxamid		229,24

Tab. 14: Derivát 5-alkyl-6-hydrazinylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KÓD CHEMICKÝ NÁZEV	STRUKTURA	MOLEKULOVÁ HMOTNOST
OJ 15 5-methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril		250,26

3.2. Pracovní postup

3.2.1. Příprava růstového média

Růstové médium připravíme tak, že k 4 dílům pufru MOPS s 2% glukózy přidáme 1 díl média RPMI 1640 (např. 80 ml MOPS + 20ml RPMI). Celkový objem pak záleží na spotřebě, respektive na počtu modelových kmenů. Poté se pomocí několika kapek 10 M NaOH upraví pH do rozmezí 6,5 – 7,9. Úpravou pH dojde ke změně barvy roztoku z původní žluté na oranžovo-červenou. RPMI 1640 je 5x koncentrovaný růstový bujón, který obsahuje L-glutamin a 2% glukózu. Pufr MOPS je 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina.

3.2.2. Příprava suspenzí modelových kmenů

8 sterilních zkumavek popíšeme zkratkami modelových kmenů: CA, CT, CK, CG, TA, AF, AC, TM.

Do každé zkumavky se napipetuje po 3 ml sterilní vody. Poté se z jednotlivých kultur kvasinek, které narostly na Sabouraudově glukózovém agaru, odebere malá část kolonie a resuspenduje se do sterilní vody ve zkumavce. Suspenze se promíchá na vortexu. Do Bürkerovy komůrky se napipetuje 12 µl této suspenze a určuje se počet buněk na 100 čtverců při zvětšení 200x. Vhodná hustota inokula je 1,0 – 2,5 x 10^5 cfu/ml, což v Bürkerově komůrce činí 25 – 50 buněk na 50 čtverců. U vláknitých hub je to podobné, jen vhodná hustota inokula je 50 – 100 buněk na 100 čtverců. Takto připravené suspenze vydrží v lednici asi týden.

3.2.3. Příprava ředící řady testované látky

Pro přípravu ředící řady je nezbytné dodání testované látky spolu s informací o navážce a molekulové hmotnosti dané látky. Jako rozpouštědlo pro přípravu roztoků testovaných látek se použil dimethylsulfoxid (DMSO).

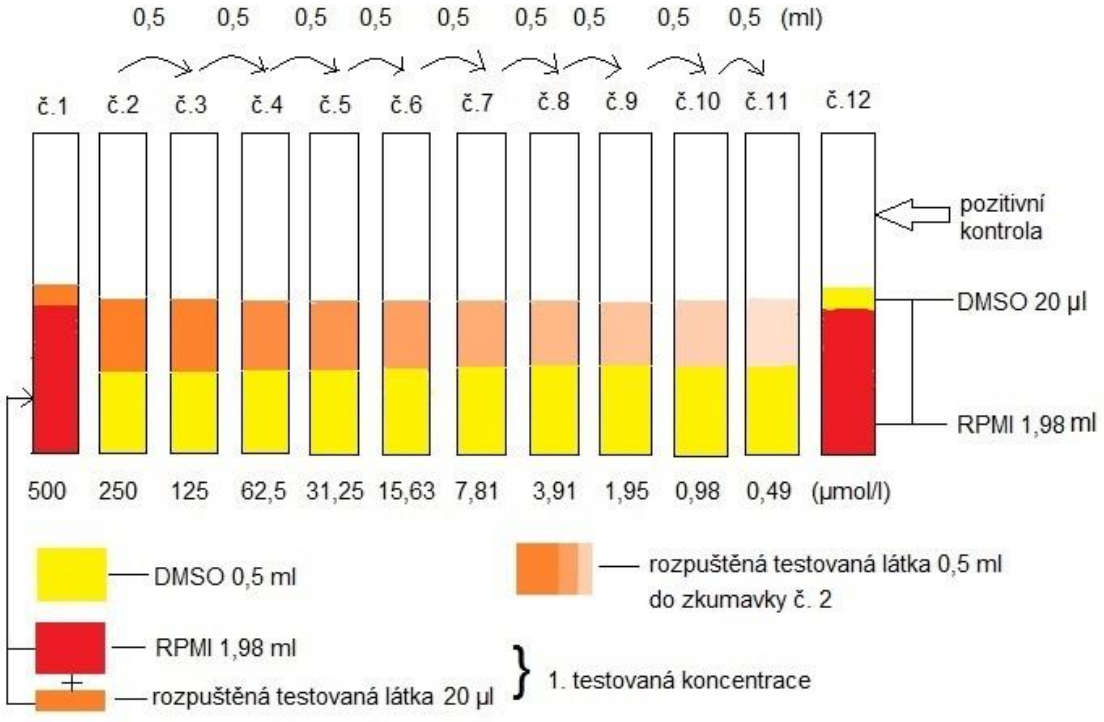
Vlastní postup je takový, že navážka testované látky se rozpustí v příslušném objemu DMSO, tak aby cílová koncentrace činila 500 µmol/l.

Do první zkumavky se napipetuje 1,98 ml RPMI růstového média a 20 µl rozpuštěné testované látky o koncentraci 500 µmol/l, a vše se řádně promíchá se na vortexu. Tímto se vytvoří roztok o koncentraci testované látky 100 krát koncentrovanější, který je následně ředěn dvojkovým ředěním v DMSO za účelem získání roztoků v koncentračním sledu: (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488) µmol/l.

Pokud dojde v některém z kroků k vysrážení nebo se látka nerozpustí, přidává se 2. případně 3. ekvivalent rozpouštědla. Přidáním ekvivalentu rozpouštědla se pak v konečné fázi první testovaná koncentrace posune o jedno ředění dozadu, z 500 µmol/l na 250 µmol/l apod.

Tento roztok se přemístí do 1. jamky 12- ti jamkového rezervoáru. Do dalších deseti zkumavek popsaných čísly 2 – 11 se napipetuje DMSO o objemu 0,5 ml. Z první jamky rezervoáru, kde je roztok testované látky, se odpipetuje 0,5 ml, přenese do zkumavky č.:2 a vše se řádně promíchá na vortexu. Ze zkumavky č.: 2 se následně přenese 0,5 ml roztoku do zkumavky č.: 3, opět se vše promíchá na vortexu a v tomto trendu pokračujeme až ke zkumavce č.: 11 (viz. Obr. 13).

Obr. 13: Schéma přípravy dvojkové ředící řady



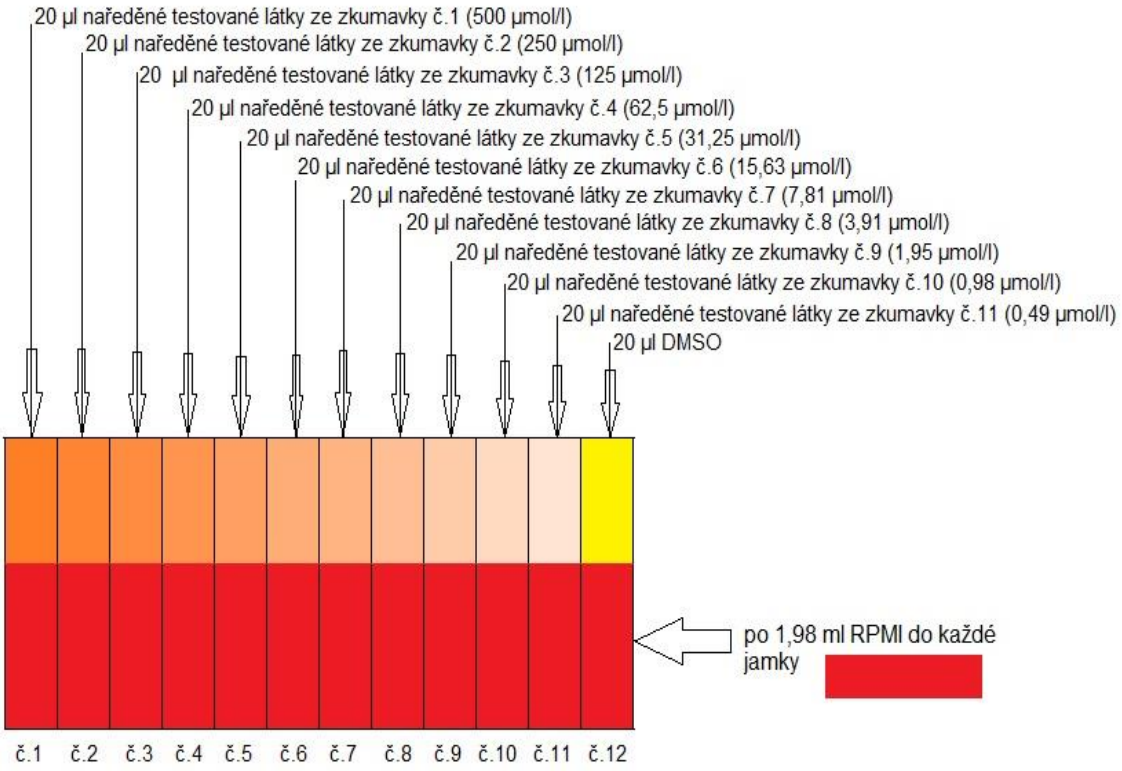
Legenda: DMSO: dimethylsulfoxid; RPMI: růstové médium

Jamky rezervoáru, které zbyly, se naplní 1,98 ml růstového média a do jednotlivých jamek se přidá po 20 µl příslušné koncentrace testované látky, tedy do jamky rezervoáru č.:2 se přidá po 20 µl ze zkumavky č.:2 atd.

Do poslední jamky rezervoáru se k růstovému médiu přidává pro kontrolu jen 20 µl DMSO.

V každé jamce rezervoáru se získají 2 ml roztoku s příslušnou koncentrací (jamky č.: 1-11) a kontrola (jamka č.: 12), (viz. Obr. 14).

Obr. 14: Schéma 12- ti jamkového rezervoáru a jeho obsah



Legenda: DMSO: dimethylsulfoxid; RPMI: růstové médium

Objem potřebný pro vytvoření zásobního roztoku lze vypočíst dle následujícího vzorce: V_{DMSO}= m x 10^6 / c x M x 100 = x µl DMSO, kde
m - navážka testované látky (g), c - 1. testovaná koncentrace (500 µmol/l), M - molární hmotnost testované látky x 10^6 (převod na µl), 100 – koeficient zakoncentrování

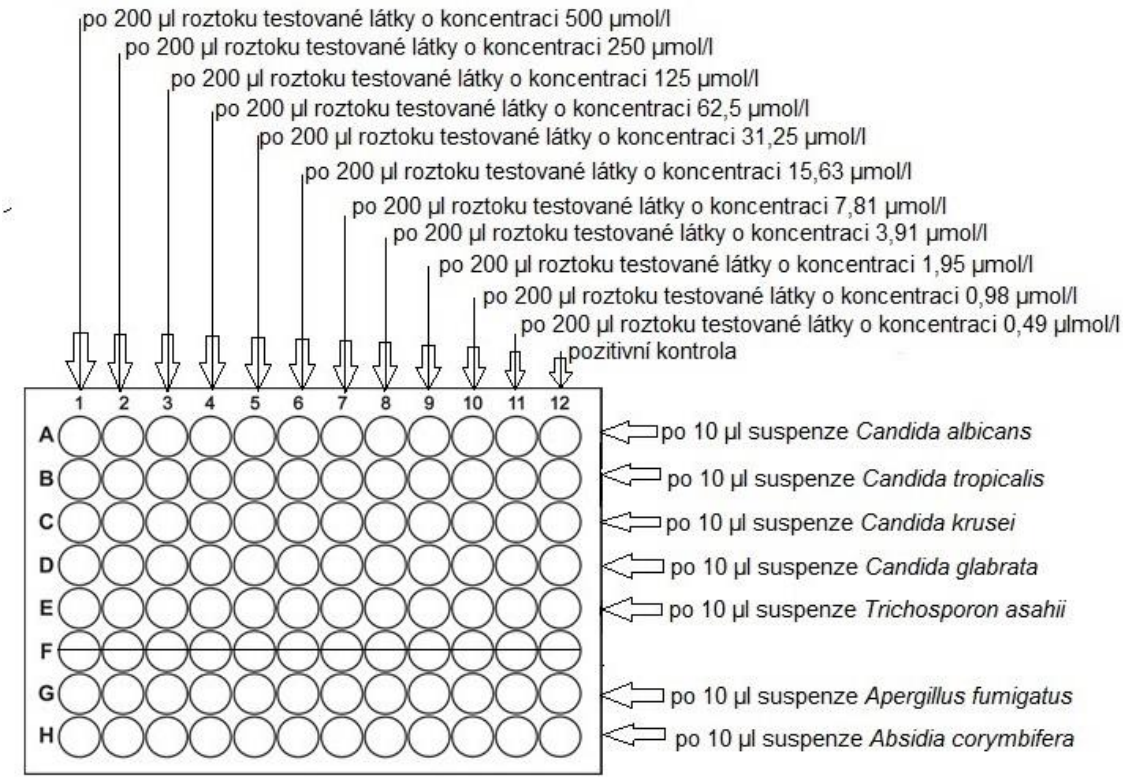
3.2.4. Naplnění mikrotitračních destiček

Nakonec se provede samotné pipetování do dvou mikrotitračních destiček. Druhá destička slouží pro testování *Trychophyton mentagrophytes*, tento dermatofyt se pro svou citlivost testuje zvlášť.

Řádky destiček jsou označeny písmeny A, B, C, D, E, G, H. Destička je tvořena 12 sloupci. Do každého řádku, kromě řádku F, se přenese z 12- ti jamkového rezervoáru pomocí multikanálové pipety po 200 µl příslušného roztoku. Tedy, vždy ve všech jamkách sloupce č. 1 je roztok testované látky o

cílové koncentraci 500 µmol/l, v jamkách sloupce č. 2 je 250 µmol/l, v jamkách sloupce č. 3 je 125 µmol/l, v jamkách sloupce č. 4 je 62,5 µmol/l, v jamkách sloupce č. 5 je 31,25 µmol/l, v jamkách sloupce č. 6 je 15,625 µmol/l, v jamkách sloupce č. 7 je 7,813 µmol/l, v jamkách sloupce č. 8 je 3,906 µmol/l, v jamkách sloupce č. 9 je1,953 µmol/l, v jamkách sloupce č. 10 je 0,977 µmol/l, v jamkách sloupce č. 11 je 0,488 µmol/l (viz. Obr. 15).

Obr. 15: Schéma pipetáže první mikrotitrační destičky



U druhé destičky počet naplněných řádků je závislý na počtu testovaných látek, např.: pokud se testují tři látky, plní se řádky A, B a C.

První sloupec každé destičky je sloupec s testovanou látkou o nejvyšší koncentraci, jedenáctý sloupec je sloupec o nejnižší koncentraci a dvanáctý sloupec slouží pro kontrolu růstu testovaného mikroorganismu.

Poté se přidávají suspenze modelových kmenů hub. Aby nedošlo k přerůstání plísní, nechává se mezi plísněmi a kvasinkami volný řádek. Všechny připravené suspenze se pipetují v množství po 10 µl.

Do každého řádku A se přidá suspenze *Candida albicans*, CA, ATCC 44859; řádku B suspenze *Candida tropicalis*, CT, 156; řádku C suspenze *Candida krusei*, CK, E28; řádku D suspenze *Candida glabrata*, CG, 20/l; řádku E suspenze *Trichosporon asahii*, TB, 1188; řádku G suspenze *Aspergillus fumigatus*, AF, 231; řádku H suspenze *Absidia corymbifera*, AC, 272. Do řádků druhé destičky se pipetuje po 10 µl suspenze *Trichophyton mentagrophytes*, TM, 445. Po napipetování se destičky uzavřou víčkem a nechají se inkubovat v termostatu při teplotě 35°C. První destička se nechá inkubovat 48 hodin, druhá destička se nechá inkubovat 120 hodin. Výsledky u první destičky se vizuálně odečítají za 24 – 48 hodin, u druhé destičky se výsledky vizuálně odečítají za 72 – 120 hodin. Po uplynutí inkubační doby se vizuálně porovnává růst v jamkách s růstem v jamce, která obsahuje jen samotné DMSO.

3.2.5. Vyhodnocení

Po uplynutí stanoveného času se vizuálně odečítala první čirá jamka bez zákalu, kde již nic neroste. Je dobré mít na paměti, že vizuální hodnocení nabízí spíše odhad a přesnějšího stanovení bychom mohli dosáhnout pomocí denzitometrického odečtu zákalu v jamkách spektrofotometrickým měřením.

4. Výsledky

Ze skupiny derivátů N-benzyl-6-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu vykazovaly antifungální aktivitu látky v námi testovaném koncentračním rozmezí pouze látky s pracovním označením BS78 a BS79. První látka, N-benzyl-6-(butylamino)pyrazin-2-karboxamid (BS78), byla účinná na modelových kmenech *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, a to při nejnižší koncentraci, která se rovnala 500 μmol/l. Tato koncentrace byla stejná při odečítání jak za 24 hodin, tak za 48 hodin. *Trichophyton mentagrophytes* vykazoval po odečtu po 72 a 120 hodinové inkubaci stejnou citlivost vůči BS78 jako výše zmíněné kmeny.

Druhá látka, N-benzyl-6-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid (BS79), projevila aktivitu na kmenech *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*. U *Absidia corymbifera* po 24 hodinové inkubaci činila MIC 250 mol/l, u *Trichophyton mentagrophytes* po 72 hodinové inkubaci činila MIC 125 μmol/l. Další látky z této skupiny nevykazovaly žádnou antifungální aktivitu (viz. Tab. 15).

Tab. 15: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů N-benzyl-6-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)				
		BS78	BS79	BS80	BS81	BS82
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	**500**	>500	>500	>500	>500
	48 h	**500**	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	**500**	**250**	>500	>500	>500
	48 h	**500**	>500	>500	>500	>500
TM	72 h	**500**	**125**	>500	>500	>500
	120 h	**500**	>500	>500	>500	>500

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

U skupiny derivátů N-benzyl-5-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu žádná látka v rozsahu testovaných koncentrací neprojevila antimykotickou aktivitu (viz. Tab. 16).

Tab. 16: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů N-benzyl-5-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)				
		BS 83	BS 84	BS 85	BS 86	BS 87
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72 h	>500	>500	>500	>500	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

U všech látek ze skupiny derivátů 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu, kromě látky MD 710/ll, byla pozorována určitá antimykotická aktivita (viz. Tab. 17a, 17b).

Látka 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamid (LS1MD/ll) vykazovala aktivitu při interakci s houbovými kmeny *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon asahii* a *Trichophyton mentagrophytes*. MIC 500 μmol/l byla stanovena u *Candida albicans* jak po 24, tak i 48 hodinové inkubaci. Stejná hodnota MIC byla stanovena u *Candida tropicalis* a *Trichosporon asahii* po 48 hodinové inkubaci a u *Trichophyton mentagrophytes* po 72 a 120 hodinové inkubaci. U *Candida tropicalis* a *Trichosporon asahii* činila hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci 250 μmol/l.

Látka 3-amino-N-[3-(trifluormethyl)benzyl]pyrazin-2-karboxamid (MD706/ll) vykazovala antifungální aktivitu při interakci s houbovými kmeny *Candida krusei, Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes.* Nejnižší koncentrace, která se rovnala 500 μmol/l byla stanovena u *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* po 24 hodinové inkubaci, u *Absidia corymbifera* po 24 a 120 hodinové inkubaci. Po 24 hodinové inkubaci u *Candida krusei* 250 μmol/l, této hodnoty MIC bylo dosaženo i u *Trichophyton mentagrophytes* po 72 hodinové inkubaci, po 120 hodinové inkubaci u tohoto kmene byla stanovena MIC 62,5 μmol/l.

Látka 3-amino-N-(4-methylbenzyl)pyrazin-2-karboxamid (MD707/ll) projevila antimykotickou aktivitu s houbovými kmeny *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* a *Trichophyton mentagrophytes.* Hodnota MIC 500 μmol/l byla stanovena u *Trichosporon asahii* po 24 hodinové inkubaci a u *Trychophyton mentagrophytes* po 120 hodinové inkubaci. U *Candida albicans* a *Candida tropicalis* po 24 a 48 hodinové inkubaci činila hodnota MIC 250 μmol/l, tato koncentrace byla stejná i u kmenů *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Trichophyton mentagrophytes* po 24 hodinové inkubaci.

Látka 3-amino-N-(4-methoxybenzyl)pyrazin-2-karboxamid (MD708/ll) byla antimykoticky účinná na modelových kmenech *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii* a *Aspergillus fumigatus*, a to při koncentraci, která se rovnala 500 μmol/l po 24 hodinové inkubaci, *Trichophyton mentagrophytes* vykazoval po 72 a 120 hodinové inkubaci stejnou citlivost.

Látka 3-amino-N-(2,4-dimethoxybenzyl)pyrazin-2-karboxamid (MD709/ll) projevila slabou antimykotickou aktivitu v námi testovaném koncentračním rozmezí na kmeni *Candida krusei* při koncentraci 500 µmol/l po 24 hodinové inkubaci.

Látka 3-amino-N-(2-methylbenzyl)pyrazin-2-karboxamid (MD711/ll) byla účinná na modelových kmenech *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* , a to při koncentraci, která se rovnala 500 µmol/l po odečtu po 24 hodinové inkubaci. *Trychophyton mentagrophytes* vykazoval stejnou citlivost po 120 hodinové inkubaci. U *Trichophyton mentagrophytes* po 72 hodinové inkubaci činila MIC 250 µmol/l. U *Trichosporon asahii* činila MIC 125 µmol/l jak po 24, tak po 48 hodinové inkubaci.

Látka 3-amino-N-[4-(trifluormethyl)benzyl]pyrazin-2-karboxamid (MD712/ll) v námi testovaném koncentračním rozmezí projevila antimykotickou aktivitu. MIC 500 µmol/l byla stanovena u *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* po 24 a 48 hodinové inkubaci, stejnou citlivost vykazovala *Candida krusei* pouze po 48 hodinovém odečtu a stejnou citlivost vykazoval i *Trichophyton mentagrophytes* po odečtu po 120 hodinové inkubaci. U *Trychophyton mentagrophytes* po 72 hodinové inkubaci činila hodnota MIC 125 µmol/l. MIC 250 µmol/l byla stanovena u *Candida krusei* po 24 hodinové inkubaci.

Tab. 17a: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu I.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)			
		LS1MD/II	MD706/II	MD707/II	MD708/II
CA	24 h	**500**	>500	**250**	>500
	48 h	**500**	>500	**250**	>500
CT	24 h	**250**	>500	**250**	**500**
	48 h	**500**	>500	**250**	>500
CK	24 h	>500	**250**	**250**	**500**
	48 h	>500	>500	>500	>500
CG	24 h	>500	>500	**250**	**500**
	48 h	>500	>500	>500	>500
TA	24 h	**250**	**500**	**500**	**500**
	48 h	**500**	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	**500**	**250**	**500**
	48 h	>500	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	**500**	>500	>500
	48 h	>500	**500**	>500	>500
TM	72 h	**500**	**62,5**	**250**	**500**
	120 h	**500**	**250**	**500**	**500**

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

Tab. 17b: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu II.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)			
		MD709/II	MD710/II	MD711/II	MD712/II
CA	24 h	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500
CK	24 h	**500**	>500	**500**	**250**
	48 h	>500	>500	>500	**500**
CG	24 h	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500
TA	24 h	>500	>500	**125**	**500**
	48 h	>500	>500	**125**	**500**
AF	24 h	>500	>500	**500**	**500**
	48 h	>500	>500	>500	**500**
AC	24 h	>500	>500	**500**	**500**
	48 h	>500	>500	>500	**500**
TM	72 h	>500	>500	**250**	**125**
	120 h	>500	>500	**500**	**500**

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

Ze skupiny derivátů 3-aminopyrazin-2-karboxamidu *Trichophyton mentagrophytes* vykazoval po odečtu po 72 a 120 hodinové inkubaci vůči OJ 36 a OJ 41 (viz. Tab. 18), hodnota MIC činila 500 µmol/l.

Tab. 18: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 3-aminopyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (µmol/l)			
		OJ 34	OJ 36	OJ 41	OJ 42
CA	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
CT	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
CK	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
CG	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
TA	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
AF	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
AC	24 h	>125	>500	>500	>125
	48 h	>125	>500	>500	>125
TM	72 h	>125	**500**	**500**	>125
	120 h	>125	**500**	**500**	>125

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

U této skupiny derivátů 5-alkyl-6-alkylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu látky nevykazovaly žádnou antifungální aktivitu, v rozsahu testovaných koncentrací nedošlo k výrazné inhibici růstu (viz. Tab. 19)

Tab. 19: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 5-alkyl-6-alkylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)	
		OJ 80	OJ 81
CA	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
CT	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
CK	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
CG	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
TA	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
AF	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
AC	24 h	>500	>500
	48 h	>500	>500
TM	72 h	>500	>500
	120 h	>500	>500

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

Ze skupiny derivátů 3-hydrazinylpyrazin-2-karboxamidu vykazovaly antifungální aktivitu látky v námi testovaném koncentračním rozmezí pouze látky s pracovním označením OJ 75, OJ 76, OJ 16 (viz. Tab. 20).

První látka 3-[2-(2-chlorfenyl)hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamidu (OJ 75) byla účinná na modelových kmenech *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera*, a to při koncentraci 500 μmol/l po odečtu po 24 hodinové inkubaci, stejnou citlivost vykazovala *Absidia corymbifera* i po 48 hodinové inkubaci. I *Trychophyton mentagrophytes* vykazoval stejnou citlivost a to jak po 72, tak 120 hodinové inkubaci.

Slabá *in vitro* aktivita se projevila u látky 3-[2-(3-chlorfenyl)hydrazinyl]pyrazin-2-karboxamidu (OJ 76) na modelových kmenech *Candida albicans* a *Candida krusei*, a to při koncentraci 500 μmol/l po 24 hodinové inkubaci, stejná hodnota MIC byla stanovena u *Trichophyton mentagrophytes* po odečtu jak po 72, tak po 120 hodinové inkubaci. U *Aspergillus fumigatus* činila MIC po 24 hodinové inkubaci 250 μmol/l. MIC 125 μmol/l byla stanovena u *Absidia corymbifera* po 24 hodinové inkubaci.

Látka 3-(2-fenylhydrazinyl)pyrazinu-2-karboxamid byla účinná v našem testovaném koncentračním rozmezí při koncentraci 500 μmol/l u modelového kmene *Trichosporon asahii* po 24 a 48 hodinové inkubaci, u *Absidia corymbifera* se projevila stejná citlivost po 24 hodinové inkubaci. Stejnou citlivost projevil *Trychophyton mentagrophytes* po 72 a 120 hodinové inkubaci.

Tab. 20: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 3-hydrazinylpyrazin-2-karboxamidu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)					
		OJ 75	OJ 76	OJ 77	OJ 78	OJ 79	OJ 16
CA	24 h	**500**	**500**	>250	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
CK	24 h	**500**	**500**	>250	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
CG	24 h	**500**	>500	>250	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
TA	24 h	**500**	>500	>250	>125	>500	**500**
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	**500**
AF	24 h	**500**	**250**	>250	>125	>500	>500
	48 h	>500	>500	>250	>125	>500	>500
AC	24 h	**500**	**125**	>250	>125	>500	**500**
	48 h	**500**	**250**	>250	>125	>500	>500
TM	72 h	**500**	**500**	>250	>125	>500	**500**
	120 h	**500**	**500**	>250	>125	>500	**500**

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

Nejvýraznější antimykotickou aktivitu vykazovala u kvasinek a vláknitých hub současně látka 5-methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (viz. Tab. 21). Tato látka byla účinná na všech modelových kmenech v námi testovaném koncentračním rozmezí. *Trichophyton mentagrophytes* vykazoval vůči této látce z těchto modelových kmenů nejnižší citlivost, hodnota MIC činila po 72 a 120 hodinové inkubaci 500 µmol/l.

U *Candida tropicalis*, *Trichosporon asahii* a *Candida glabrata* činila hodnota MIC 62,5 µmol/l po 24 hodinové inkubaci, *Candida glabrata* vykazovala stejnou citlivost i při 48 hodinové inkubaci. V případě *Candida tropicalis*, druhá stanovená hodnota MIC po 48 hodinové inkubaci činila 250 µmol/l a v případě *Trichosporon asahii* druhá stanovená hodnota MIC činila 125 µmol/l.

Látka byla rovněž účinná na modelových kmenech *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* , a to v koncentraci 31,25 µmol/l po 24 a 48 hodinové inkubaci, *Candida albicans* vykazovala stejnou citlivost po 48 hodinové inkubaci, *Aspergillus fumigatus* stejné citlivosti nabyl po 24 hodinové inkubaci. V případě *Candida albicans* hodnota MIC po 24 hodinové inkubaci činila 15,62 µmol/l a v případě *Aspergillus fumigatus* hodnota MIC po 48 hodinové inkubaci činila 52,5 µmol/l.

Nejvýraznější antimykotickou aktivitu v námi testovaném koncentračním rozmezí jevila tato látka vůči *Candida krusei* a to v koncentraci, která se rovnala 3,9 µmol/l po 24 hodinové inkubaci a po 48 hodinové inkubaci hodnota MIC činila 7,81 µmol/l.

Tab. 21: Výsledky minimální inhibiční koncentrace derivátů 5-alkyl-6-hydrazinylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)	
		OJ 15	
CA	24 h	**15,62**	
	48 h	**31,25**	
CT	24 h	**62,5**	
	48 h	**250**	
CK	24 h	**3,9**	
	48 h	**7,81**	
CG	24 h	**62,5**	
	48 h	**62,5**	
TA	24 h	**62,5**	
	48 h	**125**	
AF	24 h	**31,25**	
	48 h	**52,5**	
AC	24 h	**31,25**	
	48 h	**31,25**	
TM	72 h	**500**	
	120 h	**500**	

Legenda: CA: *Candida albicans;* CT: *Candida tropicalis;* CK: *Candida krusei;* CG: *Candida glabrata*; TA: *Trichosporon asahii*; AF: *Aspergillus fumigatus*; AC: *Absidia corymbifera*; TM: *Trichophyton mentagrophytes*; MIC: minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace

5. Diskuze

Obecně se u mikroorganismů postupně vyvinuly a neustále vyvíjejí mnohočetné způsoby, kterými dokáží přežít v hostitelském prostředí. Svými obrannými mechanismy jsou tak schopné odolávat působení antimikrobiálních látek. Tyto mikroorganismy se pak stávají rezistentními či odolnými [43].

Se zvyšujícím se počtem mykotických onemocnění a zvyšujícím se používáním antimykotických léčiv stoupá problém rezistence k antimykotickým látkám. Skutečnost, že rezistence narůstá i k nejpoužívanějším antimykotikům, konkrétně azolovým, dosti komplikuje situaci, jak dosáhnout efektivní léčby mykotických onemocnění [46]. Rezistence k lékům se neustále stupňuje. Rozvoj rezistence se nedá potlačit, ale mnohdy se dá alespoň trochu ovlivnit.

Z tohoto důvodu je zde neutuchající výzva přivést na trh a do klinické praxe další látky, které by byly dostatečně účinné v terapii mykoinfekcí. Je tedy nezbytné a žádoucí věnovat se výzkumu a zároveň testování nových antimykoticky působících látek, které by se daly použít hlavně u obtížně léčitelných systémových infekcí.

Každá nově nasyntetizovaná látka je určena k testování a pro každou takovouto látku existuje vhodná skríninková metoda, kterou se testuje její aktivita a účinnost. Příkladem takovéto metody je bujónová mikrodiluční metoda. Jde o metodu, kterou se stanovuje antimykotická aktivita *in vitro* potenciálně antimykotických látek na standartních kmenech kvasinek a vláknitých hub. Mikrodiluční metoda je kvantitativním testem, která dovoluje určit minimální hodnotu koncentrace, vůči které je daný mikroorganismus citlivý. Testování probíhá za standartních přesně definovaných podmínek, kdy po dostatečně dlouhé inkubaci se určuje inhibice růstu mikroorganismu, který je vystaven působení antimikrobní látky v určitém sledu [43]. I já jsem využila tuto metodu k testování antimykotické aktivity u nově syntetizovaných látek.

Nově nasyntetizované látky byly poskytnuty Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, ve spolupráci s prof. PharmDr. Martinem Doležalem, Ph.D., Mgr. Ondřejem Janďourkem a Mgr. Barborou Servusovou. Nově nasyntetizované látky poskytnuté k testování měly charakter derivátů pyrazin-2-

karboxamidu a derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, ale úplný základ těchto látek vychází z molekuly pyrazinamidu, antituberkulotika 1. linie. Od konce 50. let dvacátého století je struktura pyrazinamidu velmi často používanou předlohovou látkou [9]. Jedná se totiž o látku s širokým spektrem účinku. Pyrazinamid je charakterizován svým antimykobakteriálním, antimykotickým, antibakteriálním, antivirovým, analgetickým, hypnotickým, či diuretickým účinkem [12].

Vývoji látek na pyrazinamidové bázi se věnuje tým vedený prof. PharmDr. Martinem Doležalem (dolezalm@faf.cuni.cz) z Katedry farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a troufám si říci, že velmi úspěšně. Tyto látky jsou neustálým předmětem výzkumu, přinejmenším proto, že testováním různě substituovaných derivátů pyrazinamidu se již zjistilo, že mají potenciál být účinnými antimykoticky působícími látkami. O tom svědčí vydání několika publikací věnovaných tomuto tématu [11, 23, 42]. I já osobně jsem se mohla přesvědčit o tom, že deriváty pyrazin-2-karboxamidu a deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu vycházející z pyrazinamidové struktury, jsou velmi nadějnou skupinou látek a antimykotickou aktivitou.

Zmínila bych zejména jednu látku, která má velký potenciál stát se novým a účinným léčivem. Jedná se o látku s názvem 5- methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril s pracovním označením OJ15. Tato látka jevila výraznou antimykotickou aktivitu ke všem modelovým kmenům, kde bylo dosahováno velmi zajímavých a velmi slibných hodnot MIC. Nejúčinnější tento derivát byl na modelovém kmeni *Candida krusei*, nejméně na modelovém kmeni *Trichophyton mentagrophytes*. Dále bych zmínila další látky, které vykazovaly poměrně slibnou antimykotickou aktivitu v rozsahu námi testovaných koncentrací. Kupříkladu látka s pracovním označením MD706/II projevila výraznější antimykotickou aktivitu na kmeni *Trichophyton mentagrophytes*. Za zmínku stojí i látka s pracovním označením MD711/II, která byla účinná pro změnu na kmeni *Trichosporon asahii*.

Tyto látky si vzhledem ke zjištěným výsledkům zaslouží další pozornost. Jejich aktivita by měla být i nadále testována v rámci pokročilejšího studia, než je pouze základní skrínink jejich antimykotické aktivity pomocí mikrodiluční bujónové metody. Látky s výraznější antimykotickou aktivitou jistě budou v brzké době dle mého názoru publikovány.

6. Závěr

Pomocí mikrodiluční bujónové metody se u třiceti látek, syntetizovaných prof. PharmDr. Martinem Doležalem, Ph.D., Mgr. Ondřejem Janďourkem a Mgr. Barborou Servusovou na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, testovala antimykotická aktivita na osmi modelových kmenech hub. K testování bylo použito pět kmenů kvasinek: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Trichosporon asahii* a tři kmeny vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichosporon mentagrophytes*.

Testovanými látkami byly substituované deriváty pyrazin-2-karboxamidu a pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Konkrétně deriváty N-benzyl-6-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu (BS78, BS79) a deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxamidu (OJ36, OJ41) projevily v námi testovaném koncentračním rozmezí jistou antimykotickou aktivitu vůči modelovým kmenům.

U derivátů N-benzyl-5-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidu a u derivátů 5-alkyl-6-alkylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu nebyla v námi testovaném koncentračním rozmezí zaznamenána žádná antimykotická aktivita.

Některé látky (OJ75, OJ76, OJ16) ze skupiny derivátů 3-hydrazinylpyrazin-2-karboxamidu v námi testovaném koncentračním rozmezí projevily slabou *in vitro* antimykotickou aktivitu vůči modelovým kmenům.

Deriváty 3-amino-N-benzylpyrazin-2-karboxamidu, mimo jedné látky (MD710/ll), vykazovaly slabou antimykotickou aktivitu v námi testovaném koncentračním rozmezí téměř ke všem modelovým kmenům.

Nejúčinnější látkou byla látka ze skupiny pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, konkrétně 5-methyl-6-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (OJ15). Tato látka v rozsahu testovaných koncentrací (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977; 0,488) μmol/l vykazovala výraznou antimykotickou aktivitu vůči všem modelovým kmenům. Nejvíce účinná byla na modelovém kmeni *Candida krusei*, a to při koncentraci, která se rovnala hodnotě 3,9 μmol/l po 24 hodinové inkubaci, po 48 hodinové inkubaci byla stanovena hodnota MIC 7,81 μmol/l. Tato nově nasyntetizovaná látka bude jistě předmětem dalšího

testování a možná velkým adeptem na nové antimykoticky působící léčivo.

V některých případech jde o významné kandidáty na další testování a hodnotné výsledky získané touto dílčí studií budou publikovány.

7. Použitá literatura

[1] ALASTRUEY - IZQUIERDO, A., CUENCA – ESTRELLA, M. EUCAST and CLSI: How to Assess in Vitro Susceptibility and Clinical Resistance. *Current Fungal Infection Reports*, 2012, vol. 6, 229-234

[2] BAKER, C. N., STOCKER, S. A., CULVER, D. M., THORNSBERRY, C. Comparison of the E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical microbiology*, 1991, vol. 29, s. 533-538

[3] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha 2: Marvil, 1996, 1. vydání, s. 344-360, ISBN 80-2380-297-6

[4] BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1. vydání, 2002, s. 192, ISBN 80-7184-565-5

[5] BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠŤÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M., DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Praktické lékárenství*, 2009, vol. 5, s. 279-288

[6] COMO, J. A., DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *The New England Journal of Medicine*, 1994, vol. 330, s. 263-272

[7] COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, vol. 6, s.187–198

[8] CUENCA – ESTRELLA, M., RODRIGUEZ – TUDELA, J. L. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistence to antifungal agents *in vitro*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2010, vol. 8, s. 267-276

[9] DOLEŽAL, M. Léčiva na bázi pyrazinu. *Praktické lékárenství*, 2005, vol. 1, s. 16-17

[10] DOLEŽAL, M., BUCHTA, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékárenství*, 2006, vol. 1, s. 10-14

[11] DOLEŽAL, M., ZITKO, J., KESETOVICOVA, D., KUNEŠ, J., SVOBODOVÁ, M. Substituted N-Phenylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Molecules*, 2009, vol. 14, s. 4180-4189

[12] DOLEŽAL, M., ZITKO, J. Pyrazine derivatives: a patent review (June 2012 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2015, vol. 25, s. 33-47

[13] ESPINEL - INGROFF A. Evalution of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0991). *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol. 41, s. 403-409

[14] ESPINEL – INGROFF, E., CUENCA – ESTRELLA, M., CANTÓN, E. EUCAST and CLSI: Working Together Towards a Harmonized Method for Antifungal Susceptibility Testing. *Current Fungal Infection Reports*, 2013, vol. 7, s. 59-67

[15] FLAMMER, R., SCHENK-JAGER, K. M. Mushroom poisoning – the dark side of mycetism. *Therapeutische Umschau*, 2009, vol. 66, s. 357-364

[16] GHANNOUM, M. A., RICE L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*, Clinical Microbiology Reviews*, 1999, vol. 12, s. 501-517

[17] GREENWOOD, D., SLACK, R. C. B, PEUTHERER, J. F., a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1. vydání, 1999, s. 563-564, ISBN 80-7169-365-0

[18] HARIA, M., BRYSON, H. M., GOA, K. L. Itraconazole. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of superficial fungal infections. *Drugs*, 1996, vol. 51, s. 585–620

[19] HARMAN, S., ASHBEE, H. R., EVANS, E. G. Testing of antifungal combinations against yeasts and dermatophytes. *Journal of Dermatological Treatment*, 2004, vol. 15, s. 104–107

[20] HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV.* Praha: Karolinum, 1. vydání, 2008, s. 35-48

[21] HAWKSWORTH, D. L., 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 2001, vol. 105, s. 1422–1432

[22] IZQUIERDO, A. A., CUENCA-ESTRELLA, M. EUCAST and CLSI: How to assess *in vitro* susceptibility and clinical resistence. *Current Fungal Infection Reports*, 2012, vol. 6, s. 229-234

[23] JANĎOUREK, O., DOLEŽAL, M., PATEROVÁ, P., KUBÍČEK, V., PEŠKO, M., KUNEŠ, J., COFFEY, A., GUO, J., KRÁLOVÁ, K. N-substituted 5-amino-6-methylpyrazine-2,3-dicarbonitriles: microwave-assisted synthesis and biological properties. *Molecules*, 2014, vol. 19, s. 651-671

[24] JORGENSEN J. H., FERRARO M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and comtemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, vol. 49, s. 1749-1755

[25] KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Antimicrobial resistence: resistence to antifungal agents: mechanism and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, vol. 46, s. 120-128

[26] KONTOYIANNIS, D. P., LEWIS, R. E. Antifungal drug resistence of pathogenic fungi. *The Lancet*, 2002, vol. 359, 1135-1144

[27] KORGENSKI, E. K., DALY, J. A. Evaluation of the BIOMIC video reader for determining interpretive categories of isolates on the basis of disk diffusion susceptibility results. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, s. 302-304

[28] KUPER, K. M., BOLES, D.M., MOHR, J. F., WANGER, A. Antimicrobial susceptibility testing: a primer for clinicians. *Pharmacotherapy*, 2009, vol. 29, s. 1326-1343

[29] LAMB, D. C., KELLY, D. E., SCHUNCK, W. H., SHYADEHI, A. Z., AKHTAR, M., LOWE, D. J., BALDWIN, B. C., KELLY, S. L. The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and flukonazol resistance through reduced affinity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, s. 5682-5688

[30] LEMKE, A., KIDERLEN, A. F., KAYSER, O. Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 68, s. 151-162

[31] LIANG, H. Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action, *Belstein Journal Organic Chemistry*., 2008, vol. 4, s. 14

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

[33] MARIE, CH., WHITE, T. C. Genetic basis of antifungal drug resistence. *Current Fungal Infection Report*, 2009, vol. 3, s. 163-169

[34] MICHAELIS, S., BERKOWER, C. Sequence comparison of yeast ATP binding cassette (ABC) proteins. *Cold spring harbor symposium on quantitative biology*, 1995, vol. 60, s. 291-309

[35] MUKHERJEE, P. K., SHEEHAN, D. J., HITCHCOCK, C. A., GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, vol. 18, s. 163-194

[36] PAUL, S., MOYE-ROWLEY, W. S. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Frontiers in Physiology*, 2014, vol. 5, s. 14

[37] PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resistance Updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 2007, vol. 10, s. 121-130

[38] PFALLER, M. A., YU, W. L. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infectious Diseases Clinics of North America*, 2001, vol. 15, s. 1227-1261

[39] PFALLER, M. A. Antifungal drug resistence: mechanism, epidemiology and consequences for treatment. *The American Journal of The Medicine, 2012,* vol. 125, s. 3-13

[40] POSTERARO, B., TORELLI, R., DE CAROLIS, E., POSTERARO, P., SANGUINETTI, M. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 2014, vol. 6, s. 7

[41] ROGERS, T. R. Antifungal drug resistence: does it matter? *International Journal of Infectious Diseases*, 2002, vol. 6, s. 47-53

[42] SERVUSOVÁ, B., EIBINOVÁ, D., DOLEŽAL, M., KUBÍČEK, V., PETEROVÁ, P., PEŠKO, M., KRÁLOVÁ, K. Substituted N-benzylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules*, 2012, vol. 17, s. 13183-13198

[43] SHAPIRO, R. S., ROBBINS, N., COWEN, L. E;. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistence and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, vol. 75, s. 213-267

[44] SIMON-NOBBE, B., DENK, U., POLL, V., RID, R., BREITENBACH, M. The spectrum of fungal allergy. *International Archives of Allergy and Imunology*, 2008, vol. 145, s. 58-86

[45] SORENSON, WG. Fungal spores: hazardous to health?. *Environ Health Perspect*, 1999, vol. 107, s. 469-472

[46] ST GEORGIEV, V. Membrane transporters and antifungal drug resistence. *Current Drug Targets*, 2000, vol. 1. s. 261-284

[47] TURNIDGE, J., PATERSON, D. L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. Clinical Microbiology Reviews, 2007, vol. 20, s. 391-408

[48] VANDEN BOSSCHE, H., MARICHAL, P., ODDS, F. C. Molecular mechanisms of drug resistence in fungi. *Trends in Microbiology*, 1994, vol. 2, s. 393-400

[49] VANDEPUTTE, P., LARCHER, G., BERGES, T., RENIER, G., CHABASSE, D., BOUCHARA, J. P. Mechanism of azole resistence in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, s. 4608-4615

[50] VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology, 2012, vol. 2012, s. 26*

[51] VOTAVA, M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 1. vydání, s. 210-211, ISBN 80-902896-6-5

[52] VOTAVA, M. a kolektiv. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005, 2. vydání, s. 265-266, ISBN 80-86850-00-5

[53] WHITE, T. C., MARR, K. A., BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, vol. 11, s. 382-402

[54] YAMAMOTO, S., TOIDA, I., WATANABE., N., URA, T. In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, vol. 39, s. 2088-2091

[55] ZEIN, M.E. Impact of mycotoxin on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2011, vol. 15, s. 129-144

Seznam zkratek

4D - 4-well azole-agar dilution - 4D azol-agarová diluční metoda

5-FC - 5-flucytosin

5-FU - 5-fluorouracil

ABC transportér - ATP (Adenosin TriPhosphate) Binding Cassette transporter - transportní protein vázající ATP

AC - *Absidia corymbifera*

AF - *Aspergillus fumigatus*

AIDS - Acquired ImmunoDeficiency Syndrome – syndrom získaného imunodeficitu

AmB - amfotericin B

ATP – Adenosine TriPhosphate - adenosin trifosfát

CA - *Candida albicans*

CCI - Composite Correlation Index - složený korelační index

CDR - *Candida* Drug Resistance - *Candida* léková rezistence

CDR1 – gen 1 z rodiny CDR

CDR2 – gen 2 z rodiny CDR

CFU - Colony Forming Unit – kolonii tvořící jednotka

CG - *Candida glabrata*

CK - *Candida krusei*

CLSI - The Clinical and Laboratory Standard Institute - Ústav pro klinické a laboratorní standardy

CT - *Candida tropicalis*

CYP51 - CYtochrome P450, family 51, enzym 14 alfa-demetyláza, který patří do skupiny cytochromu P450, rodiny 51

DMSO - DiMethylSulfOxid

DNA - DeoxyriboNucleic Acid - deoxyribonukleová kyselina

ERG2 - gen kódující enzym ∆7,8isomerázu

ERG3 - gen kódující enzym sterol ∆5,6desaturázu

ERG11 - gen kódující 14 alfa-demetylázu

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti

FC - Flow Cytometry - průtoková cytometrie

FCY1 - gen kódující cytosin deaminázu

FCY2 – gen kódující cytosin permeázu

FdUMP - FlouroDeoxyUridine MonoPhosphate - fluorodeoxyuridin monofosfát

FKS1 - gen kódující podjednotku enzymu beta-1,3-D-glukansyntázy

FKS2 - gen kódující podjednotku enzymu beta-1,3-D-glukansyntázy

FUMP – FluoroUridine MonoPhosphate - fluorouridin monofosfát

FU - fluorouracil

HIV - Human Immunodeficiency Virus – virus lidské imunitní nedostatečnosti

IMC - Isothermal MicroCalorimetry - izotermální mikrokalorimetrie

MALDI-TOF MS - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry - laserová desorpce/ ionizace za účasti matrice – průletová hmotnostní spektrometrie

MDR - Multi-Drug Resistance - multi-léková rezistence

MDR1 - Multi-Drug Resistance 1gene, gen kódující protein multi-lékové rezistence 1

MEC – Minimum Effective Concentration - minimální efektivní koncentrace

MFEC - Minimum Fluorescence Enhancing Concentration - minimální fluorescenční koncentrace

MFS - Major Facilitator Superfamily – nadrodina předních zprostředkovatelů

MHIC - Minimum Heat Inhibitory Concentration - minimální tepelná inhibiční koncentrace

MIC – Minimum Inhibitory Concentration - minimální inhibiční koncentrace

MOPS - 3-[N-morfolino]propansulfonová kyselina

NaOH – hydroxid sodný

RNA – RiboNucleic Acid - ribonukleová kyselina

RPMI – Roswell Park Memorial Institute - růstové médium

SYO - Sensititre YEASTOne – typ komerční metody

TA - *Trichosporon asahii*

TM - *Trichophyton mentagrophytes*

UK - Univerzita Karlova

USA – United States of America