

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LEKÁRSKYCH VIED**

## **Diplomová práca**

**Vyhodnotenie aktivity potencionalne antifungálnych látok pomocou  
mikrodilučnej bujónovej metódy**

**Vedúci diplomovej práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2017**

**Ivana Ťapuchová**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri pracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa .....

.....

Podpis

## **PodĎakovanie**

Týmto chcem poĎakovať predovšetkým mojej školiteľke Mgr. Marcele Vejsovej, Ph.D. za čas, milý prístup, ochotu a cenné rady pri písaní, ďalej pani laborantke Ide Dufkovej za trpezlivosť a odborné vedenie v laboratóriu, a taktiež vĎaka patrí PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. za poskytnutie chemických štruktúr a správne chemické názvoslovie v diskusii. Veľká vĎaka za podporu patrí môjmu priateľovi, rodine a psovi.

# OBSAH

1. ABSTRAKT .....	6
2. ABSTRACT .....	7
3. ZOZNAM SKRATIEK.....	8
4. ÚVOD .....	10
5. ZADANIE DIPLOMOVEJ PRÁCE – CIEĽ PRÁCE .....	11
6. TEORETICKÁ ČASŤ .....	12
6.1 CHARAKTERISTIKA A ROZDELENIE HÚB .....	12
6.2 TESTOVANÉ KMENE .....	15
6.2.1 Rod <i>Candida</i> .....	15
6.2.2 <i>Trichosporon asahii</i> .....	26
6.2.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	27
6.2.4 <i>Absidia corymbifera</i> .....	30
6.2.5 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	32
6.3 ANTIMYKOTIKÁ .....	34
6.3.1 Polyény.....	35
6.3.2 Azoly .....	36
6.3.3 Allylamíny .....	39
6.3.4 Echinokandíny.....	40
6.3.5 Pyrimidíny.....	41
6.3.6 Ostatné antimykotiká .....	42
6.4 REZISTENCIA.....	43
6.4.1 Mechanizmy vzniku rezistencie .....	44
6.5 <i>IN VITRO</i> STANOVENIE ANTIMYKOTICKEJ CITLIVOSTI .....	46
6.5.1 Kvalitatívne stanovenie .....	48
6.5.2 Kvantitatívne stanovenie .....	50
7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	55
7.1 MATERIÁL .....	55
7.1.1 Pomôcky.....	55

7.1.2	Laboratórne prístroje.....	55
7.1.3	Chemikálie .....	55
7.2	TESTOVANÉ KMENE KVASINIEK A VLÁKNITÝCH HÚB.....	56
7.3	TESTOVANÉ CHEMICKÉ LÁTKY.....	56
7.4	POSTUP PRÍPRAVY .....	57
7.4.1	Príprava rastového média.....	57
7.4.2	Príprava suspenzie testovaných kmeňov.....	57
7.4.3	Príprava riedenia testovanej látky .....	58
7.4.4	Príprava mikrotitračnej platničky.....	59
7.4.5	Vyhodnotenie nárastu.....	60
7.5	TESTOVANÉ LÁTKY S POTENCIONÁLNOU ANTIMYKOTICKOU AKTIVITOU.....	60
8.	<b>VÝSLEDKY</b> .....	71
9.	<b>DISKUSIA</b> .....	83
10.	<b>ZÁVER</b> .....	93
11.	<b>ZOZNAM TABULIEK A GRAFOV</b> .....	94
12.	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV</b> .....	95
13.	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b> .....	96

# 1. ABSTRAKT

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Autor: Ivana Ťapuchová**

**Názov práce: Vyhodnotenie aktivity potencionálne antifungálnych látok pomocou mikrodilučnej bujónovej metódy**

**Vedúci diplomovej práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.**

**Cieľ práce:** Cieľom tejto práce bolo stanoviť potencionálnu antimykotickú aktivitu 52 testovaných látok vyvinutých na Katedre anorganickej a organickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové Univerzita Karlova v Prahe.

**Metódy:** Využitá bola metóda mikrodilučnej bujónovej metódy na ôsmich druhoch kvasiniek a vláknitých húb v laboratórium Katedry biologických a lékařských věd.

**Výsledky:** Celkovo vykazovalo antimykotickú aktivitu 26 testovaných látok s rôznymi substituentmi, ktoré pochádzali zo skupín derivátov 4-aminobenzoovej kyseliny, 4-aminosalicylovej kyseliny, 5-aminosalicylovej kyseliny a z rozsiahlej skupiny derivátov sulfónamidov. Najcitlivejším kmeňom k testovaným látkam bol dermatofyt *Trichophyton mentagrophytes*, naopak najmenej citlivým kmeňom bola vláknitá huba *Absidia corymbifera*.

**Závery:** Aj napriek zistenej antimykotickej aktivite pri nízkych testovaných koncentráciách derivátov je potreba ďalších testov a klinických štúdií k potvrdeniu účinnosti a bezpečnosti užívania.

**Kľúčové slová:** kvasinky, vláknité huby, antimykotiká, minimálna inhibičná koncentrácia, mikrodilučná bujónová metóda

## 2. ABSTRACT

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Charles University in Prague**

**Author: Ivana Ťapuchová**

**Title of diploma thesis: Evaluation of activity of potential antifungal substances through the use of microdilution broth method**

**Supervisor: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.**

**Background:** The aim of this diploma thesis was to evaluate potential antifungal activity of 52 test substances which were developed at the Department of anorganic and organic chemistry Faculty of Pharmacy in Hradec Králové Charles University in Prague.

**Methods:** For testing we used microdilution broth method on eight strains of yeasts and filamentous fungi in the laboratory of Department of Biological and Medical Sciences.

**Results:** Overall 26 test substances with various substituents had antifungal activity. These substances were derivatives of 4-aminobenzoic acid, 4-aminosalicylic acid, 5-aminosalicylic acid and large group derivatives of sulfonamids. The most sensitive strain was dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*, the least sensitive strain was filamentous fungi *Absidia corymbifera*.

**Conclusions:** Despite there was observed antifungal activity in low concentrations of derivatives, it is necessary to perform next tests and clinical studies to prove efficiency and safety for use.

**Key words:** yeasts, filamentous fungi, antimycotics, minimal inhibitory concentration, microdilution broth method

### 3. ZOZNAM SKRATIEK

5-FC – flucytozín, 5-fluorocytosín

5-PAS – 5-aminosalicylová kyselina

AC – *Absidia corymbifera*

ADP – adenzindifosfát

AF – *Aspergillus fumigatus*

AIDS – syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti

ATP – adenzin trifosfát

ATPáza – adenzin trifosfatáza

CA – *Candida albicans*

CFU – kolóniu tvoriaca jednotka

CG – *Candida glabrata*

CK – *Candida krusei*

CLSI – Ústav laboratórných a klinických štandardov

CNS – centrálna nervová sústava

CT – *Candida tropicalis*

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzýmová imunoanalýza na pevnej fázy

EUCAST – Európska komisia pre testovanie citlivostí na antibiotiká

FDA – Úrad pre kontrolu potravín a liečiv

FIC – frakčná inhibičná koncentrácia

HIV – vírus nedostatku ľudskej imunity

IC<sub>50</sub>, IC<sub>80</sub> – inhibičná koncentrácia schopná inhibovať 50 % vláknitých húb alebo 80 % kvasiniek

INH – izoniazid



KOH – hydroxid draselný

MALDI-TOF – hmotová spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom

MEC – minimálna efektívna koncentrácia

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia

MOPS – 3-[*N*-morfolino]propánsulfonová kyselina

MRSA – metecilín-rezistentný zlatý stafylokok

NaCl – chlorid sodný

NaOH – hydroxid sodný

PABA – 4-aminobenzoová kyselina

PAMP – molekulárne vzory spojené s patogénom

PAS – 4-aminosalicylová kyselina

PCR – polymerázová reťazová reakcia

rDNA – ribozomálna deoxyribonukleová kyselina

RES – retikuloendoteliálny systém

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktívne oxidačné produkty

RPMI – rastové médium

SDZ – sulfadiazín

SMX – sulfamethoxazol

SMZ – sulfamethazín

STZ – sulfathiazol

TA – *Trichosporon asahii*

TM – *Trichophyton mentagrophytes*

USA – Spojené štáty americké

## 4. ÚVOD

Mykotické ochorenia sú neustále narastajúcim celosvetovým problémom, čo je spôsobené hlavne rastúcim počtom imunokompromitovaných pacientov, ale aj vznikom rozširujúcej sa rezistencie mikromycét voči dosiaľ známym a používaným antimykotikám, ako aj samotným nedostatkom nových a účinných antimykotík predovšetkým na liečbu život ohrozujúcich invazívnych mykóz.

Najčastejším ochorením sú superficiálne mykózy, ktoré postihujú približne 25 % populácie (Havlickova *et al.*, 2008). Diseminovanou alebo invazívnou formou mykotického ochorenia, ktoré vyžaduje hospitalizáciu a príslušnú liečbu, trpí ročne asi 1,5 milióna ľudí. Len invazívnou kandidózou trpí odhadovane viac ako 400 000 ľudí ročne (Brown *et al.*, 2012).

Hlavným pôvodcom kandidóz je *Candida albicans*, avšak stále narastajúcim trendom a problémom sú non – *albicans* kandidy s primárnou (*C. krusei*) a sekundárnou (napr. *C. glabrata*) rezistenciou na azolové antimykotiká a zvýšenou schopnosťou tvorby biofilmu. Nehovoriac o zriedkavejších kryptokokózach, fuzariózach a murkomykózach, ktoré sú typické vysokou mortalitou. Najčastejšie mykózy spôsobené vláknitými hubami spôsobuje *Aspergillus fumigatus*, ktorý v narastajúcej tendencii okrem pľúc infikuje aj ďalšie orgány ako CNS a prínosné dutiny (Drgoňa, 2013).

Mortalita týchto ochorení je vysoká a závisí od stavu ochorenia pacienta, lokalizácie infekcie, včasnosti správnej diagnózy, použitej liečby a profylaxie. Napriek tomu zostávajú z hľadiska dopadu na ľudské zdravie naďalej podceňované a presvedčivé dôkazy o rozsahu invazívnych mykóz podávajú hlavne pitevné záznamy.

K vývoju metód k stanoveniu citlivosti a rezistencie k antimykotikám došlo podstatne neskôr, ako tomu bolo pri antibiotikách a to hlavne z dôvodu častejšieho výskytu bakteriálnych ochorení.

Zmyslom tejto práce bolo *in vitro* screeningové stanovenie antimykotickej účinnosti, čo je prvým krokom k záchytu rôznych účinných štruktúr a substituentov, ktoré môžu byť použité k vývoju nového antimykotika. Výsledky tejto práce si vyžadujú ďalšie podrobnejšie štúdie s následnými klinickými štúdiami v dôsledku stanovenia účinnosti, kvality a vylúčenia toxicity spôsobenej vysokou podobnosťou štruktúr buniek húb a cicavcov.

## 5. ZADANIE DIPLOMOVEJ PRÁCE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo stanoviť potencionálnu antimykotickú aktivitu 52 testovaných látok vyvinutých na Katedre anorganickej a organickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové pomocou mikrodilučnej bujónovej metódy na ôsmych druhoch kvasiniek a vláknitých húb v laboratórium Katedry biologických a lekárskech vied pod vedením p. Idy Dufkovej.

### Zásady pre vypracovanie:

1. Rešerš literatúry
2. Zvládnutie základných mikrobiologických techník v mykologickom laboratórium
3. Vypracovanie postupu vyhodnotenia antifungálnej aktivity *in vitro* pomocou mikrodilučnej bujónovej metódy
4. Vlastné experimenty
5. Spracovanie výsledkov
6. Vyhodnotenie výsledkov, ich interpretácia a diskusia s využitím teoretických a praktických znalostí danej problematiky

## 6. TEORETICKÁ ČASŤ

### 6.1 Charakteristika a rozdelenie húb

Huby sú ubikvitárne eukaryotické organizmy s prevažne saprotroficným spôsobom výživy. Slúžia ako deštruenti rôznych organických látok a viac ako 300 000 druhov sa adaptovalo k parazitizmu so schopnosťou vyvolať ochorenie u rastlín a zvierat. Pre prospech človeka slúžia ako experimentálne modelové organizmy na skúmanie genetiky a bunkovej biológie, ako producenti rôznych dôležitých metabolitov a taktiež pri priemyselnej výrobe potravín ako je pivo, víno a syry. Huby tvoria samostatnú ríšu *Fungi* (Buchta *et al.*, 1998; Deacon, 2006).

Sú to chemoheterotrofné organizmy, ktoré získavajú energiu a potrebné zlúčeniny z organických látok. Ich bunky majú eukaryotickú stavbu, čím sú podobnejšie bunkám cicavcov ako bunkám baktérií. Preto je problémom vývoj nových, selektívne pôsobiacich antimykotík s nízkou toxicitou pre človeka.

Klinicky významné huby sú podľa štruktúry rozdelené na vláknité huby a kvasinky. Do skupiny *Eumycota* (pravé huby) patria takmer všetky patogénne druhy vláknitých húb, ktoré majú základnú stavebnú jednotku vlákno – hýfu, ktorá môže byť septovaná alebo neseptovaná s jedným alebo viacerými jadrami. Hýfy sa vetvia a vytvárajú mycélium. Na špeciálnych hýfách zvaných spóroféry sa tvoria spóry. V prípade nepohlavných spór sa jedná o konídie, ktoré sa tvoria na konídiofóroch (Buchta *et al.*, 1998).

U kvasiniek je stielka redukovaná na jednobunkové bunky zvané blastospóry. Množia sa nepohlavne pučaním, kde na bunkovej stene zostane stála štruktúra v podobe jazvy a za určitých podmienok môžu vytvárať pseudomycélium (dcérske bunky sa preťahujú a neoddeľujú sa od materskej bunky) alebo aj pravé mycélium (Buchta *et al.*, 1998).

Niektoré huby sú schopné prechádzať z vláknitej viacbunkovej na kvasinkovú jednobunkovú formu v závislosti na podmienkach prostredia, táto schopnosť sa nazýva **dimorfizmus** a vyskytuje sa pri niektorých patogénnych druhoch húb ako ich virulentný faktor (Buchta *et al.*, 1998).

Vláknitá forma sa nachádza pri teplote 25 – 30 °C a kvasinkovitá forma pri teplote 35 – 37 °C. Táto vlastnosť je typická napríklad pre *Histoplasma capsulatum* (teleomorfa *Ajellomyces capsulatum*), *Talaromyces marneffei* (známa tiež aj ako *Penicillium marneffei*), *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii* (teleomorfa *Ophiostoma schenckii*) a ďalšie, ktoré využívajú kvasinkovitú formu ako ochranu pred fagocytózou. Pri hubách, ktoré sa vyskytujú predovšetkým vo forme kvasiniek, ako napríklad *Candida albicans*, premena kvasinky na vláknitú formu pomáha uľahčovať prienik do tkanív počas infekcie (Boyce a Andrianopoulos, 2015).

Huby sa rozmnožujú **pohlavne** a **nepohlavne**, pričom obidva spôsoby môžu byť prítomné v rámci jedného druhu. Nepohlavne sa rozmnožujú tvorbou vegetatívnych spór (anamorfy – exospóry a endospóry). Pohlavné rozmnožovanie prebieha pomocou spájania dvoch pohlavných spór (teleomorfy – oospóry, zygospóry, askospóry a bazídiospóry).

Exospóry vznikajú mimo fruktifikačných orgánov a majú rôzny tvar. Konídie vznikajú odškrabovaním zo základnej bunky, kde jednobunkové sa nazývajú mikrokonídie a viacbunkové sú makrokonídie. Konídie nesie vlákno odlišné od hýf – konídiofór. Konídie na ňom vyrastajú priamo z konídiofóru alebo sa tvoria na fialidách (sterigmatách). Konídiofór môže mať na vezikuly primárne fialidy (metuly) a sekundárne fialidy vyrastajúce z metúl ako je to napríklad pri rode *Aspergillus*. Ak sa okolo jednotlivých buniek mycélia vytvorí silný obal, dôjde k zahusteniu obsahu bunky vzniká chlamydospóra odolná voči nepriaznivým podmienkam, čo je typické pre *C. albicans* (Kalhotka [online], 2013).

Endospóry vznikajú vo vnútri fruktifikačných orgánov sporangií, sú to teda sporangiospóry. Na sporangiofóre sa nachádza sporangium, ktoré môže byť vetvené alebo jednoduché.

Huby patriace do skupiny *Eumycota* sa pohlavne rozmnožujú za vzniku spóry a to endospóry a exospóry podľa toho, či sa nachádzajú v špecializovanom orgáne (ascus – vrečko, askospóry) alebo mimo neho (bazídium – stopka, bazídiospóry). Vývoj pohlavných spór je u askomycét a bazídiomycét spojený s tvorbou plodníc (Buchta *et al.*, 1998).

Prakticky všetky potencionálne patogénne druhy húb pre človeka patria medzi pravé huby (*Eumycota*), kde je stielka tvorená hýfami, pseudomycéliom alebo

blastospórami. Neprítomné sú bičíkaté a ameboidné štádia, bunková stena je zložená z chitínu a glukánov a rozmnožujú sa pohlavne aj nepohlavne. Delia sa na:

- **Zygomycetes** (spájavé huby), kde mycélium je tvorené neseptovanými hýfami, výnimku tvoria len niektoré druhy. Kolónie na agary sú typické vzdušným mycéliom. Výsledkom pohlavného rozmnožovania je vznik zygospóry, čo je diploidná bunka so silnou obalovou vrstvou. Pri klíčení dochádza k meióze (3 jadrá zanikajú a štvrté sa delí mitózou). Zo zygospóry následne vyrastie sporangiofór so sporangiom, v ktorom sa nachádzajú haploidné endospóry. Nepohlavné rozmnožovanie prebieha pomocou sporangiospór. Väčšinu tvoria saprofyti a patria sem pôvodcovia murkomykóz (zygomykóz) (rody *Absidia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* a iné) (Buchta *et al.*, 1998).
- **Ascomycetes** (vreckovýtrusné huby) majú septované mycélium. Pohlavné rozmnožovanie je typické tvorbou askospór vznikajúcich vo vrecku ako výsledok spojenia špecializovaných samčích a samičích hýf. Nepohlavne vznikajú exogénne konídie. Patria sem napríklad *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* a iné (Buchta *et al.*, 1998).
- **Basidiomycetes** (stropkovýtrusné huby) majú septované mycélium s typickým bielym podhubím tvoreným dvojjadrovými bunkami (dikaryontné štádium). Pohlavné rozmnožovanie je výsledkom spojenia dvoch geneticky kompatibilných hýf a výsledkom je tvorba bazídií s exogénnymi bazídiospórami. Nepohlavné spóry sa zvyčajne netvorí. Charakteristická je tvorba plodníc (bazídiokarp). Tie sa u niektorých druhov zbierajú ku konzumácii. Často sú to saprofyty so symbiózou s koreňovým systémom rastlín tzv. mykoríza (Buchta *et al.*, 1998).
- **Fungi Imperfecti** (*Deuteromycetes*) sú umelým taxónom, zahrňuje nepohlavné (imperfektné, anamorfy) štádia húb, ktoré sa rozmnožujú len pomocou konídií alebo vegetujú len ako sterilné mycélium. Pohlavné (teleomorfa) štádium sa nachádza u niektorých druhov, avšak väčšina známych teleomórf patrí medzi askomycéty. Patogénne druhy pre človeka delíme:

- **Blastomycetes** – imperfektné kvasinky (rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*)
- **Hyphomycetes** – vláknité huby rozmnožujúce sa konídiami (rody *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Geotrichum* a iné (Buchta *et al.*, 1998).

## 6.2 Testované kmene

### 6.2.1 Rod *Candida*

Rod *Candida* patrí medzi kvasinkovité mikromycéty spolu s rodmi *Blastoschizomyces*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Matassezia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* a *Trichosporon*. Obsahuje viac ako 150 heterogénnych druhov a patrí medzi dimorfné huby, kde kvasinkovité bunky – blastokonídie (blastospóry) sú oválne alebo guľaté, veľkosti 3 – 5 µm. Pretiahnuté blastokonídie, tvoriace vetvené retiazky, sa nazývajú pseudohýfy a vytvárajú pseudomycélium. Kandidy tvoria taktiež aj pravé hýfy, zložené z viacerých buniek, tvoria sa septované hýfy, ktoré vytvárajú pravé mycélium (Bednář *et al.*, 1996; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Na rozdiel od ostatných dimorfných húb, ktoré v infikovanom tkanive tvoria kvasinkovité bunky, pri kandidóze sú v tkanive prítomné kvasinky aj vláknité formy. Niekoľko málo druhov tvorí výnimku v schopnosti dimorfizmu, ako napríklad *C. glabrata*. Kandidy sú rastovo málo náročné. Utilizujú rôzne cukry a dusíkaté látky, čo sa využíva na ich jednotlivé rozdelenie pomocou zymogramov a auxanogramov. Všetky sú schopné aeróbne a aj anaeróbne asimilovať glukózu ako univerzálny zdroj energie a uhlíku (Špaček *et al.*, 2013; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Výskyt mykotických infekcií v súčasnosti sa zvyšuje spolu s nárastom počtu imunosuprimovaných pacientov, dlhodobou hospitalizáciou a podávaním širokospektrálnych antibiotík, čím dochádza k vzniku častých nozokomiálnych nákaz. Najčastejším pôvodcom ochorení u človeka je *Candida albicans*, avšak v posledných rokoch neustále narastá počet ochorení spôsobených non – *albicans* kandidami (*Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*

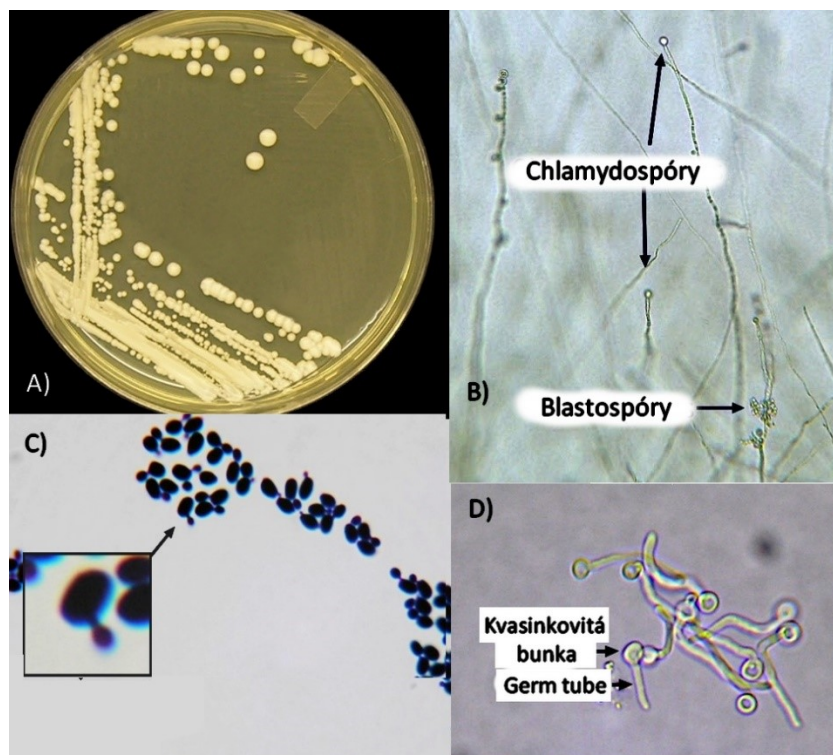
a *C. pseudotropicalis*), ktoré sú vzrastajúcim problémom hlavne vďaka celosvetovému používaniu flukonazolu v populácií (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

### **6.2.1.1 *Candida albicans***

Je oportúnny patogén, prirodzene sa nachádza v ústnej dutine, gastrointestinálnom a urogenitálnom trakte. V menšom počte kolonizuje sliznice ako komenzál, pri premnožení môže spôsobiť povrchové infekcie. U imunokompromitovaných pacientoch môže vstúpiť do krvného riečiska a spôsobiť systémovú kandidózu s 30 – 50% úmrtnosťou a to napriek použitiu antifungálnej liečby (Edmond *et al.*, 1999).

Vytvára krémové vyvýšené kolónie s hladkou štruktúrou, mazlovitou konzistenciou a kvasnou vôňou. Charakteristická je schopnosť germinácie, čiže tvorby tzv. zárodočných klíčkov (germ tubes). Sú to jemné vlákenká, ktoré vyrastajú z blastokonídií (blastospór, kvasinkovitých buniek) *in vitro* aj *in vivo*. Z nich následne môžu vznikáť pravé hýfy. Za určitých podmienok, napríklad na pôde so žlčou, tvorí *C. albicans* rezistentné bunky – chlamydospóry, ktoré sú guľaté, hrubostenné, väčšie (7 – 10 µm) a nachádzajú sa na koncoch a po stranách hýf (Bednář *et al.*, 1996).





**Obrázok č. 1:** A) Kolónia *C. albicans* na Sabouraudovom agare, B) Blastospóry a chlamydospóry *C. albicans*, C) Pučiace bunky *C. albicans* farbené kryštálovou vioľou, D) Kvasinkovité bunky a germ tubes *C. albicans*

**Zdroj:** (Fun with microbiology. *Candida albicans* [online], 2009).

*C. albicans* štiepi glukózu, maltózu, sacharózu a neštiepi laktózu. Virulencia sa líši v rôznych kmeňoch, čo sa vysvetľuje plasticitou ich genómu, ktorá umožňuje rýchle zmeny vlastností kmeňa (Bednár *et al.*, 1996). Nemá špeciálne nutričné nároky, rastie v širokom rozmedzí pH hodnôt (2 – 8) v anaeróbných aj aeróbných podmienkach (Špalek *et al.*, 2013).

Patogenita *C. albicans* je spôsobená množstvom faktorov virulencie, zahrňujúcich adherenciu, tvorbu biofilmu a produkciu hydrolytických enzýmov (proteáz a fosfolipáz). Schopnosť germinácie je zodpovedná za invazivitu a taktiež napomáha uvoľňovaniu z fagocytov po ingescii. *C. albicans* a *C. parapsilosis* produkujú hydrolytický enzým kyslú proteinázu, ktorá má keratolytický účinok, čím napomáha k invázii kandid do kože (Bednár *et al.*, 1996; Morschhäuser *et al.*, 1997).

Patogénne druhy kandid sa vyznačujú vysokým stupňom vnútrodruhovej variability. U *C. albicans* patogenitu výrazne ovplyvňujú dva fenomény: dimorfizmus

a fenotypový prešmyk. Schopnosť reverzibilného dimorfizmu, teda prechodu medzi jednobunkovou kvasinkou a viacbunkovým mycéliom, ovplyvňuje viacero faktorov ako napríklad teplota, živiny a okolité pH, kde kyslé pH indukuje rast v kvasinkovej forme, zatiaľ čo zásadité pH rast vo forme hýf (Jacobsen *et al.*, 2012).

Fenotypový prešmyk je schopnosť adaptovať sa k stresovým podmienkam pomocou preskupovania génov a následným fyziologickým a morfológickým zmenám. Najznámejší je biely – matný typ. Kde prechod z bielej na matnú kolóniu je doprevádzaný zmenou vegetatívnej formy (kvasinka – hýfa), zmenou expresie adhezívnych molekúl, zmenou citlivosti k antimykotikám, ale aj schopnosťou tvoriť biofilm. Biely typ v porovnaní s matným je obecné spájaný s väčšou virulenciou u systémových kandidóz, matný typ je schopný perzistovať v nepriaznivejších podmienkach. Touto schopnosťou je typická aj *C. glabrata* (Špalek *et al.*, 2013).

Bunkovú stenu *C. albicans* tvorí 90 % sacharidov a 10 % proteínov. Sacharidy rozpoznáva imunitný systém a proteíny majú kľúčovú úlohu v adhezívnej interakcii s hosťiteľskými bunkami. Medzi proteíny patrí napríklad adhenzíny Hwp1 a Als3, ktoré sa viažu na E-kadherín epiteliálnych buniek a umožňujú penetráciu a inváziu endocytózou. Slúžia ako antigény a podieľajú sa na tvorbe biofilmu. Medzi polysacharidy patria tri skupiny: manány, glukány a chitíny. Manánoproteíny tvoria fibrilárnu vonkajšiu vrstvu, ktorá chráni bunky pred fagocytózou a glukány a chitín tvoria vnútornú vrstvu. Glukán je hlavný prozápalový mediátor, chitín je deacetylovaný na chitozán, ktorý slúži na rozpoznanie, aktiváciu a oslabenie imunitného systému. Biofilm je rezistentný k neutrofilom a nespúšťa produkciu reaktívnych oxidačných produktov (ROS). Predpokladá sa, že sú za ochranu zodpovedné  $\beta$ -glukány v extracelulárnej matrix (Nobile *et al.*, 2008; Gow a Hube, 2012; Xie *et al.*, 2012; Rast *et al.*, 2016).

*C. albicans* má aj toxínogénnu aktivitu. Produkuje gliotoxín (podobne ako *A. fumigatus*), ktorý má imunosupresívny a antitrombotický účinok a hyaluronidázu s prozápalovými účinkami (Špalek *et al.*, 2013). Vplyvom oxidačného stresu produkuje enzýmy (superoxiddizmutázu, katalázu) a vychytávače (glutaredoxín, thioredoxín), ktoré chránia bunku pred ROS (Chauhan *et al.*, 2006).

Infekcie spôsobené *C. albicans* a ostatnými kandidami sa nazývajú kandidózy. U novorodencov dochádza ku kolonizácii kandidami už počas pôrodu. Je pôvodcom sooru v ústnej dutine u nedonosených alebo oslabených detí, ktorý sa prejavuje bielymi

až žltými povlakmi. Kandidózy sú najčastejšími mykózami s rôznou závažnosťou. Najčastejšie sa jedná o povrchové infekcie slizníc a kože, klinicky závažné sú infekcie vnútorných orgánov ako pri septikémii, endokarditíde a meningitíde (Pánková, 2012).

### 6.2.1.2 *Candida tropicalis*

Je to taktiež dimorfná kvasinka, vo vzácných prípadoch tvorí pravé hýfy rovnako ako *C. albicans*. Rozdielnym znakom je, že *C. tropicalis* nevytvára chlamyospóry. Vytvára okrúhle, suché kolónie bielej až smotanovej farby a krémovitej konzistencie (Larone, 2002).



**Obrázok č. 2:** *C. tropicalis* na Sabouraudovom agare

**Zdroj:** (Chiba University Research center for pathogenic fungi and microbial toxicoses. *Candida tropicalis* [online], 1999).

Radí sa medzi tretie až štvrté miesto v počte izolovaných kandid, aj keď väčší výskyt je v tropických a subtropických oblastiach (Pemán *et al.*, 2012).

Skoro vždy je spojená s vývojom mykózy a stále častejšie s vyššou mortalitou, hlavne u neutropenických a onkologických pacientoch. Má vysoký sklon k diseminácii

a úmrtnosti. Prirodzene sa nachádza na koži, v gastrointestinálnom a urogenitálnom trakte. Invazívne kandidózy spojené s *C. tropicalis* sa najčastejšie vyskytujú vo forme kandidúrie a kandidémie (Okawa *et al.*, 2008; Negri *et al.*, 2012).

Štúdie dokázali, že na rozdiel od *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* sa menej vyskytuje u detí do jedného roku, viac sa vyskytuje u pacientov s rakovinou alebo neutropéniou a taktiež často na biofilme močových katétrov (Jain *et al.*, 2007; Nucci a Colombo, 2007).

*C. tropicalis* má schopnosť adherovať k povrchom, ľudským tkanivám a bunkám. Má niekoľko odlišných adhezínov, ktoré umožňujú adhéziu a tvorbu biofilmu. Biofilm tvorí z veľkej časti matrix, ktorý obsahuje 27 % hexóزامínu, kde u *C. albicans* tvorí 32 % glukóza. Hexóزامín (aj u *Streptococcus epidermidis*) sprostredkováva medzibunkovú interakciu v biofilme, čo prispieva k vyššej rezistencii biofilmu (Gotz, 2002).

### **6.2.1.3 *Candida krusei***

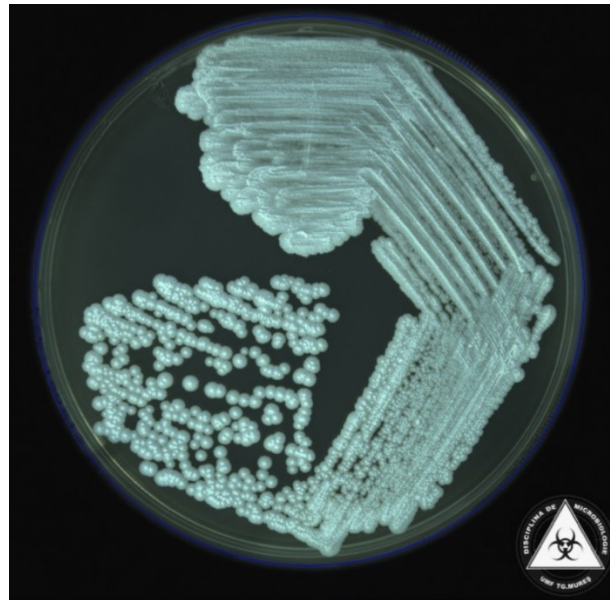
Je jeden z najfrekvencovanejších patogénov spôsobujúcich kandidémiu hlavne u pacientov s akútnou leukémiou. Je to odolný multirezistentný patogén a má schopnosť rýchlo sa prispôbovať antimykotickej liečbe. Je primárne rezistentný k flukonazolu vďaka zníženej citlivosti 14 $\alpha$ -demethylázy (Gill *et al.*, 2015).

Neutrofilý a makrofágy využívajú tvorbu ROS na zneutralizovanie mikroorganizmov. *C. krusei* je schopná pod stresom aktivovať alternatívnu cestu respirácie, ktorá znižuje rýchlosť nahromadenia ROS, čím umožňuje vývoj rezistentných buniek a je teda odolnejšia ako *C. albicans* (Abegg *et al.*, 2010; Costa-de-Oliveira *et al.*, 2012).

Aj keď je prevalencia ochorení spôsobených *C. krusei* nízka (2 – 5 %), je epidemiologicky dôležitá z dôvodu pomerne vysokej 30 – 60% úmrtnosti pri invazívnych ochoreniach (Scorzoni *et al.*, 2013).

Špecifické kmene *C. krusei* spolu s ostatnými rôznymi kvasinkami našli uplatnenie pri výrobe čokolády, kde fermentáciou odstraňujú horkú chuť kakaových bôbov konečnými metabolitmi ako sú alkoholy a kyselina octová (Jespersen *et al.*, 2005).

Od ostatných kandid sa *C. krusei* líši viacerými faktormi: má skôr predĺžené bunky v tvare ryže, v bunkovej stene obsahuje špecifický polysacharid  $\alpha$ -D-manán, bunková stena je hydrofóbná, čo umožňuje silnejšiu adhérenciu na nepolárne povrchy. Je to jediná kandida, ktorá rastie na pôde bez vitamínov (Samaranayake, 1994).



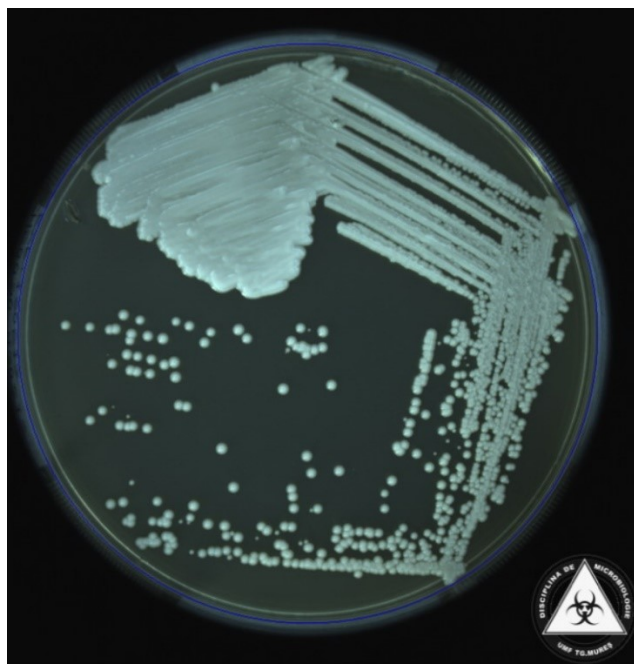
**Obrázok č. 3:** *C. krusei* na Sabouraudovom agare

**Zdroj:** (Atlas online de microbiologie - Disciplina de Microbiologie UMF Târgu-Mureș *Candida krusei* [online]).

#### 6.2.1.4 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* je druhým najčastejším ľudským kvasinkovým patogénom po *C. albicans*. Netvorí pravé hýfy, teda nie je dimorfná huba. Komenzálna a patogénna formy sú morfológicky totožné vo forme blastokonídií. Kvasinkovité formy nemajú guľatý tvar, skôr sa podobajú tvaru vajca. Má haploidný genóm na rozdiel od *C. albicans* s diploidným genómom. Fermentuje len glukózu a trehalózu – intracelulárny zásobný disacharid glukózy (Whelan *et al.*, 1984; Ahmad *et al.*, 2014).

Dôležitosť tejto kvasinky je hlavne spôsobená zníženou citlivosťou k flukonazolu a vysokým percentom úmrtia pacientov so systémovou kandidózou vyvolanou *C. glabrata*.



**Obrázok č. 4:** *C. glabrata* na Sabouraudovom agare

**Zdroj:** (Atlas online de microbiologie - Disciplina de Microbiologie UMF Târgu-Mureș  
*Candida glabrata* [online]).

Schopnosť adherencie k bunkám v porovnaní s *C. albicans* je slabšia pravdepodobne v dôsledku absencie pravých hýf, avšak *C. glabrata* má schopnosť adherovať na trombocyty v krvnom riečisku, hlavne pri diseminácii, a tým zlepšiť svoju distribúciu. Hlavné adhezívne Epa lektíny sú skôr príbuzné *Saccharomyces cerevisiae* a podieľajú sa aj na tvorbe biofilmu (Li *et al.*, 2007).

U *C. glabrata* dochádza taktiež k fenotypovému prešmyku, ktorý je zodpovedný za prechod kvasinky na hýfu. K tzv. „core switching“ dochádza u *C. glabrata* len na agare s obsahom síranu meďnatého, čo sa prejaví zmenou sfarbenia kolón medzi bielou, svetlo a až tmavo hnedou. Táto vlastnosť slúži ako odpoveď na rýchle environmentálne zmeny (Fidel *et al.*, 1999; Srikantha *et al.*, 2005).

Napriek nedostatku niektorých virulenčných faktorov oproti ostatným kandidám, až 20 – 30 % izolátov *C. glabrata* je rezistentných k azolovým antimykotikám a toto číslo neustále rastie (Pfaller a Diekema, 2007; Alexander *et al.*, 2013). Za 15 rokov používania echinokandínov si *C. glabrata* v porovnaní s ostatnými kandidami najrýchlejšie vyvinula

rezistenciu. Dokonca 3 – 12 % izolátov vykazuje rezistenciu viac ako k jednému echinokandínu (Pfaller *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2013).

Bolo zistené, že *C. glabrata* je odolnejšia k oxidačnému stresu neutrofilov v porovnaní s *C. albicans*, čo je spôsobené produkciou špecifickej katalázy Cta1p (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2008). Na rozdiel od *C. albicans* nespôsobuje rozsiahle poškodenie epitelu a nevyvoláva silnú imunitnú odpoveď tým, že ihneď nedeštruje makrofágy. Spôsob invázie nie je doteraz plne známy (Brunke a Hube, 2013).

Taktiež spôsobuje ochorenia ako ostatné kandidy: superficiálne kandidózy, vulvovaginitídy, napáda orofarynx, urinálny trakt a spôsobuje systémové kandidózy. Je najčastejšie sa vyskytovanou kandidou spôsobujúcou vulvovaginálnu kandidózu u žien trpiacich diabetom (Ray *et al.*, 2007).

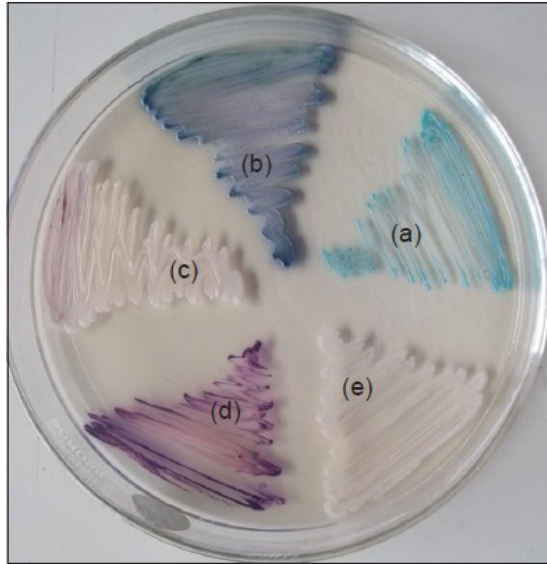
#### **6.2.1.5 Všeobecná diagnostika kandid**

**Histologicky** sa jedná o dôkaz blastospór či pseudomycélia z tkaniva pri invazívnych kandidózach. Preparáty sa farbja hematoxylín-eozínom, farbením Periodic acid schiff a striebrením podľa Grocotta. Nedá sa určiť druh kandidózy, bližšia identifikácia je za použitia monoklonálnych protilátok, fluorescencie alebo PCR (Mallátová a Mencl, 2010).

Vo **fixovanom preparáte** sú najčastejšie používané obecné (Gram – farbja sa fialovo „grampozitívne“) a špeciálne (Grocot, Gram-Weigert, imunofluorescencia...) farbenia preparátov pre identifikáciu kvasinkovitých buniek a pseudomycélií. Mykotické elementy sú viditeľné aj v **natívnom preparáte** zhotoveného pomocou 20% KOH. Pre lepšiu vizualizáciu sa do roztoku KOH pridávajú rôzne farbivá, najčastejšie modré farbivo MYCO-Ink, Rylux, Calvofluor (fluorescenčné) a iné, ktoré sa viažu predovšetkým na mykotické elementy ako je chitín (Kocmanová, 2015).

**Kultivačným štandardom** je Sabouraudov glukózový agar s prímiesou antibiotík na inhibíciu rastu baktérií. Hodnotí sa nárast v priebehu 24 – 48 hodín pri teplote  $35 \pm 2$  °C. Na rozlíšenie *C. albicans* sa používa germ – tube test, kde dochádza po 3 hodinovej inkubácii v ľudskom alebo bovinom sére k vzniku tzv. zárodočných klíčkov. *C. albicans* na ryžovom alebo žľčovom agare tvorí chlamydozspóry. Na odlíšenie

druhov sa používajú chromogénne médiá, kde kvasinky rastú v rôzne farebných kolóniách (Mallátová a Mencl, 2010).



**Obrázok č. 5:** CHROMagar: (a) *C. albicans*, (b) *C. tropicalis*, (c) *C. krusei*, (d) *C. glabrata*, (e) *C. parapsilosis*

**Zdroj:** (Vijaya *et al.*, 2014).

Následná identifikácia prebieha na základe biochemických vlastností, schopnosti asimilácie dusíku a uhlíku a fermentácie sacharidov. Modernejšia identifikácia je pomocou automatizovaných systémov ako je hmotový spektrometer MALDI-TOF (Mallátová a Mencl, 2010).

Pri invazívnej kandidóze je užitočné odobrať **hemokultúru**, ktorá je však pozitívna len v 40 – 60 % prípadoch. Krv je vhodné odobrať pred začatím liečby alebo pri vzostupe teploty. U dospelých sa odoberá 10 ml krvi, u detí 3 – 5 ml a u novorodencov aspoň 1 ml. Odoberá sa bez pridania protizrážacích roztokov a hneď po odbere sa prenesie do hemokultivačnej fľaštičky s tekutou kultivačnou pôdou a detekčným systémom. Odoberá sa dostatočný počet hemokultúr a kultivácia prebieha až 14 dní v termostate, ktorý je spojený s počítačom a každé 3 minúty sa vyhodnocuje stav nádoby a signalizuje sa prípadný rast (napr. sa meria obsah produkovaného CO<sub>2</sub>). *C. glabrata* má dobu rastu výrazne dlhšiu ako ostatné kandidy. Ak je hemokultúra pozitívna, vyočkuje sa na Sabouraudov glukózový agar a následne sa spraví náter na sklíčko a orientačný diskový



test citlivosti. Rizikom je falošná pozitivita pri nedostatku asepsie pri odbere krvi (Fernandez *et al.*, 2009; Votava *et al.*, 2010; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

**Imunologickými metódami** sa stanovuje pri kvasinkách manán (antigén bunkovej steny), protilátky (antimanán) a všeobecne panfungálny antigén (1-3)- $\beta$ -D-glukán. Výsledky treba hodnotiť v kontexte s ďalšími metódami. Kombinácia stanovenia manánu a antimanánu je na princípe latexovej aglutinácie alebo ELISA a má význam pri invazívnej kandidóze. Nevýhodou je, že protilátky proti antimanánu vytvárajú aj bežne kolonizovaní pacienti. Manán je rýchlo eliminovaný a nestabilný, pozitivita panfungálneho antigénu je taktiež aj pri rodoch *Trichosporon*, *Aspergillus* a iných. Detekcia galaktomanánu je markerom invazívnej aspergilózy (Sendid *et al.*, 2002; Mallátová a Mencl, 2010).

Je možné stanovovať aj metabolity ako napríklad D-arabinitol, pomocou plynovej chromatografie alebo komerčnými enzýmovými testami ako Arabinitec-Auto. D-arabinitol produkujú všetky kandidy okrem *C. krusei* a *C. glabrata* (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

**Molekulárno-genetické metódy** sú vysoko senzitivne a rýchle metódy s potrebou minimálneho množstva vzorky. Dochádza k pomnoženiu pomocou polymerázovej reťazovej reakcie v rôznych modifikáciách. Používajú sa tzv. panfungálne primery alebo druhovo špecifické primery. Kvantifikáciou je možné rozlíšiť kolonizáciu od aktívnej infekcie. Najčastejšie používaná je multiplex PCR, kde v prvej fáze je pomnožený nešpecifický úsek DNA a následne sú použité druhovo špecifické primery. Nevýhodou je ľahká kontaminácia s falošnou pozitivitou ako aj neštandardnosť prevedenia a nedostatočná reprodukovateľnosť pre rutinnú diagnostiku (Hamal, 2007).

**MALDI-TOF** je metóda hmotovej spektrometrie s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom. Je rýchlou a veľmi presnou metódou identifikácie. Vzorka z kolónie je vložená spolu s matricou na terčík, ktorý je ožiarený pulzom laseru, ktorého energiu absorbuje matrica, ktorá ionizuje molekuly vzorky. Tieto molekuly putujú do analyzátoru doby letu, kde letia rýchlosťou úmernou ich hmotnosti a náboju. Identifikácia prebieha na základe rôzneho proteínového zloženia (proteómu) jednotlivých mikroorganizmov, kde výsledné spektrum sa porovnáva so spektrom v referenčnej knižnici (Bursová *et al.*, 2014a).

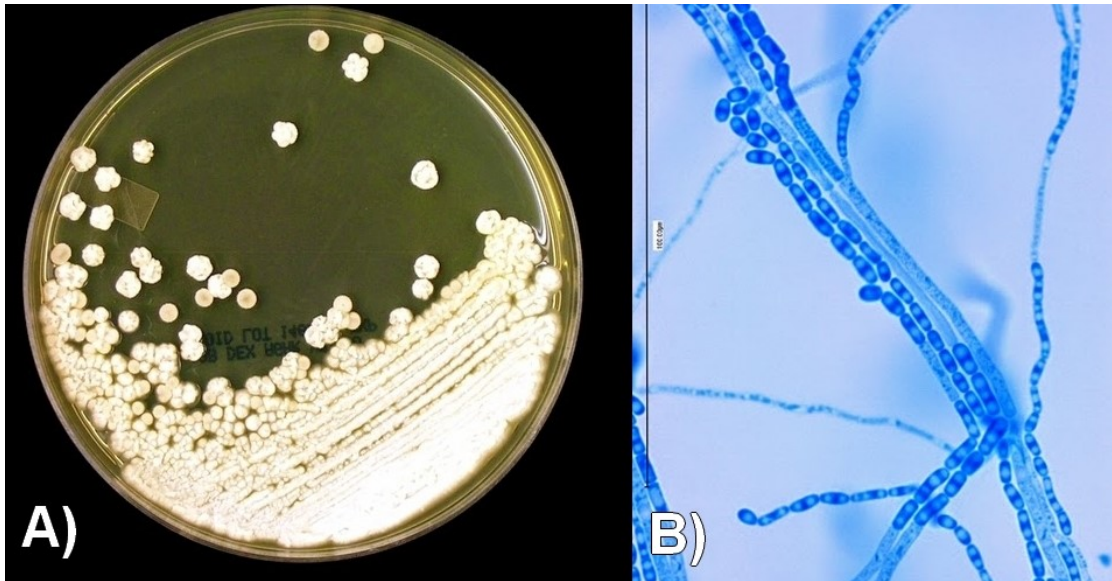
## 6.2.2 *Trichosporon asahii*

*T. asahii* je oportúnny patogén, ktorý sa vyskytuje v pôde, riekach, jazerách ale aj vo vtáčom truse. Prirodzene kolonizuje sliznice orofarynxu, gastrointestinálny trakt a kožu. Prvý krát bol rod *Trichosporon* popísaný ako pôvodca vlasovej infekcie – bielej piedry, ktorá sa vyskytuje hlavne v tropických oblastiach. Je to mykotické ochorenie vlasu s typickou tvorbou malých uzlíkov vo vlasoch. Podieľa sa aj na tvorbe biofilmov, bunková stena obsahuje glukuronoxylomanán (podobne ako *Cryptococcus neoformans*) a je schopný produkcie rôznych proteáz a lipáz, ktoré sú zodpovedné za virulenciu a invazivitu (Colombo *et al.*, 2011).

Rizikoví sú hlavne hematologickí a neutropenickí pacienti. Taktiež sú ohrození pacienti liečení kortikoidmi, po transplantácií orgánov a aj požívatelia intravenózných drog. Vstupnou bránou infekcie je najčastejšie respiračný a zažívací trakt, poprípade katétre.

Trichosporonóza sa rozdeľuje na povrchové a systémové infekcie, ktoré môžu byť orgánové alebo systémové. Najčastejšie invazívna infekcia ohrozuje pľúca. Diseminované infekcie významne vzrastajú a končia fatálne až v 60 – 70 % prípadoch. Prvý prípad diseminovanej formy bol popísaný u ženy s rakovinou pľúc, ktorej sa následne vyvinul absces mozgu. Symptómy diseminovanej infekcie sa podobajú systémovým kandidózam a vyskytujú sa v akútnej alebo chronickej forme. U akútnych je priebeh veľmi rýchly, hlavne u neutropenických pacientoch, dochádza k vývinu kožných lézií, infiltrácií pľúc, obličiek a k chorioretinitíde. Chronická infekcia má pomalší priebeh v podobe horúčky nejasnej etiológie (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Kvasinkovité bunky sa nachádzajú s charakteristickými pravými hýfami, pseudohýfami, athrokonídiami (asexuálnych častí vznikajúcich rozpadom z pravých hýf) a blastokonídiami (pučiacimi útvarmi). Rastie na Sabouraudovom agare a vytvára jemné šedo-krémové vypuklé kolónie so zamatovým suchým povrchom a radiálnymi brázdami (Česká sbírka mikroorganizmů [online]).



**Obrázok č. 6:** A) Kolónia *Trichosporon asahii*, B) Mikroskopický dôkaz hýf s hladkým povrchom a reťazovo usporiadanými arthrokonídiami

**Zdroj:** (Fun with microbiology. *Trichosporon asahii* [online], 2014).

Najspoľahlivejšia je biopsia infikovaného orgánu alebo kože. Zlatým štandardom je kultivácia na Sabouraudovom agare. Ďalej je užitočná hemokultúra a identifikácia pomocou metódy MALDI-TOF a PCR. Prítomnosť *T. asahii* v moči zvyšuje podozrenie na diseminovanú formu. Pokroková je aj metóda prietokovej cytometrie Luminex xMAP na detekciu dôležitých druhov húb. Je založená na využití PCR – biotinylizovaného amplikónu cieľovej DNA, ktorá sa naočkuje do zmesi mikroguličiek s druhovo špecifickými próbami. Po pridaní streptavidínu dochádza k vzniku komplexu biotín – streptavidín na základe komplementarity nukleotidových sekvencií na mikroguličkách s následnou detekciou fluorescencie (Colombo *et al.*, 2011).

### 6.2.3 *Aspergillus fumigatus*

Je oportunistická ubikvitárna vláknitá huba spojená hlavne s nozokomiálnymi infekciami. Ohrození sú pacienti s ochorením dýchacích ciest ako je cystická fibróza a chronická obštrukčná choroba pľúc, infikuje aj popáleniny a medicínske implantáty. *A. fumigatus* je typický transformáciou konídií na hýfy, ktoré sú zodpovedné za invazivitu

do tkaniva. Hýfy sa nachádzajú typicky v biofilmoch, ktoré sú vysoko rezistentné (Speirs *et al.*, 2012; Reen *et al.*, 2016).

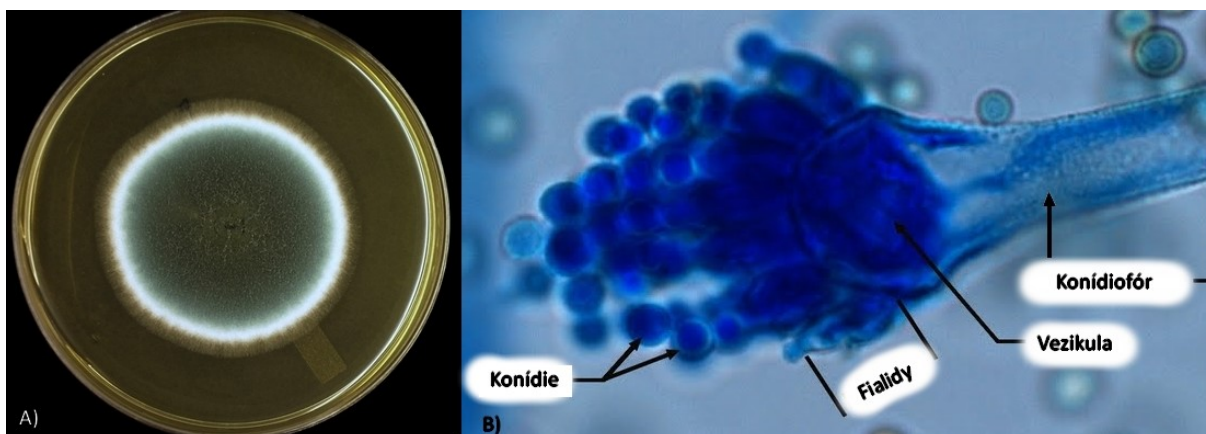
Koexistencia a vzájomná interakcia baktérií a húb v mieste infekcie prispieva k patogenéze ochorenia. Až v 60 % prípadov spolu s *A. fumigatus* sa izoluje aj *Pseudomonas aeruginosa*, ktorého produkované látky pri priamom styku pôsobia na inhibíciu rastu biofilmu *A. fumigatus* (Shirazi *et al.*, 2016).

Nedávno sa dokázalo, že komunikácia medzi mikrobiálnymi druhmi nie je uskutočnená len látkami rozpustnými vo vode, ale zahŕňa aj uvoľňovanie prchavých organických zlúčenín. Dokázala sa stimulácia rastu *A. fumigatus* vďaka produkcii volatilných (prchavých) látok z *P. aeruginosa* (Briard *et al.*, 2016).

Bunková stena sa skladá z rozvetvených a lineárnych sacharidov, hydrofobínov, glykofosfatidylinozitolátov, glykozylovaných proteínov, melanínu, extracelulárnej DNA a sekundárnych metabolitov. Medzi sacharidy patria  $\beta$ -(1,3) a  $\beta$ -(1,4) glukány,  $\alpha$ -(1,3) glukán, chitín, chitozán, galaktomanán a galaktózaminogalaktán.  $\alpha$ -(1,3) glukány *in vitro* agregujú a adherujú hýfy na rôzne povrchy. Galaktomanán a galaktózaminogalaktán hrajú úlohu ochrany a adhézie. Hydrofobíny tvoria vrstvu vonkajšej bunkovej steny a vytvárajú nerozpustné komplexy. Glykofosfatidylinozitolová kotva je posttranslačnou modifikáciou dôležitá pre integritu bunkovej steny. Glykozylátové adhenzíny majú dôležitú stavebnú úlohu kolónií. Melanín je pigment, ktorý chráni genóm pred nežiadúcimi účinkami ionizujúceho žiarenia z prostredia a taktiež zakrýva PAMP, čím nedochádza k cytokínovej odpovedi. Extracelulárna DNA je zodpovedná za integritu biofilmu a zdá sa, že hrá významnú rolu v rezistencii proti antimykotikám (Kaur a Singh, 2013).

Hýfy sú septované s hladkostennými konídiofórmami. Konídiogénne bunky: fialidy vyrastajú z metúl a sú predĺžené, blízko seba. Konídie sú hladké a tvoria reťaz. Makroskopický dôkaz tvorí vegetatívne (čerpá živiny) a vzdušné mycélium (nesie reprodukčné orgány) (Bednář *et al.*, 1996).

Rastie približne 72 hodín pri 37 °C a 40 – 50 °C, je termofilný. Vytvára kolónie so zamatovo hebkým alebo práškovým vzhľadom šedo-zelenej farby (Bednář *et al.*, 1996).



**Obrázok č. 7:** A) Kolónia *A. fumigatus* na Sabouraudovom agare, B) Mikroskopický dôkaz *A. fumigatus*

**Zdroj:** (Fun with microbiology. *Aspergillus fumigatus* [online], 2012).

Môže spôsobovať alergické reakcie vrátane alergickej bronchopulmonárnej aspergilózy alebo akútne a chronické invazívne aspergilózy. Alergická bronchopulmonárna aspergilóza je spôsobená hypersenzitivitou na *A. fumigatus*, môže viesť až k pľúcnej fibróze, čo sa najčastejšie vyskytuje u astmatikov alebo pacientov s cystickou fibrózou. Invazívna aspergilóza sa vyskytuje hlavne u pacientov s ťažkým imunodeficitom. Chronická nekrotizujúca pľúcna aspergilóza sa vyskytuje vzácnejšie u pacientov s chronickými pľúcnymi chorobami a s miernym imunodeficitom. Vyvíja sa pomaly, ide o lokálnu inváziu, kde vzniká dutina vyplnená *A. fumigatus*. Aspergilóm je najčastejším ochorením, jeho predisponujúcim faktorom sú pre-existujúce dutiny po tuberkulóze a rôznych pľúcnych infekciách (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Produkuje rôzne mykotoxíny, najhlavnejším je gliotoxín, ktorý patrí medzi sekundárne metabolity. Gliotoxín inhibuje fagocytárnu schopnosť neutrofilov, indukuje apoptózu monocytov a dendritických buniek. Spolu s fumagilínom a helvolickou kyselinou uľahčuje infekciu inhibíciou aktivity pľúcnych epiteliálnych buniek (Hof a Kupfahl, 2009).

Diagnostika *A. fumigatus* sa opiera o biopsiu napadnutého tkaniva, röntgenové vyšetrenie a o senzitivnejšiu počítačovú tomografiu pľúc. Samotné zobrazovacie metódy sú v kombinácii s inými metódami dostatočne senzitivne. Oproti kandidám je hematogénne šírenie raritné a záchyt pozitívnej hemokultúry je výnimočný (Drgoňa,

2013). Na rozdiel od kandid, kde je základom diagnostiky mikroskopia, u aspergilových ochorení sú to sérologické markery.

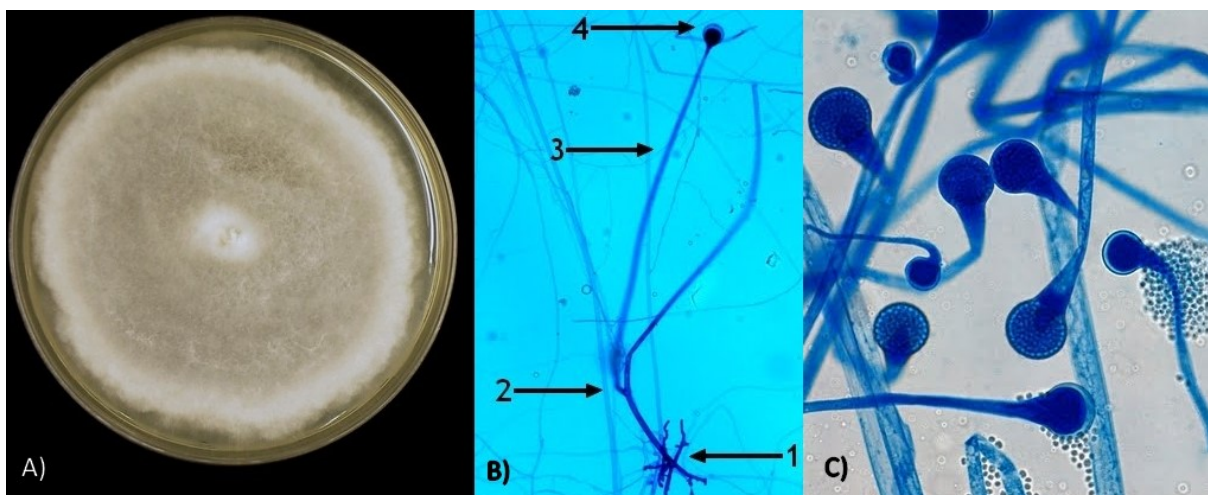
Pri odobratí bronchoalveolárnej laváže sa používa metóda ELISA s monoklonálnou protilátkou proti aspergilovému galaktomanánu (aspergilový antigén), senzitivna je aj PCR metóda, ktorá však nie je štandardizovaná. FDA schválila Limulus assay, čo je diagnostická, kolorimetrická metóda pre nepriame spektrofotometrické stanovenie (1-3)- $\beta$ -D-glukánu zo séra. Je to stanovenie amébocytového lyzátu z hrotnáča, kde glukán aktivuje koagulačný enzým, ktorý štiepi chromogénny substrát na detekovateľný produkt. Je nutná kombinácia s inými metódami, pretože D-glukán je panfungálny antigén (Barton, 2012; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Napriek dominancii pľúcnych foriem, netreba zabúdať na mimopľúcne formy, kde postihnutý môže byť akýkoľvek orgán, ale najčastejšie sú to prínosné dutiny, koža a CNS. Vyžadujú odlišnú diagnostiku a aj terapeutický prístup, kde je často potrebný chirurgický zákrok (Drgoňa, 2013).

#### **6.2.4 *Absidia corymbifera***

Je ubikvitárna, nachádza sa v pôde a rozkladajúcej sa vegetácii. Vyvoláva ochorenia nazývané murkomykózy alebo zygomykózy, ktorých sa zúčastňujú aj pôvodcovia rodov *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* a *Cunninghamella*. Po aspergilózach, sú zygomykózy druhými najčastejšími mykózami spôsobenými vláknitými hubami. Zygomykózy dosahujú 75 – 80% úmrtnosť a ohrození sú hlavne imunokompromitovaní pacienti (Eucker *et al.*, 2001).

Kultivácia trvá 3 – 4 dni, vytvára biele až svetlo šedé, má pomerne vysoké nárasty s vlnitou štruktúrou. Spodok kolóny je bezfarebný. Hýfy sú neseptované a relatívne široké (6 – 15  $\mu$ m), spóry nie sú voľné, ale uzatvorené v guľovitom sporangiu (endospóry). Vzdušné mycélium obsahuje často rizoidy (pakorienky). Charakteristicky sporangiofóry vyrastajú medzi jednotlivými rizoidmi, nie priamo z nich. Pomerne dlhý sporangiofór sa na konci rozširuje a vytvára kužeľovitú apofýzu. Sporangium má hrubkovitý tvar a obsahuje sporangiospóry (Hospenthal a Rinaldi, 2015).



**Obrázok č. 8:** A) *A. corymbifera* na Sabouraudovom agare, B) 1 – rizoid, 2 – začiatok rastu sporangiofóru, 3 – sporangiofór, 4 – sporangium, C) Sporangia

**Zdroj:** (Fun with microbiology. *Absidia corymbifera* [online], 2012).

Je termofilná, rastie na väčšine pôd, ktoré neobsahujú cykloheximid. Pre záchyt sa odporúčajú média s gentamicínom a chloramfeniklom k zábrane rastu baktérií. Ako primárne izolačné médium sa najčastejšie používa Sabouraudov agar (Eucker *et al.*, 2001).

Pôvodcovia zygomykóz sú primárne rezistentní k vorikonazolu. Patogenéza ochorenia je podobná ako u aspergilov. Ochorenie sa rozvíja najčastejšie inhaláciou sporangiospóry. Spóry sa môžu zachytiť v horných dýchacích cestách alebo môžu prejsť pľúcnyimi alveolami, kde u oslabených pacientov dochádza ku germinácii spór, k rastu hýf a k formovaniu mycélia.

Rád *Mucorales* má vysokú afinitu pre inváziu do krvného riečiska, čo vedie k ischemii a trombóze postihnutého orgánu, k vaskulotropizmu dochádza hlavne u pacientov trpiacich neutropéniou. Ohrození sú pacienti s diabetickou ketoacidózou, terapiou glukokortikoidmi, po transplantácii orgánov, chemoterapia, HIV pozitívny a narkomani. Nástup príznakov je rýchly a pacienti podľahnú ochoreniu v priebehu niekoľkých dní (Eucker *et al.*, 2001).

Pľúcna forma je komplikáciou leukémie, lymfómu a granulocytopenie. Rinocerebrálna forma postihuje nos, paranasálne dutiny, očnénice a mozog, dochádza k nej

hlavne pri diabete a transplantáciach. Ďalej sú to bronchiálne, gastrointestinálne a kožné formy. Zo všetkých foriem môže vzniknúť diseminácia (Bednár *et al.*, 1996).

Klinicky je veľmi ťažké odlíšiť zygomykózu od aspergilózy. Diagnostika je založená na morfológickom dôkaze hýf najčastejšie zo spúta, exudátu, sterov alebo biopsí. *In vivo* je vzácny nález mycélia alebo sporangiofórov. V tkanive sú nepravidelného tvaru, široké 6 – 25  $\mu\text{m}$  s neseptovanými hýfami, ktoré sú rozvetvené do pravého uhla, na rozdiel od zástupcov rodu *Aspergillus* so septovanými hýfami a vetvením s ostrými uhlami. Infiltrácia hýf sa často nachádza v blízkosti krvných ciev napadnutého orgánu alebo v mieste trombolizmu. Sérológia nie je uvedená do rutinej klinickej praxe. Z molekulárne biologických metód sa využíva PCR a sekvenovanie (Eucker *et al.*, 2001).

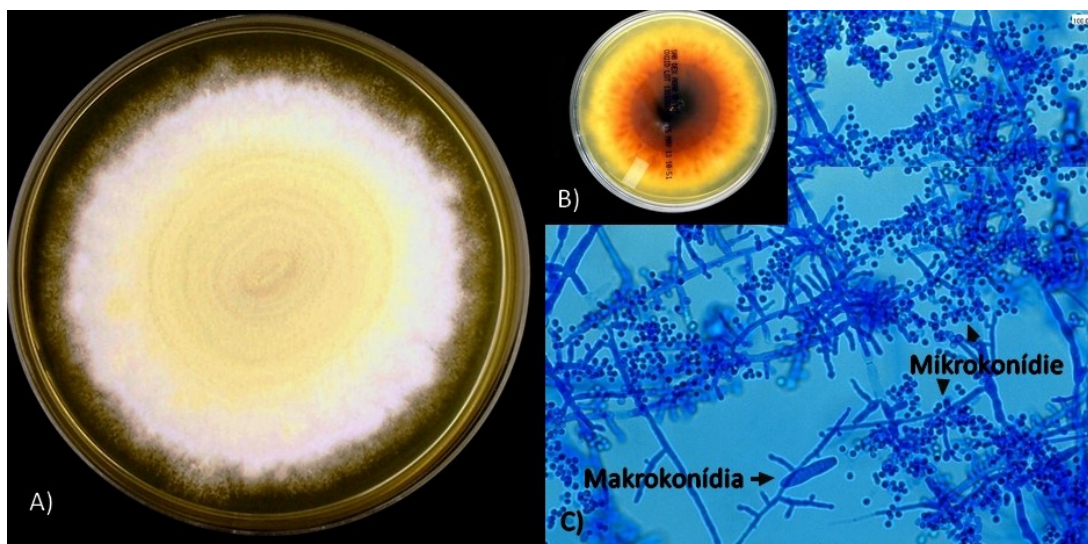
### **6.2.5 *Trichophyton mentagrophytes***

Je to kozmopolitný dermatofyt, ktorý pre rast potrebuje keratín a spôsobuje povrchové infekcie kože, vlasov a nechtov. Antropofilné izoláty preferujú ľudí, zatiaľ čo zoofilné primárne infikujú hlavne drobné zvieratá (Richardson a Warnock, 2003).

Kultivácia trvá stredne dlho 6 – 10 dní pri 26 °C. Antropofilný izolát má nadýchanú, vatovitú až práškovitú štruktúru, zoofilný má viac zrnitejší vzhľad. Kolónie majú bielu, krémovú až nažltlú farbu. Farba zo spodnej strany môže byť žltá, červenohnedá, hnedá až okrová (Richardson a Warnock, 2003).

*T. mentagrophytes* produkuje septované hýfy, z ktorých sa rozvetvujú konidiofóry. Typické sú sférické reprodukčné mikrokonídie (2 – 4  $\mu\text{m}$ ), ktoré kolóniám dodávajú práškovitý vzhľad. Majú guľatý až hruškovitý tvar a neležia priamo na konidiofóre. Makrokonídie (6 – 50  $\mu\text{m}$ ) sú vzácnejšie, majú podlhovastý tvar cigary. Sú tenkostenné s hladkým povrchom, zväčša sa skladajú z 3 – 6 buniek a nachádzajú sa skôr v mladších kultúrach. U niektorých kmeňov sú prítomné stočené hýfy (Leboffe a Pierce, 2011; Fun with microbiology. *Trichophyton mentagrophytes* [online]., 2013).





**Obrázok č. 9:** A) *T. mentagrophytes* na Sabouraudovom agare, B) Opačná strana kolónie *T. mentagrophytes*, C) Mikroskopická kolónia *T. mentagrophytes*

**Zdroj:** (Fun with microbiology. *Trichophyton mentagrophytes* [online], 2013).

Najčastejšie infikuje nohu, ale i iné oblasti. *Tinea pedis*, ochorenie je známe tiež ako atletická noha, je mykotické interdigitálne ochorenie. Prejavuje sa odlupovaním kože, prasklinami v pokožke a svrbivosťou. Hyperkeratotická forma sa nazýva tzv. mokašínový typ, charakteristická červenými ložiskami, ktoré sa olupujú. Najčastejší je výskyt na päte alebo po hranách chodidla. Výsevy vezikúl a pustúl sú typické pre vezikulobulóznu formu, ktorú sprevádza silné svrbenie a často vzniká sekundárna bakteriálna infekcia. Taktiež spôsobuje *tinea capitis*, onychomykózy a ďalšie (Skořepová, 2003).

Hlavnou metódou diagnostiky je mikroskopický dôkaz. Používajú sa natívne preparáty s KOH najčastejšie s MYCO-Ink, fluorescenčným farbením alebo Gram-Weigertom. Z biochemického hľadiska *T. mentagrophytes* štiepi ureázu na rozdiel od *T. rubrum*. *In vitro* test perforácie vlasu slúži na rozlíšenie *T. mentagrophytes* od ostatných. Je však zdĺhavý a trvá 1 – 4 týždne. Real-time PCR diagnostika je založená na dvoch sadách primerov navrhnutých na špecifické ITS1 regióny rDNA, v praxi sa však nevyužíva z dôvodu finančnej náročnosti (Ates *et al.*, 2008; Philpot, 2009; Miyajima *et al.*, 2013).

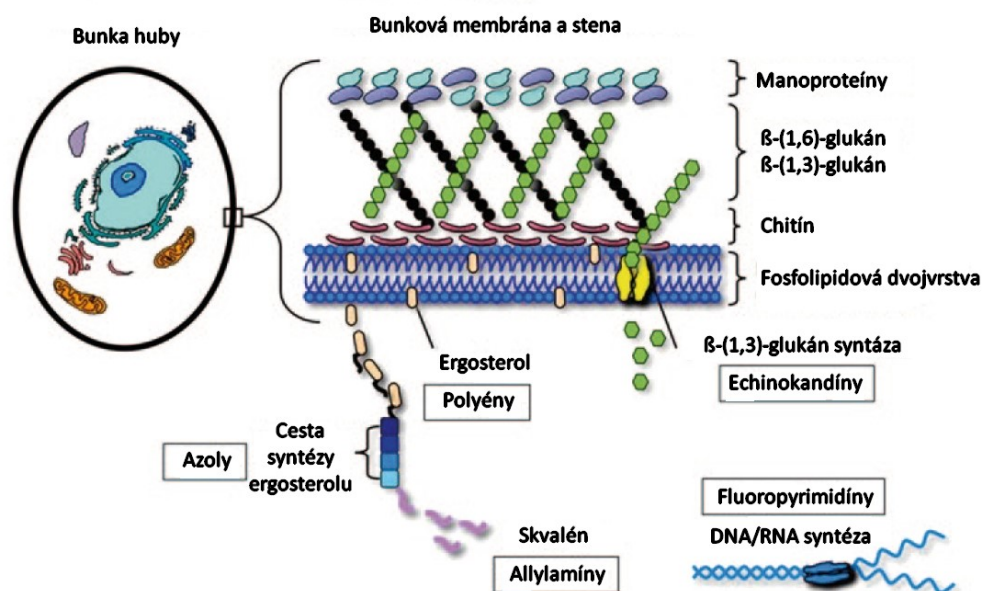
### 6.3 Antimykotiká

V roku 1955 boli po prvý krát objavené polyénové antimykotiká ako nystatín a amfotericín B, ktorých nefrotoxický vedľajší účinok viedol k hľadaniu menej toxických alternatív. V roku 1958 bolo objavené prvé topické azolové antimykotikum chlórmidazol a až v roku 1981 bol objavený ketokonazol, prvý biodostupný systematický azol na orálne použitie (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Neexistuje jedno antimykotikum, ktoré by bolo vhodné pre všetkých pacientov na akúkoľvek formu mykózy. Niektorí pacienti netolerujú niektoré antimykotiká z dôvodu hypersenzitivity, renálnej alebo hepatálnej toxicity a rôznych liekových interakcií (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Výzvou naďalej zostáva vývoj antifungálneho liečiva, ktoré selektívne účinkuje na huby bez poškodenia buniek cicavcov. Napriek rozdielom v skladbe sterolov bunkovej membrány a prítomnosťou bunkovej steny, mnoho bunkových atribútov húb má pozoruhodnú homológiu s bunkami cicavcov. Medzi najdôležitejší rozdiel patrí cholesterol v bunkách cicavcov a ergosterol v bunkách húb (Groll *et al.*, 1998).

Nasledujúca kapitola zahŕňa charakteristiku základných antimykotík, ktoré sú klinicky používané alebo v štádiu klinického testovania.



Obrázok č. 10: Pôsobenie antimykotík (upravené).

Zdroj: (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

### 6.3.1 Polyény

Polyénové antimykotiká sa viažu na ergosterol, čím dochádza k rozrušeniu štruktúry a tým k úniku intracelulárneho obsahu. Nepochybne sa viažu aj k cholesterolu ľudských buniek, hlavne k distálnym tubulom obličiek, čo spôsobuje nefrotoxicitu antimykotík (Groll *et al.*, 1998).

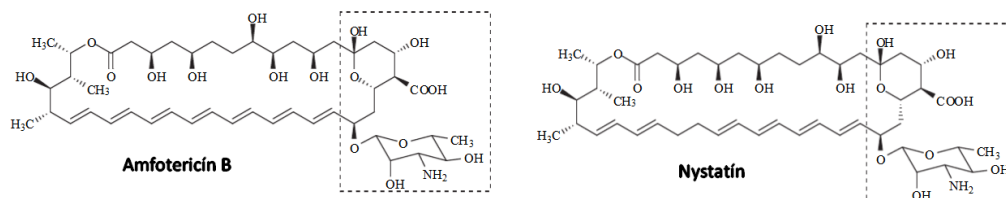
Štrukturálne sú príbuzné antibiotikám makrolidom s 14 – 16 členným kruhom. Objemnejší 26 – 40 členný laktónový kruh je vytvorený hydrofilným polyhydroxylovým reťazcom a lipofilným polyénovým uhl'ovodíkovým fragmentom. Medzi tetraény zaraďujeme nystatín a natamycín a medzi heptaény patrí amfotericín B. Sú nerozpustné vo vode, po parenterálnom požití sú toxické a perorálne sa nevstrebávajú, teda sa podávajú len intravenózne. Majú najširšie spektrum účinnosti (Doležal a Buchta, 2006).

**Amfotericín B** je štandardne používaný pri život ohrozujúcich invazívnych mykózach. Je účinný proti rodom ako napríklad *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Histoplasma* a pri zygomykózach (rody *Rhizopus*, *Mucor* a iné). Najvyššia koncentrácia je v obličkách, pečeni, slezine, srdci a skeletálnych svaloch. Profylakticky sa podáva pacientom po onkologickej liečbe s horúčkami a granulocytopéniou (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Predchádzaním nefrotoxicity lieku sa používajú liekové formy na lipidovom nosiči: lipozomálny amfotericín B (AMBISOME), lipidový komplex (ABELCET) alebo koloidná disperzia (AMPHOCIL) (Hospenthal a Rinaldi, 2015). Líšia sa farmakokinetickými vlastnosťami, čo umožňuje podávať niekoľkonásobné dávky liečiva s výrazným poklesom frekvencie vedľajších príznakov. Väzba amfotericínu B na cholesterol membrán buniek cicavcov je podstatou jeho nefrotoxicity. Príkladom sú veľké molekuly ABLC, ktoré sú vychytávané bunkami RES, čím dochádza k uvoľneniu voľnej aktívnej formy amfotericínu B z lipidového nosiča až pomocou fosfolipáz produkovaných hubami (Haber, 2000).

**Nystatín** a **natamycín** slúžia na topické použitie v terapii slizničných kandidóz. Spektrum pôsobenia je podobné ako pri amfotericíne B. Vývojom lipozomálneho nystatínu sa odstránila jeho vysoká toxicita, čím sa umožnilo bezpečné používanie aj pre pacientov s intoleranciou na amfotericín B. Nystatín sa prirodzene nachádza ako produkt baktérie *Streptomyces noursei* (Richardson a Warnock, 2003; Offner *et al.*, 2004).

Primárne rezistentné rody voči amfotericínu B sú *Trichosporon*, *Fusarium*, ale aj *Aspergillus terreus* a iné. Viacerými mechanizmami primárnej rezistencie proti polyénom disponujú hlavne huby s nízkym obsahom ergosterolu. Sekundárne rezistentné kvasinky a vláknité huby sú vzácne napriek dlhej dobe používania antimykotika (Perea a Patterson, 2002).



**Obrázok č. 11:** Amfotericín B a nystatín A<sub>1</sub>

**Zdroj:** (Zotchev, 2014).

Medzi novšie preparáty, ktoré sú v štádiu testovania patrí napríklad **antifungalmycín** so štyrmi dvojitými väzbami, ktorý inhibuje rast mycélia *Rhizoctonia solani* (Xiong *et al.*, 2013).

**Selvamicín** je atypický polyén pochádzajúci z baktérie rodu *Pseudonocardia*, ktorý má za úlohu ochraňovať mraveniská pred hubovými ochoreniami. Štruktúrne je podobný amfotericínu B a nystatínu A<sub>1</sub>, naviac obsahuje dva typy cukrov, 6-deoxymanózu a 4-*O*-methyldigitoxózu (Ruzzini a Sit, 2016).

### 6.3.2 Azoly

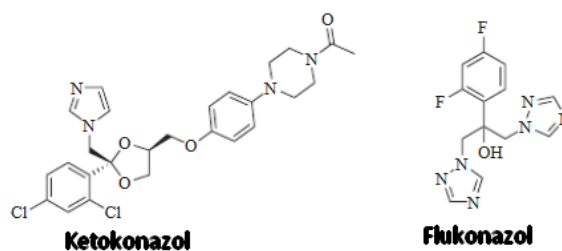
Nepriamo ovplyvňujú bunkovú membránu húb inhibíciou biosyntézy ergosterolu. Inhibujú enzým cytochrómu P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylázu (Erg11p alebo CYP51p), ktorá katalyzuje oxidatívne odstránenie 14 $\alpha$ -methyl skupiny lanosterolu v ceste syntézy ergosterolu. Dochádza tak k nahromadeniu metylovaných sterolov v cytoplazmatickej membráne, čo narúša fosfolipidovú dvojvrstvu, ovplyvňuje membránovo-viazané enzýmové systémy ako ATPázu a enzýmy elektrónového transportu, čím sa zabraňuje rastu bunky. Väzba na enzým CYP51p sa uskutočňuje pomocou koordinácie triazolu N3 alebo imidazolu N4 azolového kruhu s cytochrómom P450 (Odds *et al.*, 2003).

Nevýhodou je, že cieleňé hubové enzýmy cytochrómu P450, ktoré sú zapojené do biosyntézy ergosterolu, sú homológne s enzýmovým systémom cytochrómu P450 u cicavcov, ktorý sa podieľa na metabolizme liekov (Brüggemann *et al.*, 2009).

Medzi azoly odvodené od imidazolu zaraďujeme **ketokonazol**, **mikonazol**, **klotrimazol** atď. Majú v heterocykle dva uhlíky a používajú sa skôr lokálne (okrem ketokonazolu – perorálne). Molekuly odvodené od ketokonazolu (napr. **itrakonazol**, **posakonazol**) majú predĺžený postranný reťazec, ktorý zosilňuje väzbu azolu na cytochróm P450 a rozširuje spektrum v boji proti kvasinkám, vláknitým hubám, grampozitívnym kokom a trichomonádami. Široké používanie ketokonazolu prispelo k vývoju skrížene rezistentných kmeňov ako napr. *C. glabrata* aj voči flukonazolu a itrakonazolu. Ketokonazol je vysoko lipofilná slabá báza, preto nie je vhodný pre pacientov so zvýšeným žalúdočným pH, pred elimináciou vyžaduje biotransformáciu v cytochróme P450, čím je náchylný k interakciám s ostatnými liekmi (Doležal a Buchta, 2006; Volleková, 2012).

Medzi azoly odvodené od triazolu zaraďujeme flukonazol, intrakonazol, posakonazol, terkonazol a deriváty odvodené od flukonazolu (napr. vorikonazol), ktoré obsahujú  $\alpha$ -O-methylovú skupinu, ktorá im dodáva aktivitu proti rodu *Aspergillus* a ostatným vláknitým hubám. V heterocykle majú tri uhlíky.

**Flukonazol** je systémový fluorovaný derivát a najlepšie tolerovateľný liek s vysokou biodostupnosťou, rozpustnosťou, menšou väzbou na proteíny a širokou distribúciou vrátane očí, cerebrospinálnej tekutiny a moču. Ako aj ostatné azoly, je eliminovaný primárne v nezmenenej forme obličkami a tak spôsobuje menej liekových interakcií. Je najčastejšie predpisovaným antimykotikom na povrchové a život ohrozujúce infekcie spôsobené kvasinkami. Používa sa na kvasinkové infekcie spôsobené rodmí *Candida* (okrem *C. krusei* s prirodzenou rezistenciou) a *Cryptococcus*. Zníženú citlivosť má rod *Trichosporon*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* a iné. Rod *Aspergillus* je primárne rezistentný k flukonazolu. *A. fumigatus*, *A. niger* a *A. versicolor* sú rezistentné často ku ketokonazolu aj itrakonazolu vďaka širokému používaniu azolových fungicídov v poľnohospodárstve (Verweij *et al.*, 2009; Volleková, 2012; Hospenthal a Rinaldi, 2015).



**Obrázok č. 12:** Ketokonazol a flukonazol

**Zdroj:** (Sangshetti *et al.*, 2011).

**Vorikonazol** je metylovaný analóg flukonazolu so zvýšenou aktivitou proti kvasinkám, vláknitým hubám vrátane rodov *Aspergillus* a *Fusarium* a proti non – *candida* kvasinkám ako *Cryptococcus neoformans* a *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré vykazujú vyššiu citlivosť a menšiu rezistenciu k vorikonazolu ako k flukonazolu. Rovnako ako flukonazol, je dobre absorbovaný orálne, má menšiu väzobnú schopnosť k proteínom a širokú distribúciu. Štrukturálne má jeden triazolový kruh nahradený fluórpyrimidínovým, čím má účinky podobné itrakonazolu. Podobne ako itrakonazol je rozpustený v cyklodextríne a je metabolizovaný na neaktívne metabolity. U pacientov môže spôsobiť pri 15 – 30 % fotofóbiu s rozmazaným videním. Dlhodobé požívanie môže spôsobiť až halucinácie a aktinickú keratózu (Doležal a Buchta, 2006; Hospenthal a Rinaldi, 2015; Mandras *et al.*, 2015).

**Itrakonazol** je lipofilný systémový triazol, ktorý bol kedysi podávaný len perorálne, intravenózne podanie bolo možné až rozpustením v cyklodextríne. Používa sa proti rodom *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces* a *Aspergillus*. Je lipofilný s vysokou schopnosťou väzby na proteíny, dlhým polčasom rozpadu a limitovanou distribúciou (moč, cerebrospinálna tekutina). Je metabolizovaný v pečeni a menej v črevách na hydrofilné metabolity ako je napríklad hydroxyitrakonazol, ktorý má silnú antifungálnu aktivitu (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

Podobne ako pri flukonazole narastá počet rezistentných a skrížene rezistentných kmeňov kvasiniek, hlavne *C. glabrata* (25 – 70 %) z izolátov od osôb s AIDS a onkologických pacientov. Dermatofyty ako *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* a *T. tonsurans* sú rezistentné k flukonazolu, itrakonazolu a ketokonazolu. Rod *Fusarium*

je primárne rezistentný k azolom (flukonazol, ketokonazol a 50 % k itrakonazolu) (Tosti *et al.*, 2000; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

**Posakoazol** je hydroxylovaný analóg itrakonazolu so zvýšenou aktivitou voči rodom *Aspergillus*, *Fusarium* a hlavne proti pôvodcom zygomykóz. Je dostupný perorálne aj intravenózne, je široko distribuovaný a má vysokú schopnosť viazať sa na proteíny. Eliminácia je predovšetkým stolicou v nezmenenej forme a v moči vo forme neaktívnych metabolitov (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

**Terkonazol** je topický triazol, ktorý má účinnosť predovšetkým proti kandidám a neinhibuje rod *Lactobacillus*. Preto sa hlavne používa na liečbu vaginálnych kandidóz vo forme čapíkov (Volleková, 2012).

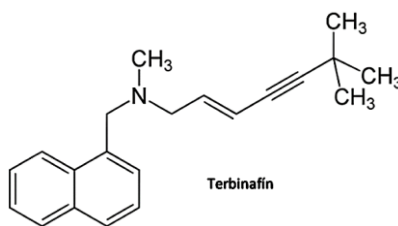
**Isavukonazol** je novým triazolom so širokospektrým antifungálnym účinkom. Dostal so do tretej fázy klinického testovania, kde v porovnaní s vorikonazolom bol lepšie tolerovateľný, s menším prejavom nežiadúcich účinkov a s rovnakým antifungálnym účinkom. FDA ho schválila pre liečbu invazívnych aspergilóz a zygomykóz v perorálnej aj intravenózne forme (Schwenker, 2015; Maertens *et al.*, 2016).

### 6.3.3 Allylamíny

Sú príbuzné azolom, nezávisle od cytochrómu P450 inhibujú biosyntézu ergosterolu pomocou inhibície skvalén monooxygenázy. Funkciou enzýmu je biodegradácia skvalénu na 2,3-oxidoskvalén s epoxidovou skupinou, čo je zásadným krokom k syntéze lanosterolu. Bunková membrána akumuluje skvalén, ktorý zvyšuje permeabilitu membrány a dochádza k nedostatku ergosterolu, čím sa zabraňuje rastu bunky. Spektrum účinku je na dermatofyty (rod *Trichophyton*), vláknité huby (rody *Aspergillus*, *Fusarium* a iné), u kvasiniek je to len u *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Medzi zástupcov patrí terbinafín a naftifín, ktorý sa podáva vo forme dermálneho krému (Volleková, 2012; Hospenthal a Rinaldi, 2015).

**Terbinafín** pôsobí fungicídne na dermatofyty a fungistaticky na *C. albicans*. Po orálnom podaní sa rýchlo akumuluje do tukových a keratinizovaných tkanív, v nechtach sa udrží 3 – 9 mesiacov po skončení užívania, preto sa používa vo veľkej miere na liečbu onychomykóz. Topické formy sú určené na liečbu dermatofytóz a pityriasis versicolor (Volleková, 2012; Heizerová, 2013).

Okrem *C. albicans* a *C. parapsilosis* sú k allylamínom ostatné kvasinky rezistentné alebo majú zníženú citlivosť. Z dermatofytov je *T. rubrum* primárne rezistentný. Sekundárne rezistentné kmene sú raritné (Mukherjee *et al.*, 2003; Volleková, 2012).



**Obrázok č. 13:** Terbinafín

**Zdroj:** (Medical Cheat Sheets, 2011)

### 6.3.4 Echinokandíny

Sú to deriváty mastných kyselín a cyklických hexapeptidov. Špecificky zasahujú do syntézy bunkovej steny cez inhibíciu syntézy 1,3- $\beta$ -D-glukánových polymérov, ktoré sú esenciálnym spojníkom komponentov bunkovej steny, čím dochádza k osmotickej nestabilite a lýze buniek. Podobnými inhibítormi sú papulakandín a pneumokandín (Hospenthal a Rinaldi, 2015).

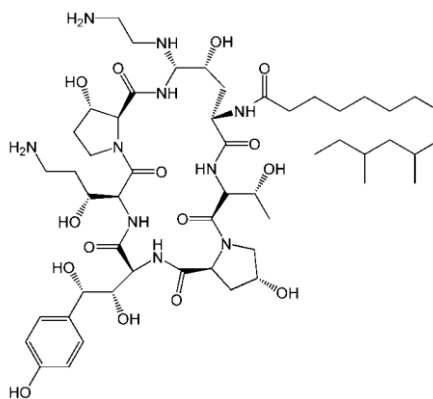
Stupeň 1,3- $\beta$ -D-glukánovej polymerizácie v bunkovej stene a expresia 1,3- $\beta$ -D-glukánovej syntázy rozhoduje o spektre a letálnom účinku echinokandínov na huby. Echinokandíny sú účinné hlavne pre rastúce kandidy, ktoré sú bohaté na glukán. Neúčinné sú pre *Cryptococcus neoformans* a zygomycéty vzhľadom k obmedzenému množstvu glukánu (Hector, 1993).

Rod *Aspergillus* obsahuje veľké množstvo 1,3- $\beta$  a 1,6- $\beta$ -D-glukánových polymérov, kde 1,3- $\beta$ -D-glukán je syntetizovaný hlavne na rastúcich vrcholkoch hýf, proti ktorým majú echinokandíny účinok, čím dochádza k abnormálnemu vetveniu a rastu s minimálnym účinkom na ostatné komponenty (Kurtz *et al.*, 1994).

Medzi schválené látky patrí kaspofungín, mikafungín a anidulafungín, čo sú semisyntetické lipopeptidy, ktoré sa podávajú len intravenózne. Majú dobrú distribúciu do tkanív a predĺžený polčas rozpadu, čo umožňuje užívanie len raz denne.



**Kasprofungín** pochádzajúci z pneumokandínu B<sub>0</sub> je indikovaný pri kandidózach a aspergilózach. Pri rode *Aspergillus* sa stanovuje MEC, čo je minimálna efektívna koncentrácia, ktorá spôsobí abnormálny rast hýf, čiže má fungistatickú aktivitu. Rezistencia je prítomná často u *C. glabrata* (Hospenthal a Rinaldi, 2015; Alexander *et al.*, 2013).



**Obrázok č. 14:** Kasprofungín

**Zdroj:** (Denning, 2003).

**Mikafungín** slúži na liečbu ezofágovej kandidózy a ako profylaxia invazívnych kandidóz. Je vhodný aj pre flukonazol rezistentné kandidy. Nevyžaduje úpravu u pacientov s renálnym alebo hepatálnym poškodením a je dobre tolerovateľný aj u pediatrických pacientov (Joseph *et al.*, 2007).

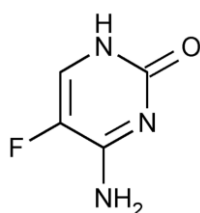
### 6.3.5 Pyrimidíny

Flucytozín (5-fluorocytosín, 5-FC) je fluorovaný pyrimidínový derivát s antimykotickým účinkom vďaka konverzii na 5-fluorouracil vo vnútri bunky húb pomocou dvoch enzýmov, cytozín permeázy a cytozín deaminázy. Inhibuje thymidylát syntázu, kľúčový enzým v DNA syntéze a inkorporuje sa do RNA ako kyselina 5-fluorouridylová, čím spôsobí predčasnú termináciu reťazca (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Ľudské bunky a bunky vláknitých húb neobsahujú dostatok cytozín deaminázy, čím toto antimykotikum je účinné selektívne pre kvasinky a kryptokoky. Problémom je,

že prirodzená intestinálna mikrobióta môže konvertovať flucytozín na fluorouracil, čím vznikajú nežiadúce účinky ako nevoľnosť, vracanie a hnačky. Často sa užíva v kombinácii s amfotericínom B a inými antimykotikami (Groll *et al.*, 1998).

**Flucytozín** je jediné schválené pyrimidínové antimykotikum na liečbu invazívnych mykóz. Vo forme kapsúl je dostupný len v USA. Má relatívne úzke spektrum účinku, častá je rezistencia medzi bežnými patogénmi, pri izolátoch kandid je to približne 5 %, u kryptokokov 2 %. Pôvodne bol vyvinutý na chemoterapiu nádorov. Je metabolizovaný v nezmenenom stave cez obličky a môže spôsobovať supresiu kostnej drene (Hospenthal a Rinaldi, 2015).



**Obrázok č. 15:** Flucytozín

**Zdroj:** (Oceanside Pharmaceuticals, 2014).

### 6.3.6 Ostatné antimykotiká

**Hydroxypiridóny** narúšajú integritu bunkovej membrány blokováním transportu makromolekulárnych prekursorov, inhibujú enzýmy respiračného reťazca bunky, inhibujú proteosyntézu a ovplyvňujú replikáciu a opravy DNA. Zástupcom je ciklopirox, ktorý pôsobí fungicídne a sporicídne na dermatofyty, kandidy a antibakteriálne na mykoplazmy a trichomonády. Aplikáciou iontoforézy sa zvyšuje hladina antimykotika v nechte až desať násobne a je to najúčinnější spôsob liečby onychomykózy (Volleková, 2012).

**Morfolíny** inhibujú až 4 rôzne enzýmy postlanosterol – ergosterolovej cesty. Zástupcom je amorolfín, ktorý je účinný na kvasinky a dermatofyty. Na liečbu onychomykóz sa používa vo forme laku na nechty (Volleková, 2012).

**Grizeofulvín** je produktom *Penicillium griseofulvum* a bol prvým perorálnym antimykotikom s účinkom na dermatofyty. Inhibuje deliace vretienko (mitózu v štádiu

metafázy) a delenie buniek. Po topickej aplikácii sa viaže na keratín, čím vzniká nevhodný substrát pre rast mikromycét (Volleková, 2012).

Medzi **benzylamíny** patrí butenaflín, ktorý má účinok podobný ako allylamíny a to hlavne proti dermatofytom, aspergilom a kryptokokom, slabšie na kandidy. Využíva sa na topickú liečbu a v Slovenskej republike nie je zatiaľ registrovaný (Volleková, 2012).

Medzi novšie preparáty patrí **NB-002**, nanoemulzia (olej vo vode), ktorá obsahuje povrchovo aktívnu látku cetylpyridinium chlorid a pôsobí fungicídne na dermatofyty, inhibuje non – dermatofyty a kvasinky a na rozdiel od iných antimykotík, usmrcuje mycélium a mikrokonídie húb a aj izoláty rezistentné na azoly. Je vhodný na liečbu onychomykóz (Pannu *et al.*, 2009).

## 6.4 Rezistencia

Zvyšujúcim sa počtom mykotických ochorení narastá aj počet rezistentných kvasiniek a vláknitých húb a to hlavne u dlhodobu liečených pacientov. Je nutné odlišiť mikrobiálnu a klinickú rezistenciu.

Mikrobiálna rezistencia je necitlivosť mikroorganizmu k antifungálnej látke zistenej *in vitro* testovaním citlivosti, kde MIC hodnota presahuje hodnotu citlivosti daného nemutovaného kmeňa. **Primárna mikrobiálna rezistencia** je vrodená a je charakteristická chýbaním cieľovej molekuly, je predpovedateľná a nevyžaduje prechádzajúci kontakt s antimykotikom (Hof, 2008).

**Sekundárna mikrobiálna rezistencia** je získaná a môže sa vyvinúť následkom genotypových zmien po vystavení antimykotikom, taktiež zvýšením expresie génov kódujúcich efluxné pumpy a zvýšenou expresiou atakovaných substrátov (Bowyer *et al.*, 2011).

**Klinická rezistencia** je charakterizovaná ako zlyhanie liečby pacienta pri podaní účinného antimykotika s dokázanou *in vitro* aktivitou. Zlyhanie liečby však môže byť spôsobené aj následkom celkového zdravotného stavu pacienta, jeho veku, dodržiavaním liečebného režimu atď. (Kanafani a Perfect, 2008).

Vývoj rezistencie voči jednému antimykotiku nesie riziko vývoju skríženej rezistencie voči viacerým antimykotikám, čo je časté najmä pri azolových antimykotikách (Loeffler a Stevens, 2003).

Kombinovaná antimykotická liečba môže rozšíriť spektrum pokrytia patogénov, zvýšiť efektivitu fungicídneho režimu prostredníctvom synergistického účinku a prekonať farmakokinetické obmedzenia jednotlivých liečiv v liečbe život-ohrozujúcich mykóz napr. v CNS, kde sa odporúča pri kryptokokovej meningitíde kombinované použitie flucytozínu a amfotericínu B (Kontoyiannis a Lewis, 2004).

#### 6.4.1 Mechanizmy vzniku rezistencie

Najčastejšími mechanizmami rezistencie k antimykotikám je zníženie akumulácie účinnej látky vo vnútri bunky, zvýšená produkcia cieľového enzýmu, redukcia afinity lieku k cieľovej molekule alebo modifikácia metabolizmu ako protiváha účinku lieku. Najviac preštudované sú tieto mechanizmy v kvasinkách (Volleková, 2012).

**Tabuľka č. 1:** Mechanizmy účinku a rezistencie vybraných antimykotík.

**Zdroj:** Prevzaté a upravené (Osborne *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2012).

Antimykotikum	Mechanizmus účinku	Mechanizmus rezistencie
Polyény	Väzba k ergosterolu	a) Absencia ergosterolu (strata funkcie mutáciou v <i>ERG3</i> alebo <i>ERG6</i> )  b) Zníženie obsahu ergosterolu v bunke

<b>Azoly</b>	Inhibícia cytochróm P450: 14 $\alpha$ -lanosterol demethylázy ( <i>ERG11</i> ) sterol $\Delta^{22}$ desaturázy ( <i>ERG5</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Eflux pomocou transportérov</li> <li>b) Zníženie afinity k Erg11p mutáciou</li> <li>c) Up-regulácia <i>ERG11</i></li> <li>d) Zmeny v ergosterolovej syntéze</li> </ul>
<b>Allylamíny</b>	Inhibícia skvalén epoxidázy ( <i>ERG1</i> )	Následkom bodovej mutácie a aminokyselinovej substitúcie v enzýme
<b>Morfolíny</b>	Inhibícia enzýmov postlanosterol-ergosterolovej cesty	neznámy
<b>5 – fluorocytózín</b>	Inhibícia syntézy nukleových kyselín	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Defekt v cytozín permeáze</li> <li>b) Nedostatok enzýmov k metabolizmu 5-FC</li> <li>c) Deregulácia pyrimidínovej syntézy</li> </ul>
<b>Echinokandíny</b>	Inhibícia 1,3- $\beta$ -glukán syntázy	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Zmena afinity echinokandínov k 1,3-<math>\beta</math>-glukán syntáze</li> <li>b) Adaptívna odpoveď na stres</li> </ul>

Najviac preskúmaný mechanizmus rezistencie je pri **azoloch**. Na zvýšenom efluxe liečiva sa podieľajú dva druhy púmp, ABC transportéry a MFS transportéry. Za rezistenciu voči antitykotikám zodpovedajú prevažne ABC transportéry, ktoré

využívajú na aktívny prenos antimykotika z bunky energiu z hydrolýzy ATP na ADP a podieľajú sa na transporte širokého spektra substrátov (Mayers, 2009).

Zvýšená produkcia cieľového enzýmu azolov, čiže lanosterol-14 $\alpha$ -demethylázy sa nachádza u *C. glabrata*, kde dochádza k zvýšenej expresii génu *ERG11*, čo má za následok zvýšenie množstva ergosterolu, takže na inhibíciu enzýmu je potreba väčšieho množstva voľných dusíkov z triazolových alebo imidazolových kruhov (Vandeputte *et al.*, 2012).

Modifikáciou enzýmu 14 $\alpha$ -demethylázy, v dôsledku bodovej mutácie génu *ERG11*, dochádza k substitúcií aminokyselín a tým k zníženiu afinity enzýmu k azolovým antimykotikám u *C. albicans*. Primárna rezistencia k azolom u *C. krusei* je taktiež výsledkom obmedzenej afinity 14 $\alpha$ -demethylázy k azolom. Tento typ rezistencie je prítomný aj vo vláknitých hubách ako napríklad v *A. fumigatus* (Kanafani a Perfect, 2008; Vandeputte *et al.*, 2012).

Mechanizmus rezistencie u **echinokandínov** je spojený s bodovými mutáciami v špecifických oblastiach génov kódujúcich *FKS* podjednotky  $\beta(1,3)$ D-glukán syntázy. K mutáciám dochádza v špecifických tzv. hot – spot regiónoch u *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. dubliniensis* (Park *et al.*, 2005; Perlin, 2007).

Ďalším mechanizmom rezistencie je iniciácia aktivity rôznych dráh adaptívnej odpovede na stres. *In vitro* štúdie dokázali, že pri rode *Candida* dochádza k zvýšenej syntéze chitínu ako odpoveď na inhibíciu  $\beta(1,3)$ D-glukán syntázy, čo je sprostredkované viacerými cestami (dráhami) bunkovej membrány, ako množstvom proteín kinázy C, vysoko-osmolárneho glycerolu alebo aktiváciou Ca<sup>2+</sup> signálnej dráhy (Munro *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2008).

## **6.5 *In vitro* stanovenie antimykotickej citlivosti**

Štandardizované metódy *in vitro* testovania citlivosti k antimykotikám sú medzinárodne dostupné a vypracované organizáciami ako je CLSI (Clinical and laboratory standards institute) pre USA a EUCAST (European committee on antimicrobial susceptibility testing) pre Európu. Dáta získané z týchto štandardizovaných

testov spolu s ostatnými informáciami slúžia pre výpočet klinických a mikrobiologických breakpointov (Pfaller, 2012).

Údaje v EUCAST a CLSI sa vo väčšine prípadov zhodujú. Pri dilučných metódach sa odlišujú hustotou inokula (cfu/ml), obsahom glukózy v médiu, tvarom dna jamiek platničky, časom inkubácie a spôsobom hodnotenia MIC (Mallátová *et al.*, 2011).

Mikrobiologický breakpoint (epidemiological cut-off values alebo hraničná epidemiologická hodnota) je odvodený od distribúcie kvantitatívnych výsledkov fenotypového testu citlivosti kmeňov s normálnym fenotypom (wild type), má objektívny a nemenný charakter. Oddeľuje divokú populáciu od kmeňov so získanou rezistenciou (Kahlmeter *et al.*, 2003; Pfaller, 2012).

Klinický breakpoint (hraničná hodnota alebo koncentrácia) je stanovený dohodou a môže sa zmeniť s dokázanými zmenami okolností a novými poznatkami. Napríklad pri MRSA bol vymenený disk oxacilínu za spoľahlivejší disk s cefoxitínom a následne sa zmenil breakpoint aj priemer inhibičnej zóny (Kahlmeter *et al.*, 2003; EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* [online], 2010).

Tento rok pre zisťovanie citlivosti rodov *Candida* a *Aspergillus* boli pridané breakpointy pre isavuconazol (EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs* [online], 2017).

Na základe klinických breakpointov môže byť kmeň definovaný ako:

- Citlivý (S): pravdepodobnosť úspechu liečby
- Rezistentný (R): pravdepodobnosť zlyhania liečby
- Intermediárne rezistentný (I): úspech liečby je neistý (EUCAST. *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts* [online], 2017).

Breakpointy u dilučných metód sú vyjadrené hodnotou minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) v mg/l, u diskovej difúznej metódy priemerom inhibičných zón v mm. Tieto hodnoty CLSI každoročne v januári aktualizuje písomnou formou a podliehajú prísny autorským právam. Breakpointy EUCAST sú k dispozícii aktuálne a sú verejne dostupné na internete (Urbášková *et al.*, 2010).

## 6.5.1 Kvalitatívne stanovenie

Nachádza uplatnenie hlavne pri rutinnom screeningu citlivosti mikroorganizmov k antimykotikám. Pri správnom prevedení metódy dochádza k vysokej zhode medzi výsledkami diskovej difúznej metódy a výsledkami kvantitatívnych dilučných metód. Umožňujú rozdeliť kmene na citlivé, rezistentné a intermediárne rezistentné. Patrí sem diskový difúzny test, ktorý je štandardizovaný pre flukonazol, vorikonazol, posakonazol a kaspofungín (Mallátová *et al.*, 2011; Bursová *et al.*, 2014a).

### 6.5.1.1 Diskový difúzny test

Po prvý krát bola táto metóda štandardizovaná v roku 1954 ako *paper disk method*. Jej princípom sú fyzikálno-chemické zákony dynamiky šírenia antimykotika na základe rastu mikroorganizmov na Mueller-Hinton agare, ktorý umožňuje lepšiu difúziu antimykotika (Bursová *et al.*, 2014a).

Z vyšetrovacieho kmeňa sa pripraví suspenzia vo fyziologickom roztoku s hustotou 0,5 McFarlandového zákalu, čo je približne  $1 - 5 \times 10^6$  cfu/ml. Táto suspenzia sa očkuje na agar dvoma metódami, a to pomocou tampónu v dvoch na sebe kolmých smeroch alebo pomocou rozliatia cca 2 ml suspenzie na agar s následným odobraním prebytočnej tekutiny (Votava *et al.*, 2010).

Na naočkovaný agar sa kladú pomocou ihly alebo dispenzoru (dávkoča) papierové disky s priemerom cca 6 mm a obsahom antimykotika, ktoré začne difundovať do agaru a vytvára sa dynamicky meniaci sa gradient koncentrácie antimykotika. Každý disk je farbene rozlíšený, označený skratkou a na jednu platňu je možné pridať maximálne 6 diskov. Pôda s diskami sa inkubuje dnom nahor cca 18 hodín pri 37 °C. Okraj inhibičnej zóny vzniká tam, kde je koncentrácia antimykotika ešte schopná inhibovať rastúci mikroorganizmus (Votava *et al.*, 2010; Bursová *et al.*, 2014a).

Výsledok sa určí odmeraním priemeru inhibičnej zóny. Priemer sa musí porovnať hraničným priemerom inhibičnej zóny v tabuľkách. Ak nedochádza k vytvoreniu inhibičnej zóny, je výsledkom zóna o veľkosti 6 mm, nie 0 mm, pretože sa zaráta aj veľkosť vrátane disku. Ak kmeň vytvorí inhibičnú zónu s rovnakým alebo väčším priemerom ako je hraničný priemer zóny pre citlivé kmene, pokladá sa za citlivý



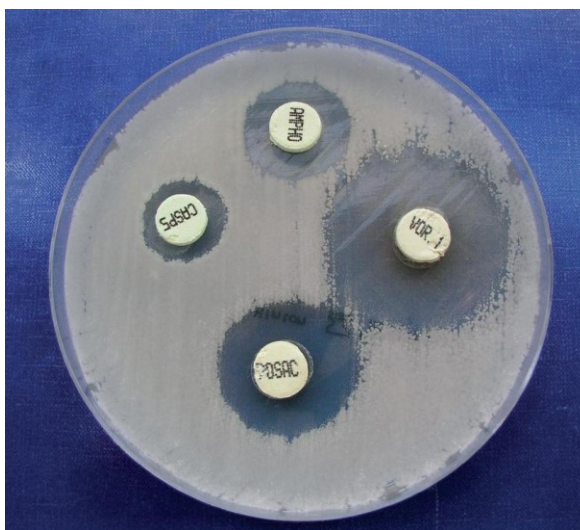
k danému antimykotiku. Vytvorenie inhibičnej zóny s menším priemerom sa považuje za rezistenciu (Votava *et al.*, 2010; Bursová *et al.*, 2014b).

Výhodou je jednoduchosť prevedenia bez náročného vybavenia a nízka cena. Nevýhodou je časová náročnosť prípravy agaru, manuálne odčítanie zón a interpretácia (Bursová *et al.*, 2014a).

### 6.5.1.2 *Neo-Sensitabs*

Neo-Sensitabs systém z Dánska je uznávanou variantou k diskovému difúznemu testu, kde namiesto diskov sa používajú tablety so štandardizovaným obsahom antimykotík. Dostupné sú antimykotiká ako amfotericín B, flucytozín, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol a kaspofungín (Mallátová *et al.*, 2011).

Výrobca Neo-Sensitabs™ ponúka výhody v podobe zachovania aktivity antimykotík spôsobenej degradáciou a skladovanie pri izbovej teplote až 5 rokov.



**Obrázok č. 16:** Neo-Sensitabs.

**Zdroj:** (Mallátová *et al.*, 2011).

## 6.5.2 Kvantitatívne stanovenie

Poskytuje spoľahlivé určenie rezistencie či citlivosti kmeňov. Najčastejšie je výsledok vyjadrený ako hodnota MIC (minimálna inhibičná koncentrácia), ktorá inhibuje viditeľný rast mikroorganizmu v mg/l. MIC je dôležitá pre určenie terapeutickkej dávky antimykotika. Medzi najpoužívanejšie metódy patrí dilučná metóda v prevedení na agarových platniach alebo v mikrotitračnej doštičke a E-test (Bursová *et al.*, 2014a).

### 6.5.2.1 Agarová dilučná metóda

Je referenčnou metódou stanovovania citlivosti. Rozpustený Mueller-Hinton agar (45 – 50 °C) je obohatený nariadeným antimykotikom a po zmiešaní je rozlievaný do Petriho misiek s hrúbkou vrstvy 3 – 4 mm. Zvyčajne sa pripravuje 12 – 15 koncentrácií jedného antimykotika riedeného dvojnásobnou geometrickou radou (Bursová *et al.*, 2014b).

Na pôdy po stuhnutí sa očkuje štandardné inokulum vyšetovaných mikroorganizmov formou spotov špeciálnym vzorkovačom. Jedna Petriho miska obsahuje jednu koncentráciu antimykotika a naraz môžeme testovať až 20 rôznych kmeňov (Bursová *et al.*, 2014b).

Po inkubácii sa hodnotí každý kmeň semikvantitatívne tzv. na kríže. Tri kríže (+++) značia splývavý rast, dva kríže (++) rast vo viditeľných kolóniách, jeden kríž (+) ojedinelé kolónie a znamienko mínus (-) bez nárastu. Ako hodnota MIC sa odčíta najnižšia koncentrácia antimykotika, pri ktorom nedošlo v mieste inokulácie k tvorbe viditeľných kolónií (Bursová *et al.*, 2014b).

Výhodou je vysoká štandardizovanosť prevedenia, vyšetovanie väčšieho súboru kmeňov naraz a využíva sa taktiež k hodnoteniu účinnosti nových antimykotík. Nevýhodou je prácnosť metódy, časová aj ekonomická náročnosť (Bursová *et al.*, 2014a).

### 6.5.2.2 *Dilučné metódy*

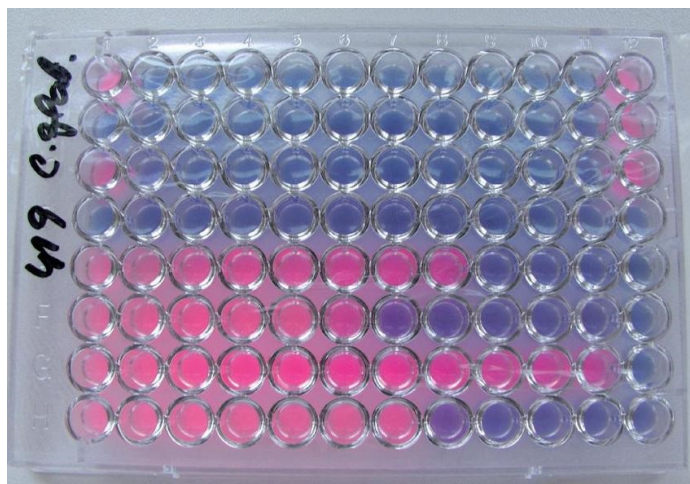
Rozlišujeme makrodilučnú bujónovú metódu v skúmavkách a mikrodilučnú bujónovú metódu v jamkách mikrotitračnej platničky, ktorá je najpoužívanejšia. Je štandardizovaná pre amfotericín B, flucytozín, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a echinokandíny. Doporučené metódy pre rutinné stanovenie MIC antimykotík je Sensititre YeastOne a E-test (Mallátová *et al.*, 2011).

Mikrotitračná platnička má 96 jamiek s guľatým alebo kónickým dnom a slúži pre jeden kmeň. K predchádzaniu kontaminácie rastového média musí byť prítomná negatívna kontrola, ktorá obsahuje v jamke len rastové médium a nedochádza k rastu mikroorganizmu. Pozitívna kontrola bez antimykotika slúži ku kontrole rastu kmeňa. Do ostatných jamiek sa pridáva rastové médium, ktoré obsahuje 12 rôznych koncentrácií antimykotík v 12 stĺpcoch. V 8 riadkoch je 8 rôznych koncentrácií jednotlivých antimykotík pripravených v dvojnásobnej geometrickej rade (Votava *et al.*, 2010).

K riedeniam sa do každej jamky pridáva štandardné množstvo inokula testovaného kmeňa. Nasleduje inkubácia a odčítanie MIC vizuálne alebo readrom, ktorý zmeria hodnotu absorbancie v jamkách a MIC je určená skokovou zmenou hodnoty absorbancie. Pri hodnotení citlivosti vláknitých húb k echinokandínom sa stanovuje hodnota MEC, je to jamka s najnižšou koncentráciou antimykotika, v ktorej dochádza k abnormálnemu rastu malých okrúhlych mikrokolónií z krátkych vetvených hýf v porovnaní so splývavým rastom z dlhých nevetvených hýf v kontrolnej jamke. (Mallátová *et al.*, 2011; Bursová *et al.*, 2014a)

Výhodou je možnosť komerčného zakúpenia, dlhodobé skladovanie až 1 mesiac pri -20 °C, automatické odčítanie a vyhodnotenie výsledkov. Nevýhodou je ťažké rozpoznanie kontaminácie, vyžaduje čistú kultúru mikroorganizmu a nie je možné stanoviť kmene, ktoré v tekutom prostredí autolyzujú (Bursová *et al.*, 2014a).

**Sensititre YeastOne** je mikrodilučný kolorimetrický test s indikátorom Alamar blue. Inkubuje sa pri 35 °C a 24 hodín pre kandidy, 72 hodín pre kryptokoky a 48 – 72 hodín pre aspergily. Rast sa prejaví farebnou zmenou z modrej na ružovú. Ďalším podobným kolorimetrickým testom je napr. Fungitest (Mallátová *et al.*, 2011).



**Obrázok č. 17:** Sensititre YeastOne; citlivosť *C. glabrata* k azolom

**Legenda:** Jamka A1 = pozitívna kontrola, A2 – 11 = anidulafungín, B1 – 11 mikafungín, C1 – 11 kaspofungín, D1 – 11 flucytozín, E1-11 posakonazol, F1 – 11 vorikonazol, G1 – 11 itrakonazol, H1 – 11 flukonazol, 12A – H amfotericín B.

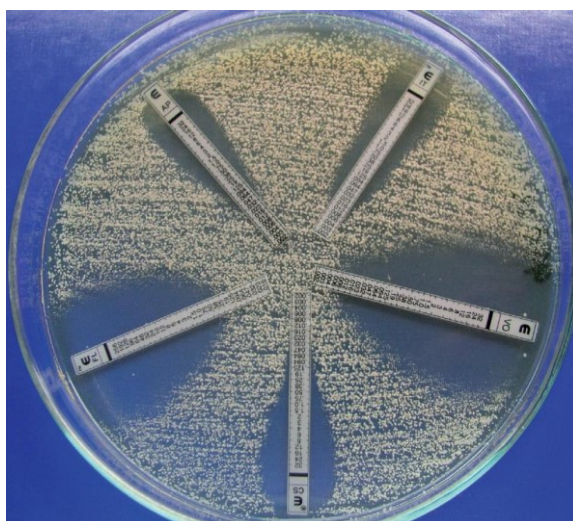
**Zdroj:** (Mallátová *et al.*, 2011).

### 6.5.2.3 *E-test*

Je moderná gradientová metóda kombinujúca princípy diskovej difúznej a agarovej dilučnej metódy. Prezentovaná a vyvinutá bola v roku 1988 vo Švédsku a má vysoký stupeň zhody MIC s referenčnou agarovou dilučnou metódou. Používa sa na testovanie kandid aj vláknitých húb (Bursová *et al.*, 2014a).

Používa sa prúžok papieru, ktorý je nasýtený vzostupnou koncentráciou antimykotika, alebo plastový prúžok, ktorý na spodnej strane má preddefinovaný koncentračný gradient antimykotika. Stupnica koncentračného gradientu je číselne umiestnená na hornej strane prúžku a zvyčajne obsahuje 15 riedení antimykotika. Na klasické Petriho misky sa umiestňujú 1 – 2 prúžky, pri veľkých miskách (priemer 15 cm) sa môže umiestniť až 6 prúžkov (Votava *et al.*, 2010; Bursová *et al.*, 2014a).

Po inkubácii dochádza k vytvoreniu kvapkovitej až eliptickej inhibičnej zóny, MIC hodnota sa odčíta tam, kde špička pretína prúžok. Výhodou je rýchlosť a jednoduchosť. Hlavnou nevýhodou je vysoká cena (Mallátová *et al.*, 2011; Bursová *et al.*, 2014a).



**Obrázok č. 18:** E-test; *C. albicans* citlivá k testovaným antimykotikám

**Zdroj:** (Mallátová *et al.*, 2011).

#### **6.5.2.4 Stanovenie citlivosti mikroorganizmu na kombináciu antimykotík**

Správna kombinácia antimykotík zvyšuje nielen účinnosť, ale aj oddiaľuje vznik rezistencie a rozširuje spektrum účinku. Využívajú sa dilučné aj difúzne metódy.

Pri diskovej metóde sa na platňu kladú dve rôzne antimykotiká s maximálnou vzdialenosťou 12 mm. Ak sa ich inhibičné zóny nestretnú, jedná sa o indiferentný účinok kombinácie antimykotík. Ak sa navzájom potencujú, rozšíri sa ich zóna a jedná sa o synergizmus, čiže kombinácia antimykotík je prospešná. Niekedy dochádza k zoslabeniu účinku antimykotika, jedná sa o antagonizmus (Votava *et al.*, 2010).

Pri dilučnej metóde sa používajú rôzne riedenia oboch antimykotík. Pred stanovením je dôležité zistiť MIC pre jednotlivé antimykotiká. Získané 4 hodnoty sa dosadia do definovaného vzorca, čím sa získa frakčná inhibičná koncentrácia (FIC), ktorá slúži na rozdelenie antimykotík na silne alebo slabo synergické, indiferentné a antagonické (Votava *et al.*, 2010).

$$FIC = \frac{\text{MIC ATB A v kombinácii}}{\text{MIC ATB samotného}} + \frac{\text{MIC ATB B v kombinácii}}{\text{MIC ATB samotného}}$$

Ak je výsledok menší alebo rovný ako 0,5, jedná sa o synergizmus. Do 1 sa jedná o slabý synergizmus. FIC medzi 1 a 4 znamená indiferenciu a FIC väčšia ako 4, znamená antagonizmus (Votava *et al.*, 2010).

## **7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

Pod Katedrou biologických a lekárskech vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové sme testovali 52 chemických látok pochádzajúcich z Katedry anorganickej a organickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové pomocou mikrodilučnej bujónovej metódy za účelom stanovenia potencionalnej antimykotickej aktivity.

### **7.1 Materiál**

#### **7.1.1 Pomôcky**

Sterilné mikrotitračné platničky, mikropipety so sterilnými špičkami, multikanálová mikropipeta, sterilné plastové a sklenené skúmavky, dvanásť jamkový plastový rezervoár na médium, stojany na skúmavky, Bürkerová počítacia komôrka, očkovacie kľučky.

#### **7.1.2 Laboratórne prístroje**

Vortex, laminárny box, termostat, mikroskop.

#### **7.1.3 Chemikálie**

RPMI 1640 (5 × koncentrované rastové médium), Sabouraudov glukózový agar, dimethylsulfoxid (DMSO), MOPS (3-[N-morfolino]propánsulfonová kyselina), glukóza, hydroxid sodný, sterilná voda.

## 7.2 Testované kmene kvasiniek a vláknitých húb

- *Candida albicans* **CA** testovací kmeň ATCC® 44859™ (American testing culture collection)
- *Candida tropicalis* **CT** testovací kmeň 156
- *Candida krusei* **CK** testovací kmeň E28
- *Candida glabrata* **CG** testovací kmeň 20/I
- *Trichosporon asahii* **TA** testovací kmeň 1188
- *Aspergillus fumigatus* **AF** testovací kmeň 231
- *Absidia corymbifera* **AC** testovací kmeň 272
- *Trichophyton mentagrophytes* **TM** testovací kmeň 445

## 7.3 Testované chemické látky

Každá testovaná látka bola dodaná s názvom, navážkou (mg) a molárnou hmotnosťou (g/mol). Vďaka spoločným štruktúrnym znakom bolo 52 látok rozdelených do 8 nasledujúcich skupín:

- Deriváty izoniazidu
- Analóga izoniazidu
- Deriváty 4-aminobenzoovej kyseliny
- Deriváty 4-aminosalicylovej kyseliny
- Deriváty 5-aminosalicylovej kyseliny
- Deriváty sulfónamidov s podskupinami:
  - Derivát sulfamethoxazolu
  - Deriváty sulfadiazínu
  - Deriváty sulfamethazínu
  - Deriváty sulfathiazolu



- Deriváty benzohydrazidu
- Deriváty pyrazínu/pyrazínamidu

## **7.4 Postup prípravy**

### **7.4.1 Príprava rastového média**

K 4 dielom pufru MOPS s 2 % glukózy sme pridali 1 diel rastového média RPMI 1640. Presný objem MOPS a RPMI závisí od predpokladanej spotreby, zachovaný musí zostať pomer 4:1.

Následne sme upravili pH roztoku do rozmedzia 6,5 – 7,9 prídavkom niekoľkých kvapiek NaOH, čím došlo k farebnej zmene roztoku zo žltej na oranžovo-červenú.

### **7.4.2 Príprava suspenzie testovaných kmeňov**

1. 8 sterilných skúmaviek sme popísali skratkami testovaných kmeňov (CA, CT, CK, CG, TA, AF, AC a TM) a do každej skúmavky sme napipetovali 3 ml sterilnej vody.
2. Z vykultivovanej kolónie kvasiniek na Sabouraudovom glukózovom agare sme odobrali kľúčkou malú časť a rozsuspendovali sme ju v skúmavke so sterilnou vodou a premiešali na vortexe.
3. Odobrali sme 12  $\mu$ l suspenzie do Bürkerovej počítacej komôrky. Pri zväčšení  $200\times$  sme stanovili počet buniek na 100 štvorcov. Hustota inokula je ideálne 25 – 50 cfu/50 štvorcov, čo zodpovedá vhodnej hustote na testovanie  $1,0 - 2,5 \cdot 10^{-5}$  cfu/ml.
4. Z vykultivovanej kolónie vláknitých húb na Sabouraudovom agare sme odobrali časť konídií a resuspendovali sme ich v skúmavke so sterilnou vodou a premiešali na vortexe.

5. Odobrali sme 12  $\mu\text{l}$  suspenzie do Bürkerovej počítacej komôrky. Pri zväčšení  $200\times$  sme stanovili počet konídií na 100 štvorcov. Hustota inokula je ideálne cca 100 buniek na 100 štvorcov.
6. Takto pripravené suspenzie testovaných kmeňov sa skladujú v chladničke približne jeden týždeň.

### 7.4.3 Príprava riedenia testovanej látky

1. Presnú navážku chemickej látky sme rozpustili vo vypočítanom objeme DMSO v plastovej skúmavke, tak aby koncentrácia DMSO nepresiahla 1 % a prvá testovaná koncentrácia bola  $500\ \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

#### a) Výpočet objemu DMSO

K rastovému médiu (1,98 ml pozri ďalej) sa pridáva 1 % látky rozpustenej v DMSO (20  $\mu\text{l}$ ), preto sa látka pripravuje  $100\times$  koncentrovanejšia, aby 1. testovaná koncentrácia bola  $500\ \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

$$V_{\text{DMSO}} = \frac{m \times 10^6 \text{ (prevod na } \mu\text{l)}}{c \times M \times 100 \text{ (zakonzentrovanie)}}$$

**Legenda:** m = navážka (g); c = prvá testovaná koncentrácia v  $\text{mol.l}^{-1}$  ( $500\ \mu\text{mol.l}^{-1} = 0,0005\ \text{mol.l}^{-1}$ ); M = molárna hmotnosť.

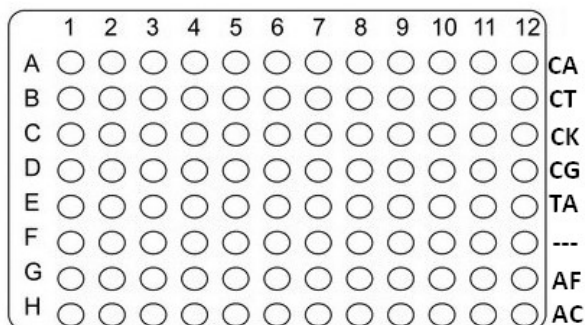
2. Ak sa po premiešaní na vortexe látka rozpustila alebo vytvorila homogénnu suspenziu, pokračovali sme ďalším krokom. Ak sa zrazila alebo nerozpustila, pridali sme 2. poprípade 3. ekvivalent rozpúšťadla. Každým pridaním ekvivalentu sa koncentrácia látky posúva na nižšiu, čiže o 1 riedenie dopredu (napr. z  $500\ \mu\text{mol.l}^{-1}$  na  $250\ \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).
3. Následne do sterilnej skúmavky (označenej č. 1) sme napipetovali 1,98 ml pripraveného rastového média a pridali sme 20  $\mu\text{l}$  rozpustenej testovanej látky, premiešali sme na vortexe.

4. Ak sa látka rozpustila, pokračuje sa ďalším krokom. Ak sa látka zrazila alebo nerozpustila, pridali sme 2. poprípade 3. ekvivalent rastového média, čím sa každým ekvivalentom posúva koncentrácia látky o 1 riedenie dopredu (napr. z  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).
5. Po rozpustení sme získali pracovný roztok č. 1, ktorý sme preliali do 1. jamky dvanásť jamkového rezervoáru.
6. Do ostatných 10 sterilných skúmaviek (č. 2 – 11) sa pripraví dvojková riediaci rada testovanej látky rozpustenej v DMSO. Do každej skúmavky sa napipetuje 0,5 ml DMSO. Do skúmavky označenej ako č. 2 sme pridali 0,5 ml rozpustenej testovanej látky pripravenej podľa bodu 1. a). Premiešali sme pomocou špičky mikropipety a následne sme preniesli 0,5 ml do ďalšej skúmavky č. 3. Takto sme pokračovali až po skúmavku č. 11.
7. Zo skúmaviek č. 2 – 11 sme následne odpipetovali 20  $\mu\text{l}$  do dvanásť jamkového rezervoáru tak, že zo skúmavky č. 2 sa prepipetovalo 20  $\mu\text{l}$  do 2. jamky rezervoáru atď.
8. V rezervoári sme do jamiek 2 – 12 s nariadenou látkou napipetovali 1,98 ml rastového média. Do poslednej 12. jamky rezervoáru sme pridali len samotných 20  $\mu\text{l}$  DMSO ako kontrolu kontaminácie.
9. V každej jamke rezervoáru sme získali 2 ml pracovného roztoku s príslušnou koncentráciou testovanej látky a kontrolu.

#### 7.4.4 Príprava mikrotitračnej platničky

1. Do riadkov A, B, C, D, E, G a H (okrem riadku F) sme napipetovali multikanálovou pipetou 200  $\mu\text{l}$  zo zásobného roztoku v rezervoári.
2. Do každého riadku a do každej jamky sme pridali 10  $\mu\text{l}$  pripravenej suspenzie kmeňov podľa obrázka nižšie (napr. *Candida albicans* do každej jamky riadku A, *Aspergillus fumigatus* do každej jamky riadku G atď.)
3. Do druhej mikrotitračnej platničky sme do jedného riadku napipetovali 200  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku a pridávali sme 10  $\mu\text{l}$  pripravenej suspenzie *Trichophyton mentagrophytes* do každej jamky.

4. Každá platnička slúži pre testovanie jednej látky. Týmto postupom sme na oboch platničkách získali v každom riadku nariedenú testovanú látku s príslušným kmeňom. V stĺpci č. 12 sa nachádzala kontrola z DMSO.
5. Obe mikrotitračné platničky sme priklopili viečkom a inkubovali v termostate pri 35 °C. Výsledky prvej platničky odčítavame po 24 a 48 hodinách, druhú platničku s dermatofytom odčítavame po 72 a 120 hodinách inkubácie.



**Obrázok č. 19:** Schéma prvej mikrotitračnej platničky

### 7.4.5 Vyhodnotenie nárastu

Hodnotí sa vizuálne nárast v každej jamke. MIC je najnižšia koncentrácia látky, pri ktorej nedošlo k viditeľnému nárastu kvasinky alebo vláknitej huby. Prakticky je to prvá jamka v riadku, v ktorej nedošlo k viditeľnému zákalu.

Ako MIC sa pri kvasinkách stanovuje  $IC_{80}$  a pri vláknitých hubách  $IC_{50}$  v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Sú to najnižšie koncentrácie látky, ktoré sú schopné inhibovať 50 % vláknitých húb alebo 80 % kvasiniek.

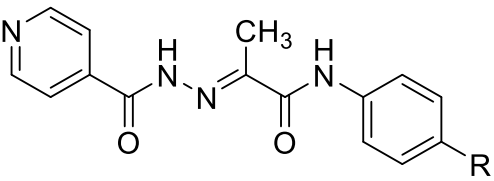
## 7.5 Testované látky s potencionálnou antimykotickou aktivitou

V tejto práci sme testovali 52 látok syntetizovaných na Katedre anorganickej a organickej chémie (PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.; prof. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.).

Testované látky sa nariedili dvojkovým riedením zostupne na koncentrácie 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,813; 3,906; 1,953; 0,977 a 0,488  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ak nedošlo k rozpusteniu alebo sa látka vyzrážala, pridávali sme ďalší diel rozpúšťadla, čím došlo k poklesu koncentrácie o jednu radu (z 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  atď.)

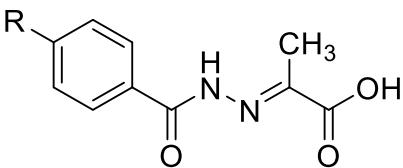
Rozdelili sme ich do 8 skupín: na deriváty izoniazidu (**Tabuľka č. 2**), analóga izoniazidu (**Tabuľka č. 3**), deriváty 4-aminobenzoovej kyseliny (**Tabuľka č. 4**), deriváty 4-aminosalicylovej kyseliny (**Tabuľka č. 5**), deriváty 5-aminosalicylovej kyseliny (**Tabuľka č. 6**), deriváty sulfónamidov (derivát sulfamethoxazolu, deriváty sulfadiazínu, deriváty sulfamethazínu, deriváty sulfathiazolu; **Tabuľka č. 7**), deriváty benzohydrazidu (**Tabuľka č. 8**) a deriváty pyrazínu/pyrazínamidu (**Tabuľka č. 9**).

**Tabuľka č. 2:** Deriváty izoniazidu

<b>Deriváty izoniazidu</b>			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
AN	H	2-(2-izonikotinoylhydrazono)- <i>N</i> -fenypropánamid	
AN-ME	CH <sub>3</sub>	2-(2-izonikotinoylhydrazono)- <i>N</i> -( <i>p</i> -tolyl)propánamid	
AN-MEO	CH <sub>3</sub> O	2-(2-izonikotinoylhydrazono)- <i>N</i> -(4-methoxyfenyl)propánamid	
AN-Cl	Cl	<i>N</i> -(4-chlórfenyl)-2-(2-izonikotinoylhydrazono)propánamid	
AN-Br	Br	<i>N</i> -(4-brómfenyl)-2-(2-izonikotinoylhydrazono)propánamid	
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> (g/mol)	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> ( $\mu\text{l}$ )
AN	282,30	21,3	1509,0

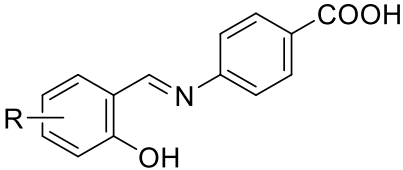
AN-ME	296,32	20,8	1403,9
AN-MEO	312,32	16,6	1063,0
AN-Cl	316,74	15,8	997,7
AN-Br	361,19	15,5	858,3

**Tabuľka č. 3:** Analóga izoniazidu

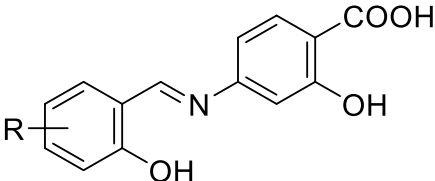
<b>Analóga izoniazidu</b>			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
BH-K-PYR	H	2-(2-benzoylhydrazono)propánová kyselina	
4F-BH-K-PYR	F	2-[2-(4-fluórbenzoyl)hydrazono]propánová kyselina	
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> (g/mol)	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> ( $\mu$ l)
BH-K-PYR	206,20	16,3	1581,0
4F-BH-K-PYR	224,19	11,8	1052,7

**Tabuľka č. 4:** Deriváty 4-aminobenzoovej kyseliny

<b>Deriváty 4-aminobenzoovej kyseliny</b>
---

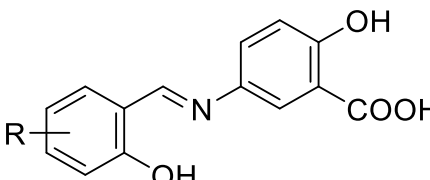
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
PABA-1	3-Cl	4-{{(3-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén}amino}benzoová kyselina	
PABA-2	3-Br-5-Cl	4-{{(3-bróm-5-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén}amino}benzoová kyselina	
PABA-3	3-I-5-Cl	4-{{(5-chlór-2-hydroxy-3-jódfenyl)methylidén}amino}benzoová kyselina	
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť (g/mol)</u>	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO (μl)</u>
PABA-1	275,69	13,4	972,1
PABA-2	354,58	12,2	688,1
PABA-3	401,58	10,5	522,9

**Tabuľka č. 5:** Deriváty 4-aminosalicylovej kyseliny

<b>Deriváty 4-aminosalicylovej kyseliny</b>			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
PAS-1	3-Cl	4-{{(3-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén}amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	
PAS-2	3-Br-5-Cl	4-{{(3-bróm-5-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén}amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	
PAS-3	3-I-5-Cl	4-{{(5-chlór-2-hydroxy-3-jódfenyl)methylidén}amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	

<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> (g/mol)	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> ( $\mu$ l)
PAS-1	291,69	8,3	569,1
PAS-2	370,58	12,1	653,0
PAS-3	417,58	15,4	737,6

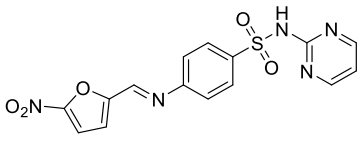
**Tabuľka č. 6:** Deriváty 5-aminosalicylovej kyseliny

<b>Deriváty 5-aminosalicylovej kyseliny</b>			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
5-PAS-1	3-Cl	5-[[3-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	
5-PAS-2	3-Br-5-Cl	5-[[3-bróm-5-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	
5-PAS-3	3-I-5-Cl	5-[[5-chlór-2-hydroxy-3-jódfenyl)methylidén]amino}-2-hydroxybenzoová kyselina	
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> (g/mol)	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> ( $\mu$ l)
5-PAS-1	291,69	16,8	1151,9
5-PAS-2	370,58	17,0	917,5
5-PAS-3	417,58	11,1	531,6



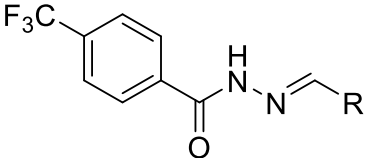
**Tabuľka č. 7: Deriváty sulfónamidov**

<b>Sulfónamidy</b>			
Deriváty sulfamethoxazolu			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>R<sup>1</sup></u>	<u>Názov</u>
SMX-S-20	5-methylizoxazol-3-yl	3,5-I <sub>2</sub>	4-[(2-hydroxy-3,5-dijódbenzylidén)amino]-N-(5-methylizoxazol-3-yl)benzénsulfónamid
Deriváty sulfadiazínu			
SS-1	pyrimidín-2-yl	5-F	4-{[(5-fluór-2-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-2	pyrimidín-2-yl	5-CH <sub>3</sub>	4-{[(2-hydroxy-5-methylfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-3	pyrimidín-2-yl	6-Cl	4-{[(2-chlór-6-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-4	pyrimidín-2-yl	3,5-Cl <sub>2</sub>	4-{[(3,5-dichlór-2-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-5	pyrimidín-2-yl	3-Br-5-Cl	4-{[(3-bróm-5-chlór-2-hydroxyfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-6	pyrimidín-2-yl	3-I-5-Cl	4-{[(5-chlór-2-hydroxy-3-jódfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-7	pyrimidín-2-yl	5-OH	4-{[(2,5-dihydroxyfenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SS-8	pyrimidín-2-yl	5-NO <sub>2</sub>	4-{[(2-hydroxy-5-nitrofenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SDZ-S-8	pyrimidín-2-yl	4-NO <sub>2</sub>	4-{[(2-hydroxy-4-nitrofenyl)methylidén]amino}-N-(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid

SDZ-S-9	pyrimidín-2-yl	4-CH <sub>3</sub>	4-{{[(2-hydroxy-4-methylfenyl)methylidén]amino}- <i>N</i> -(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SDZ-S-20	pyrimidín-2-yl	3,5-I <sub>2</sub>	4-[(2-hydroxy-3,5-dijódbenzylidén)amino]- <i>N</i> -(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SDZ-S-19			4-{{[(5-nitrofuran-2-yl)methylén]amino}- <i>N</i> -(pyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
Deriváty sulfathiazolu			
STZ-S-1	thiazol-2-yl	3,5-Cl <sub>2</sub>	4-[(3,5-dichlór-2-hydroxybenzylidén)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzénsulfónamid
STZ-S-2	thiazol-2-yl	3-Br-5-Cl	4-[(3-bróm-5-chlór-2-hydroxybenzylidén)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzénsulfónamid
STZ-S-3	thiazol-2-yl	3-I-5-Cl	4-[(5-chlór-2-hydroxy-3-jódbenzylidén)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzénsulfónamid
STZ-S-4	thiazol-2-yl	3,5-I <sub>2</sub>	4-[(2-hydroxy-3,5-dijódbenzylidén)amino]- <i>N</i> -(thiazol-2-yl)benzénsulfónamid
Deriváty sulfamethazínu			
SMZ-S-1	4,6-dimethylpyrimidín-2-yl	3,5-Cl <sub>2</sub>	4-[(3,5-dichlór-2-hydroxybenzylidén)amino]- <i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SMZ-S-2	4,6-dimethylpyrimidín-2-yl	3-Br-5-Cl	4-[(3-bróm-5-chlór-2-hydroxybenzylidén)amino]- <i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SMZ-S-3	4,6-dimethylpyrimidín-2-yl	3-I-5-Cl	4-[(5-chlór-2-hydroxy-3-jódbenzylidén)amino]- <i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid
SMZ-S-4	4,6-dimethylpyrimidín-2-yl	3,5-I <sub>2</sub>	<i>N</i> -(4,6-dimethylpyrimidín-2-yl)-4-[(2-hydroxy-3,5-dijódbenzylidén)amino]benzénsulfónamid

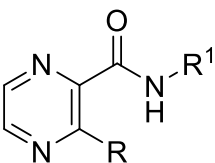
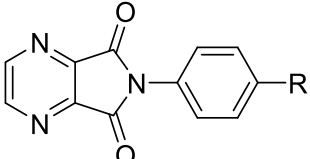
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> <u>(g/mol)</u>	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> <u>(<math>\mu</math>l)</u>
SMX-S-20	609,18	12,7	417,0
SS-1	372,38	12,6	676,7
SS-2	368,42	14,5	787,1
SS-3	388,83	10,9	560,7
SS-4	423,28	11,6	548,1
SS-5	467,73	11,2	478,9
SS-6	514,73	11,8	458,5
SS-7	370,39	13,7	739,8
SS-8	399,39	13,8	691,1
STZ-S-1	428,30	13,3	621,1
STZ-S-2	472,76	14,6	617,6
STZ-S-3	519,76	12,9	496,4
STZ-S-4	611,21	15,2	497,4
SMZ-S-1	451,32	19,5	864,1
SMZ-S-2	495,78	11,7	472,0
SMZ-S-3	542,78	11,1	409,0
SMZ-S-4	634,23	16,2	510,9

**Tabuľka č. 8:** Deriváty benzohydrazidu

<b>Deriváty benzohydrazidu</b>			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>Názov</u>	
BH-64	5-( <i>tert</i> -butyl)-2-hydroxyfenyl	<i>N'</i> -(5-( <i>tert</i> -butyl)-2-hydroxybenzylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-65	pyridín-4-yl	<i>N'</i> -(pyridín-4-ylmethylén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-71	pyridín-3-yl	<i>N'</i> -(pyridín-3-ylmethylén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-72	pyridín-2-yl	<i>N'</i> -(pyridín-2-ylmethylén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-66	2-hydroxy-3,5-dijódfenyl	<i>N'</i> -(2-hydroxy-3,5-dijódbenzylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-67	3-bróm-5-chlór-2-hydroxyfenyl	<i>N'</i> -(3-bróm-5-chlór-2-hydroxybenzylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-68	5-chlór-2-hydroxy-3-jódfenyl	<i>N'</i> -(5-chlór-2-hydroxy-3-jódbenzylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-69	fenetyl	<i>N'</i> -(3-fenylpropylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
BH-70	2-fenylethen-1-yl	<i>N'</i> -(3-fenylallylidén)-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid	
<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> ( <u>g/mol</u> )	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> ( <u>μl</u> )
BH-64	364,37	16,0	878,2
BH-65	293,25	13,1	893,4
BH-71	293,25	11,2	763,9
BH-72	293,25	10,3	702,5

BH-66	560,05	12,6	450,0
BH-67	421,60	15,0	711,6
BH-68	468,60	11,6	495,1
BH-69	320,32	10,5	655,6

Tabul'ka č. 9: Deriváty pyrazínu/pyrazínamidu

Deriváty pyrazínu/pyrazínamidu			
			
<u>Kód</u>	<u>R</u>	<u>R<sup>1</sup></u>	<u>Názov</u>
POA-A-1	5-( <i>tert</i> -butyl)-2-hydroxyfenyľ	4-[ <i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)sulfamoyl]fenyľ	3-({4-[ <i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)sulfamoyl]fenyľ} karbamoyl)pyrazín-2-karboxylová kyselina
POA-A-2	pyridín-4-yl	fenyľ	3-(fenyľkarbamoyl)pyrazín-2-karboxylová kyselina
POA-AMID-2	pyridín-3-yl	fenyľ	<i>N</i> -fenyľpyrazín-2-karboxamid
POA-A-3	pyridín-2-yl	izonikotinoylamino	3-(2-izonikotinoylhydrazín-1-karbonyl)pyrazín-2-karboxylová kyselina
			
POA-I-1	<i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)sulfamoyl	4-(5,7-dioxo-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrrolo[3,4- <i>b</i> ]pyrazín-6-yl)- <i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)benzénsulfónamid	
POA-I-1-Ac	<i>N</i> -acetyl- <i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)sulfamoyl	<i>N</i> -{[4-(5,7-dioxo-5,7-dihydro-6 <i>H</i> -pyrrolo[3,4- <i>b</i> ]pyrazín-6-yl)fenyľ]sulfonyl}- <i>N</i> -(5-methylizoxazol-3-yl)acetamid	

<u>Kód</u>	<u>Mol. hmotnosť</u> <u>(g/mol)</u>	<u>Navážka (mg)</u>	<u>DMSO</u> <u>(<math>\mu</math>l)</u>
POA-A-1	403,37	12,4	614,8
POA-A-2	243,22	10,7	879,9
POA-AMID-2	199,21	13,2	1325,2
POA-A-3	287,24	10,2	710,2
POA-I-1	385,35	10,8	560,5
POA-I-1-Ac	427,39	10,3	482,0

## 8. VÝSLEDKY

Výsledky testovania antimykotickej aktivity 8 skupín látok sú uvedené v **Tabuľkách č. 10 až č. 18**. MIC sa hodnotila po 24 a 48 hodinách, jedine pri *Trichophyton mentagrophytes* 445 po 72 a 120 hodinách.

Tučným písmom sú označené hodnoty MIC, teda koncentrácie, pri ktorých došlo k inhibícii nárastu, jamky boli číre, látka vykazovala antimykotickú aktivitu. Naopak znamienkom >500 (alebo 250, 125 atď.) sú označené výsledky, pri ktorých sa neprejavila žiadna inhibícia rastu, čiže jamky boli zakalené a látka nevykazovala antimykotickú aktivitu pri danej koncentrácii.

**Tabuľka č. 10:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov izoniazidu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
		AN	AN-ME	AN-MEO	AN-Cl	AN-Br
CA	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
CT	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
CK	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
CG	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
TA	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
AF	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
AC	24h	>250	>125	>500	>500	>125
	48h	>250	>125	>500	>500	>125
TM	72h	>250	>125	>500	>500	>125
	120h	>250	>125	>500	>500	>125

Z derivátov izoniazidu sme testovali 5 látok pod kódmi AN, AN-ME, AN-MEO, AN-Cl a AN-Br. U žiadnej látky nebola dokázaná antimykotická aktivita v príslušných koncentráciách po 24 a 72 hodinovej inkubácii (poprípade u TM po 72 a 120 hodinách).

Látky AN-MEO a AN-Cl sme rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu rozpúšťadla DMSO, látku AN po pridaní druhého ekvivalentu rozpúšťadla a látky AN-ME a AN-Br po pridaní tretieho ekvivalentu rozpúšťadla.



**Tabuľka č. 11:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity analógov izoniazidu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )	
		BH-K-PYR	4-F-BH-K-PYR
CA	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CT	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CK	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
CG	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
TA	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
AF	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
AC	24h	>500	>500
	48h	>500	>500
TM	72h	>500	>500
	120h	>500	>500

Zo skupiny analógov izoniazidu sa testovali 2 látky: BH-K-PYR a 4F-BH-K-PYR. Ani jedna nepreukázala antimykotickú aktivitu pri príslušných koncentráciách po 24 a 72 hodinovej inkubácii (poprípade u TM po 72 a 120 hodinách).

Obe látky sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu rozpúšťadla DMSO.

**Tabuľka č. 12:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov  
4-aminobenzoovej kyseliny

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )		
		PABA-1	PABA-2	PABA-3
CA	24h	31,25	31,25	7,81
	48h	31,25	31,25	7,81
CT	24h	62,5	62,5	31,25
	48h	62,5	62,5	31,25
CK	24h	250	62,5	15,62
	48h	250	62,5	15,62
CG	24h	62,5	15,62	7,81
	48h	62,5	15,62	7,81
TA	24h	125	31,25	7,81
	48h	125	31,25	7,81
AF	24h	250	250	125
	48h	250	250	125
AC	24h	500	500	250
	48h	500	500	250
TM	72h	125	62,5	7,81
	120h	125	62,5	7,81

Z derivátov 4-aminobenzoovej kyseliny sme testovali len 3 látky a to: PABA-1, PABA-2 a PABA-3. Všetky tri látky sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu rozpúšťadla.

Všetky látky vykazovali antimykotickú aktivitu v hodnotách koncentrácií od 7,81 μmol.l<sup>-1</sup> do 500 μmol.l<sup>-1</sup>. Najnižšie hodnoty MIC (7,81 μmol.l<sup>-1</sup>) dosahovala látka PABA-3 a to pri kmeňoch CA, CG, TA a TM. Najvyššie hodnoty MIC (500 μmol.l<sup>-1</sup> a 250 μmol.l<sup>-1</sup>) boli potrebné pre inhibíciu rastu kmeňu AC.

**Tabuľka č. 13:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov  
4-aminosalicylovej kyseliny

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )		
		PAS-1	PAS-2	PAS-3
CA	24h	62,5	62,5	>500
	48h	62,5	62,5	>500
CT	24h	125	125	>500
	48h	125	125	>500
CK	24h	250	62,5	500
	48h	250	62,5	500
CG	24h	125	62,5	>500
	48h	125	62,5	>500
TA	24h	250	62,5	>500
	48h	250	62,5	>500
AF	24h	250	500	>500
	48h	250	500	>500
AC	24h	>500	500	500
	48h	>500	500	500
TM	72h	62,5	125	125
	120h	62,5	125	125

Z derivátov 4-aminosalicylovej kyseliny sme testovali 3 látky: PAS-1, PAS-2 a PAS-3. Všetky látky sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu DMSO.

Látky PAS-1 a PAS-2 preukázali antimykotickú aktivitu u kmeňov CA, CT, CK, CG, TA, AF a TM, kde hodnoty MIC sa pohybovali od 62,5 μmol.l<sup>-1</sup> do 500 μmol.l<sup>-1</sup>. Látka PAS-2 spolu s PAS-3 prejavili aktivitu pri AC v koncentrácii 500 μmol.l<sup>-1</sup>. Látka PAS-3 prejavila antimykotickú aktivitu len pri kmeňoch CK, AC a TM, pričom hodnoty MIC sa pohybovali od 125 μmol.l<sup>-1</sup> do 500 μmol.l<sup>-1</sup>. Všetky výsledky boli totožné po 24 aj 48 hodinovej inkubácii (poprípade u TM po 72 a 120 hodinách).

**Tabuľka č. 14:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov  
5-aminosalicylovej kyseliny

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )		
		5-PAS-1	5-PAS-2	5-PAS-3
CA	24h	31,25	31,25	3,9
	48h	31,25	31,25	3,9
CT	24h	125	125	15,62
	48h	125	125	15,62
CK	24h	250	62,5	15,62
	48h	250	62,5	15,62
CG	24h	125	31,25	7,81
	48h	125	31,25	7,81
TA	24h	250	62,5	15,62
	48h	250	62,5	15,62
AF	24h	500	250	31,25
	48h	500	250	31,25
AC	24h	>500	500	>125
	48h	>500	500	>125
TM	72h	31,25	7,81	7,81
	120h	31,25	7,81	7,81

Z derivátov 5-aminosalicylovej kyseliny sme testovali 3 látky: 5-PAS-1, 5-PAS-2 a 5-PAS-3. Látka 5-PAS-1 a 5-PAS-2 sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu DMSO, látka 5-PAS-3 až po pridaní tretieho ekvivalentu rozpúšťadla.

Všetky 3 látky vykazovali antimykotickú aktivitu k testovaným kmeňom, látky 5-PAS-1 a 5-PAS-3 neboli účinné len pri kmeni AC. Najnižšiu hodnotu MIC, teda 3,9 μmol.l<sup>-1</sup>, vykazovala látka 5-PAS-3 voči CA. Látka 5-PAS-2 a 5-PAS-3 vykazovali hodnotu MIC 7,81 μmol.l<sup>-1</sup> k TM a látka 5-PAS-3 aj k CG.

**Tabuľka č. 15. a)** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity sulfónamidov: deriváty sulfadiazínu a derivát sulfamethoxazolu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )							
		SS-1	SS-2	SS-3	SS-4	SS-5	SS-6	SS-7	SS-8
CA	24h	>250	>500	>250	62,5	31,25	7,81	15,62	500
	48h	>250	>500	>250	62,5	31,25	7,81	15,62	500
CT	24h	>250	>500	>250	125	62,5	7,81	15,62	>500
	48h	>250	>500	>250	125	62,5	15,62	15,62	>500
CK	24h	>250	>500	>250	62,5	62,5	15,62	31,25	>500
	48h	>250	>500	>250	62,5	62,5	7,81	31,25	>500
CG	24h	>250	>500	>250	31,25	31,25	7,81	15,62	250
	48h	>250	>500	>250	31,25	31,25	7,81	15,62	250
TA	24h	>250	>500	>250	62,5	62,5	7,81	15,62	>500
	48h	>250	>500	>250	62,5	62,5	7,81	15,62	>500
AF	24h	>250	>500	>250	250	250	62,5	125	>500
	48h	>250	>500	>250	250	250	62,5	125	>500
AC	24h	>250	>500	>250	500	500	250	500	500
	48h	>250	>500	>250	500	500	250	500	500
TM	72h	>250	>500	>250	125	62,5	1,95	1,95	62,5
	120h	>250	>500	>250	125	62,5	1,95	1,95	62,5

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
		SDZ-S-8	SDZ-S-9	SDZ-S-19	SDZ-S-20	SMX-S-20
CA	24h	>250	>250	250	3,9	7,81
	48h	>250	>250	250	3,9	7,81
CT	24h	>250	>250	250	7,81	31,25
	48h	>250	>250	250	7,81	31,25
CK	24h	>250	>250	250	7,81	15,62
	48h	>250	>250	250	7,81	15,62
CG	24h	>250	>250	250	3,9	7,81
	48h	>250	>250	250	3,9	7,81

<b>TA</b>	24h	>250	>250	<b>500</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>
	48h	>250	>250	<b>500</b>	<b>3,9</b>	<b>15,62</b>
<b>AF</b>	24h	>250	>250	<b>500</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>
	48h	>250	>250	<b>500</b>	<b>62,5</b>	<b>250</b>
<b>AC</b>	24h	>250	>250	>500	<b>62,5</b>	<b>125</b>
	48h	>250	>250	>500	<b>62,5</b>	<b>125</b>
<b>TM</b>	72h	<b>250</b>	>250	<b>250</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>
	120h	<b>250</b>	>250	<b>250</b>	<b>15,62</b>	<b>15,62</b>

V týchto 2 podskupinách sulfónamidov sa nachádzajú deriváty sulfadiazínu (SS-1, SS-2, SS-3, SS-4, SS-5, SS-6, SS-7, SS-8, SDZ-S-8, SDZ-S-9, SDZ-S-19 a SDZ-S-20) a derivát sulfamethoxazolu (SMX-S-20). Skoro všetky látky sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu rozpúšťadla okrem látok SS-1, SS-3, SDZ-S-8 a SDZ-S-9.

Antimykotickú aktivitu nevykazovali látky SS-1, SS-2, SS-3, SDZ-S-9 a látka SDZ-S-8 vykazovala inhibíciu nárastu len pri TM pri hodnote MIC 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látky SS-4, SS-5, SS-6, SS-7, SDZ-S-20 a SMX-S-20 vykazovali antimykotickú aktivitu pri všetkých testovaných kmeňoch v hodnotách MIC od 3,9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  do 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka SS-8 vykazovala aktivitu pri CA, CG, AC a TM. Látka SDZ-S-19 mala antimykotický účinok pri všetkých kmeňoch okrem AC v hodnotách MIC 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tabuľka č. 16. b)** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity sulfónamidov: deriváty sulfathiazolu a deriváty sulfamethazínu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )							
		STZ- S-1	STZ- S-2	STZ- S-3	STZ- S-4	SMZ- S-1	SMZ- S-2	SMZ- S-3	SMZ- S-4
CA	24h	125	62,5	15,62	15,62	3,9	31,25	3,9	62,5
	48h	125	62,5	15,62	15,62	3,9	31,25	3,9	62,5
CT	24h	250	125	62,5	15,62	7,81	62,5	7,81	125
	48h	250	125	62,5	15,62	7,81	62,5	7,81	125
CK	24h	125	62,5	31,25	15,62	31,25	62,5	31,25	62,5
	48h	125	62,5	31,25	15,62	31,25	62,5	31,25	62,5
CG	24h	125	31,25	31,25	15,62	15,62	31,25	15,62	62,5
	48h	125	31,25	31,25	15,62	15,62	31,25	15,62	62,5
TA	24h	125	62,5	31,25	15,62	15,62	125	31,25	62,5
	48h	125	62,5	31,25	15,62	15,62	125	31,25	62,5
AF	24h	500	250	250	125	125	250	125	250
	48h	500	250	250	125	125	250	125	250
AC	24h	>500	500	500	250	250	500	500	500
	48h	>500	500	500	250	250	500	500	500
TM	72h	62,5	15,62	7,81	3,9	1,95	7,81	1,95	15,62
	120h	62,5	15,62	7,81	3,9	1,95	7,81	1,95	15,62

Deriváty sulfathiazolu (STZ-S-1, STZ-S-2, STZ-S-3 a STZ-S-4) a deriváty sulfamethazínu (SMZ-S-1, SMZ-S-2, SMZ-S-3 a SMZ-S-4) sa rozpustili po pridaní prvého ekvivalentu rozpúšťadla DMSO.

Všetky látky vykazovali antimykotickú aktivitu v hodnotách MIC od 1,95 μmol.l<sup>-1</sup> do 500 μmol.l<sup>-1</sup>, výnimku tvorila len látka STZ-S-1, ktorá neinhibovala nárast kmeňu AC ani po 48 hodinách. Najnižšie účinné koncentrácie (1,95 μmol.l<sup>-1</sup> a 3,9 μmol.l<sup>-1</sup>) vykazovali látky SMZ-S-1, SMZ-S-3 a STZ-S-4 a to pri kmeňoch TM a CA.

Tabuľka č. 17: Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov benzohydrazidu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )				
		BH-64	BH-65	BH-66	BH-67	BH-68
CA	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
CT	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
CK	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
CG	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
TA	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
AF	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
AC	24h	>500	>500	>250	>250	>250
	48h	>500	>500	>250	>250	>250
TM	72h	>500	>500	>250	>250	>250
	120h	>500	>500	>250	>250	>250

		BH-69	BH-70	BH-71	BH-72
CA	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
CT	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
CK	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
CG	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
TA	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
	24h	>500	>500	>125	>125



<b>AF</b>	48h	>500	>500	>125	>125
<b>AC</b>	24h	>500	>500	>125	>125
	48h	>500	>500	>125	>125
<b>TM</b>	72h	>500	>500	>125	>125
	120h	>500	>500	>125	>125

Zo skupiny derivátov benzohydrazidu sme testovali 9 látok (BH-64, BH-65, BH-66, BH-67, BH-68, BH-69, BH-70, BH-70, BH-71 a BH-72). Látky BH-64, BH-65, BH-66, BH-69 a BH-70 sa rozpustila v prvom ekvivalente rozpúšťadla, látky BH-66, BH-67 a BH-68 sme rozpustili po pridaní druhého ekvivalentu rozpúšťadla a látky BH-71 a BH-72 až po pridaní tretieho ekvivalentu DMSO.

Ani jedna látka nevykazovala antimykotickú aktivitu v príslušných koncentráciách po 24 a 72 hodinovej inkubácii (u TM po 72 a 120 hodinovej inkubácii).

**Tabuľka č. 18:** Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov pyrazínu alebo pyrazínamidu

Kmeň (skratka)	Inkubácia (hodiny)	Testovaná látka (kód) - MIC / IC <sub>80</sub> / IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )					
		POA- A-1	POA- A-2	POA- AMID-2	POA- A-3	POA-I- 1	POA-I- 1-Ac
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>125	>500

Zo skupiny derivátov pyrazínu/pyrazínamidu bolo testovaných 6 látok, ktoré sa rozpustili v prvom ekvivalente rozpúšťadla s výnimkou látky POA-I-1, ktorá sa rozpustila až po pridaní tretieho ekvivalentu DMSO.

Ani jedna látka nepreukázala antimykotickú aktivitu pri koncentrácii 500 μmol.l<sup>-1</sup> poprípade v koncentrácii 125 μmol.l<sup>-1</sup> pri látke POA-I-1.

## 9. DISKUSIA

Incidenca mykotických ochorení sa neustále zvyšuje vďaka nárastu populácie s oslabenou imunitou, či už u onkologických pacientov s imunosupresívnou chemoterapiou, u pacientov po transplantácií orgánov, pri HIV pozitívnych alebo u pacientov podstupujúcich liečbu novými biologicky aktívnymi prípravkami, ako sú inhibítory faktoru nádorovej nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) určené na liečbu autoimunitných a zápalových ochorení.

K dispozícii je relatívne množstvo antimykotických preparátov s rôznou chemickou štruktúrou, avšak väčšina je len na liečbu kožných a slizničných mykóz s lokálnou aplikáciou. Na život ohrozujúce invazívne mykózy bolo doteraz schválených len pár liečiv.

Problémom posledných rokov je aj zvyšujúci vývoj rezistencie k antimykotikám. Výzvou naďalej zostáva vývin nového antimykotika, ktoré by nebolo príliš toxické pre ľudské bunky a dostatočne účinné na inhibíciu rastu bunky huby.

Prvou testovanou skupinou boli **deriváty izoniazidu** (izonikotinyolhydrazid, INH), ktorý je syntetickým derivátom kyseliny nikotínovej a zároveň používaným účinným antituberkulotikom. Hlavným mechanizmom účinku je blokáda syntézy mykolových kyselín, ktoré sú hlavnou zložkou bunkovej membrány mykobaktérií. Má baktericídne vlastnosti pre deliace sa bunky mykobaktérií. Ako prodrug musí byť najprv aktivovaný bakteriálnym enzýmom katalázo-peroxidázou (KatG) (*PubChem Compound Database*, CID = 3767 [online]). *In vitro* štúdia dokázala, že hydrazóny odvodené od INH majú antimykotický účinok na dimorfnú hubu *Histoplasma capsulatum* vďaka interakcii s ergosterolom, čo vedie k ireverzibilnému poškodeniu membránovej integrity (Cordeiro *et al.*, 2014).

Z derivátov izoniazidu sme testovali 5 látok s obecným názvom 2-(2-izonikotinoylhydrazono)-*N*-fenylpropánamid. Výsledky nepreukázali žiadnu významnú antimykotickú aktivitu ani po zmene substituentu na benzénovom jadre. Tento výsledok bol očakávateľný, predovšetkým kvôli antibakteriálnemu a nie antimykotickému účinku parentnej látky.

Z analógov izoniazidu, s obecným názvom 2-(2-benzoylhydrazono)propánová kyselina, sme testovali 2 látky so substituovaným vodíkom alebo fluórom na benzénovom

jadre v polohe 4 (látka 4F-BH-K-PYR). Tieto látky taktiež nevykazovali antimykotickú aktivitu ako predošlá skupina.

**4-aminobenzoová kyselina** (*para*-aminobenzoová kyselina, PABA) je prekursor kyseliny listovej, ktorá je esenciálna pre rast buniek húb. Podobnú štruktúru majú sulfónamidy, ktoré interferujú s PABA a bránia rastu a rozmnožovaniu mikroorganizmov.

Medzi deriváty PABA sme zaradili 3 látky, Schiffové bázy so substituovanými salicylaldehydmi, ktoré vykazovali antimykotickú aktivitu pri všetkých testovaných kmeňoch. Deriváty mali na salicylovom jadre naviazaný chlór, bróm alebo jód. Látky PABA-1 s naviazaným chlórom a PABA-2 s brómom a chlórom, prejavili účinnosť v pomerne nízkych koncentráciách ( $15,62 - 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ), ich hodnoty MIC pri jednotlivých kmeňoch dosahovali približne rovnaké hodnoty.

Ako najúčinnější sa ukázal derivát PABA-3, ktorý mal substituovaný jód a chlór v polohách 3 a 5, ktorý inhiboval nárast kmeňov CA, CG, TA a TM v najnižšej koncentrácii  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Zdá sa, že naviazanie chlóru spolu s brómom (PABA-2) alebo jódom (PABA-3) potencuje antimykotický účinok v porovnaní s derivátom PABA-1, ktorý mal za substituent len 5-chlór.

Najnižšie koncentrácie potrebné k inhibícii nárastu sme pozorovali pri kmeni kvasinky CA od  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $31,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Naopak najvyššie koncentrácie látok  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  boli potrebné na inhibíciu rastu vláknitej huby AC.

**4-aminosalicylová kyselina** (*para*-aminosalicylová kyselina, 4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina, PAS) je antituberkulotikum, ktoré je štruktúrnym analógom PABA, prekursoru kyseliny listovej. Podobne ako izoniazid, je prodrug, ktorý po aktivácii inhibuje *Mycobacterium tuberculosis* zásahom do dihydrofolát reduktázy (DHFR). Interaguje s enzýmami dihydropteroát syntázou (DHPS) a dihydrofolát syntázou (DHFS), čím vzniká antimetabolit hydroxyl dihydrofolát, ktorý inhibuje enzymatickú aktivitu DHFR a tým syntézu kyseliny listovej (Zheng *et al.*, 2013).

Testovali sme 3 deriváty PAS, kde základom bola 4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina modifikovaná reakciou so salicylaldehydmi, na ktorých boli naviazané rôzne halogenidy. Ako najmenej účinná sa ukázala látka PAS-3 substituovaná 3-jódom a 5-chlórom, ktorá vo vysokých koncentráciách  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  bola účinná len na CK a AC a v koncentrácii  $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na kmeň TM.

Látka PAS-1 so substituovaným 5-chlórom vykazovala antimykotickú aktivitu vo vyšších koncentráciách pri všetkých kmeňoch okrem vláknitej huby AC. Ako najvýhodnejšie sa ukázalo naviazanie brómu v polohe 3 spoločne s chlórom v polohe 5 u látky PAS-2, ktorá vykazovala antimykotickú aktivitu v pomerne nižších koncentráciách ( $62,5 - 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) pri všetkých testovaných kmeňoch, ale hlavne predovšetkým pri kvasinkách. Najmenej citlivým kmeňom k derivátom PAS bol kmeň AC.

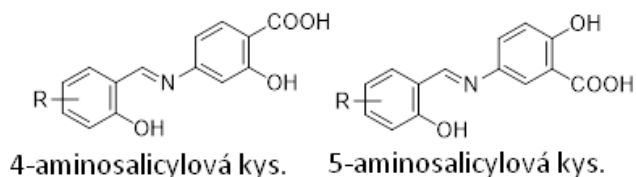
**5-aminosalicylová kyselina** (mesalazín, 5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina, 5-ASA, 5-PAS) je dôležitým metabolitom sulfasalazínu, sulfónamidu, ktorý je účinnou protizápalovou látkou pri ulceróznej kolitíde a Crohnovej chorobe. 5-ASA sa používa aj samotná. Zápal redukuje inhibíciou cyklooxygenázovej a prostaglandínovej produkcie (*PubChem Compound Database, CID = 4075 [online]*).

Základ testovaných 3 derivátov tvorí 5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina s 2-hydroxyfenylom, na ktorom boli naviazané rôzne halogény. Rovnako ako pri predošlej skupine, látka 5-PAS-1 mala substituovaný 5-chlór, 5-PAS-2 3-bróm a 5-chlór a látka 5-PAS-3 mala 3-jód spolu s 5-chlórom.

Látka 5-PAS-1 prejavila antimykotickú aktivitu vo vyšších koncentráciách ( $31,25 - 500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) na všetky kmene okrem AC. Ako jediná, látka 5-PAS-2 so substituovaným brómom a chlórom, mala antimykotický účinok na všetky kmene v koncentráciách od  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pri kmeni TM do  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pri AC.

Napriek tomu, že látka 5-PAS-3 bola neúčinná na kmeň vláknitej huby AC, prejavila sa ako najúčinnějšía pri najnižších minimálnych inhibičných koncentráciách pri všetkých ostatných kmeňoch kvasiniek a vláknitých húb. Pri AF dosahovala hodnota MIC najnižšiu koncentráciu spomedzi derivátov a to  $31,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

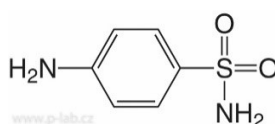
V porovnaní s 4-PAS boli deriváty 5-PAS účinnejšie v nižších koncentráciách, kde v oboch skupinách deriváty PAS-2 a 5-PAS-2 disubstituované brómom a chlórom vykazovali aktivitu ku všetkým kmeňom. Najmenej citlivým kmeňom k derivátom 5-PAS bola vláknitá huba AC (neúčinné látky 5-PAS-1 a 5-PAS-2). Naopak veľmi dobrú citlivosť prejavili všetky kmene kvasiniek a z vláknitých húb kmeň TM a AF.



**Obrázok č. 20:** Porovnanie 4-amino a 5-aminosalicylovej kyseliny

Do rozsiahlej skupiny **sulfónamidov** patria 4 podskupiny derivátov sulfadiazínu, sulfamethoxazolu, sulfathiazolu a deriváty sulfamethazínu.

Základnou štruktúrou sulfónamidov je sulfanilamid, ktorý sa skladá z anilínu (fenylová skupina s aminoskupinou) s naviazanou sulfoamidovou skupinou. Sú to štruktúrne analógy a kompetitívny antagonisti kyseliny *para*-aminobenzoovej. Kyselina tetrahydrolistová je aktívna forma kyseliny listovej a je nutná pre syntézu purinových látok a tymidínu, ktoré slúžia ako stavebné jednotky vstupujúce do syntézy DNA a RNA. Mikroorganizmy, na rozdiel od ľudí, si dokážu syntetizovať kyselinu dihydrolistovú, ktorá sa následne redukuje na kyselinu tetrahydrolistovú. Mnoho baktérií vyžaduje ako rastový faktor *p*-aminobenzoovú kyselinu (PABA), ktorú zabudujú do molekuly kyseliny dihydrolistovej. Štruktúrne podobné sulfónamidy obsadzujú tieto cieľové miesta a tak brzdia syntézu kyseliny listovej, nutnej pre rast baktérií (Lincová *et al.*, 2002).



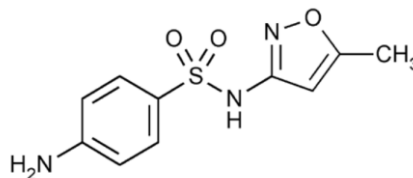
**Obrázok č. 21:** Sulfanilamid

**Sulfamethoxazol** ( $N^1$ -(5-methyl-3-izoxazolyl)sulfanilamid, SMX) je baktériostatický sulfónamid, ktorý kompetitívne inhibuje dihydropteroát syntázu (DHPS), čím zabraňuje tvorbe dihydropteroovej kyseliny. Najčastejšie sa kombinuje s trimetoprimom (TMP; 2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxybenzyl)pyrimidín).

Antimykotická aktivita SMX bola dokázaná viacerými štúdiami k vláknitým hubám rodu *Aspergillus* a *Histoplasma capsulatum* a ku kvasinke *Cryptococcus neoformans* (Hida *et al.*, 2005; Hanafy *et al.*, 2007; Brillhante *et al.*, 2010).

Do skupiny derivátov sulfamethoxazolu patrila len 1 látka (SMX-S-20), ktorá vykazovala veľmi dobrú antimykotickú aktivitu pri všetkých testovaných kmeňoch. Zdá sa, že za antifungálnu aktivitu bol zodpovedný substituent R, kde bol naviazaný 5-methylizoxazol-3-yl a substituent R<sup>1</sup>, na ktorom boli naviazané dva atómy jódu v polohách 3 a 5.

Najnižšia koncentrácia derivátu SMX-S-20 (7,81  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) bola potrebná pre inhibíciu rastu pri kmeňoch CA a CG. Najmenej citlivým kmeňom s najvyššou účinnou koncentráciou látky (250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) bola vláknitá huba AF.



**Obrázok č. 22:** Sulfamethoxazol

Ďalším sulfónamidom je **sulfadiazín** (*N*<sup>1</sup>-(2-pyrimidinyl)sulfanilamid, SDZ), ktorý v kombinácii s pyrimethamínom sa používa predovšetkým na liečbu toxoplazmózy a v kombinácii so striebornou soľou k liečbe menších popálenín a rán.

Testovali sme 12 derivátov sulfadiazínu (SS 1 – 8 a SDZ-S-8, SDZ-S-9, SDZ-S-19 a SDZ-S-20), ktoré boli substituované v pozícii R pyrimidín-2-ylom a v pozícii R<sup>1</sup> rôznymi substituentmi, od čoho sa pravdepodobne odvíjal aj ich antimykotický efekt.

Látky SS-1 s naviazaným 5-F, SS-2 s naviazanou metylovou skupinou v polohe 5 a SS-3 s naviazanou jednu molekulou 6-Cl, boli neúčinné. Neúčinná sa ukázala aj látka SDZ-S-9 so substituovanou 4-CH<sub>3</sub> skupinou.

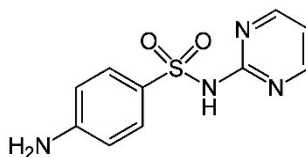
Látka SDZ-S-8 so substituovaným 4-NO<sub>2</sub> bola účinná len na kmeň TM v koncentrácii 250  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka SS-8 so substituovaným 5-NO<sub>2</sub> vykazovala antimykotickú aktivitu ku kmeňom CA,CG, AC a TM. Ako mierne účinná sa prejavila látka SDZ-S-19 s naviazaným 5-nitrofuránovým jadrom v koncentráciách od 250

$\mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ktorá neúčinkovala na vlákňitú hubu AC. Látka SS-7 s 2,5-dihydroxyfenylom bola vysoko účinná v nízkych koncentráciách voči všetkým testovaným kvasinkám a vlákňitým hubám s výnimkou AC, kde bola účinná až pri koncentrácii  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Ako vysoko účinné látky sa prejavili látky SDZ-S-20, SS-4, SS-5, SS-6 a SS-7, ktoré prejavili antimykotickú aktivitu ku všetkým testovaným kmeňom. Látky SS-4 (s 2 atómami chlóru), SS-5 (s naviazaným brómom a chlórom) a SS-6 (s naviazaným jódom a chlórom) obsahovali naviazaný 5-chlór, ktorý bol pravdepodobne zodpovedný za ich aktivitu spolu s jódom a brómom v polohe 3.

Najúčinnejším substituentom bola kombinácia 5-chlóru s 3-jódom (látka SS-6) v koncentráciách od  $1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka SDZ-S-20 obsahujúca 2 atómy jódu vykazovala najvyššiu účinnosť v koncentrácii  $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u kvasiniek CA, CG a TA a nižšiu, aj keď veľmi dobrú, účinnosť u vlákňitých húb.

Najmenej citlivým testovaným kmeňom bola vlákňitá huba AC, ktorej nárast neinhibovalo 6 látok (SS-1, SS-2, SS-3, SDZ-S-8, SDZ-S-9 a SDZ-S-19).



**Obrázok č. 23:** Sulfadiazín

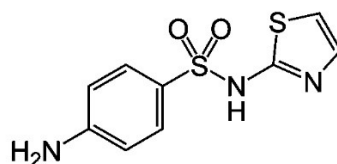
**Sulfathiazol** (4-amino-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)benzénsulfónamid, STZ) je lokálne sulfónamidové chemoterapeutikum, ktoré bolo nahradené menej toxickými alternatívami.

V skupine sulfathiazolu sme testovali 4 deriváty, kde R bolo substituované za thiazol-2-yl a  $R^1$  bolo špecifické pre každú látku. Všetky deriváty prejavili antimykotický účinok pri všetkých testovaných kmeňoch. Výnimku tvorila látka STZ-S-1 so substituovanými dvoma atómami chlóru ( $3,5\text{-Cl}_2$ ), ktorá neprejavila aktivitu ku kmeňu AC ani pri koncentrácii  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Vysoko účinné boli látky STZ-S-2, STZ-S-3 a STZ-S-4, ktoré prejavili antimykotický účinok na všetky testované kmene. Látka STZ-S-2 (substitúcia 3-brómom a 5-chlórom) vykazovala podobné účinky a hodnoty MIC ako látka STZ-S-3 (3-I, 5-Cl).



Najvýhodnejšou substitúciou sa ukázalo zavedenie dvoch atómov jódu u látky STZ-S-4, ktorá vykazovala antifungálny účinok v koncentrácii od  $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u TM až po koncentráciu  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u AC. Pri kmeňoch kvasiniek CA, CT, CK, CG a TA vykazovala táto látka jednotnú hodnotu MIC a to  $15,62 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

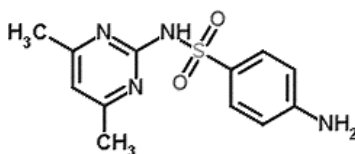


**Obrázok č. 24:** Sulfathiazol

Medzi deriváty **sulfamethazínu** (4-amino-*N*-(4,6-dimethylpyrimidín-2-yl)benzénsulfónamid, SMZ) sme zaradili 4 látky (SMZ-S-1, SMZ-S-2, SMZ-S-3 a SMZ-S-4), ktoré vykazovali antimykotickú aktivitu k všetkým testovaným kmeňom. Podobne ako pri predošlej skupine sa za  $R^1$  substituovali rôzne halogény.

Látka SMZ-S-1 obsahovala dve molekuly chlóru a bola dobre účinná v koncentráciách od  $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$  ako pre kvasinky tak aj pre vláknité huby. Bola najúčinnějšía z celej skupiny pre kmeň vláknitej huby AC s hodnotou koncentrácie  $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka SMZ-S-2 (substitúcia brómom a chlórom) a SMZ-S-4 (substitúcia 2 atómami jódu) boli účinné ku všetkým kmeňom v koncentráciách od  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Látka SMZ-S-3 mala substituovaný 3-jód a 5-chlór, čo bola najúčinnějšía kombinácia substituentov, látka pôsobila antimykoticky pri kmeni TM v koncentrácii len  $1,95 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Pri ostatných kmeňoch sa hodnoty koncentrácií pohybovali od  $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u CA až po  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pri AC. Najviac rezistentný kmeň spomedzi kvasiniek a vláknitých húb bol AC.



**Obrázok č. 25:** Sulfamethazín

**Deriváty benzohydrazidu** sú novou potenciou skupinou látok s predovšetkým antibakteriálnou, ale aj možnou antimykotickou aktivitou. Mor *et al.* testovali látky nazvané BHBM [*N'*-(3-bróm-4-hydroxybenzylidén)-2-methylbenzohydrazid] a D0 [3-bróm-*N'*-(3-bróm-4-hydroxybenzylidén)benzohydrazid] a pomenovali ich ako hydrazycíny. V štúdiu bolo dokázané, že mechanizmus účinku spočíva v interferencii s hubovým sfingolipidom glukozylceramidom (GlcCer), čím dochádza k zastaveniu bunkového cyklu (Mor *et al.*, 2015).

V našom prípade sme testovali 9 derivátov hydrazidu so základným vzorcom *N'*-4-(trifluórmethyl)benzohydrazid, ktoré nevykazovali antimykotickú aktivitu pri žiadnom testovanom kmeni.

Látky BH-65, BH-71 a BH-72 mali substituovaný pyridínový kruh. Taktiež neúčinné bolo naviazanie fenylu spoločne s brómom, chlóróm alebo jódom u látok BH-66, BH-67 a BH-68. Látka BH-69 mala substituovaný fenetyl, ktorý podľa jednej štúdie vo forme etylesteru kyseliny kávovej (caffaic acid phenethyl ester, CAPE), ktorý sa prirodzene nachádza v propolise (včelí tmel), mal vykazovať antimykotickú a antibiotickú aktivitu (Pukkila-Worley *et al.*, 2014). Látka BH-70 so substituovaným 2-fenyletén-1-ylom taktiež nevykazovala antimykotickú aktivitu.

**Pyrazín** je šesťčlánkový aromatický heterocyklus, ktorý v polohe 1 a 4 obsahuje dva dusíky. Je menej bázičný ako pyrimidín alebo pyridín. Rôzne jeho deriváty ako napríklad fenazín sú známe antitumorovými, antibiotickými a diuretickými účinkami.

Látka POA-AMID-2 (*N*-fenylpyrazín-2-karboxamid) mala substituovaný vodík a v polohe R<sup>1</sup> fenyl. Látka nevykazovala antimykotickú aktivitu. Doležal *et al.* dokázal, že substitúcia brómom, fluórom alebo jódom na fenyle má významný antimykobakteriálny efekt. Príkladom látky, ktorá sa ukázala ako vysoko účinná k mykobaktériám, je *N*-(4-trifluoromethylfenyl)pyrazín-2-karboxamid (Doležal *et al.*, 2009).

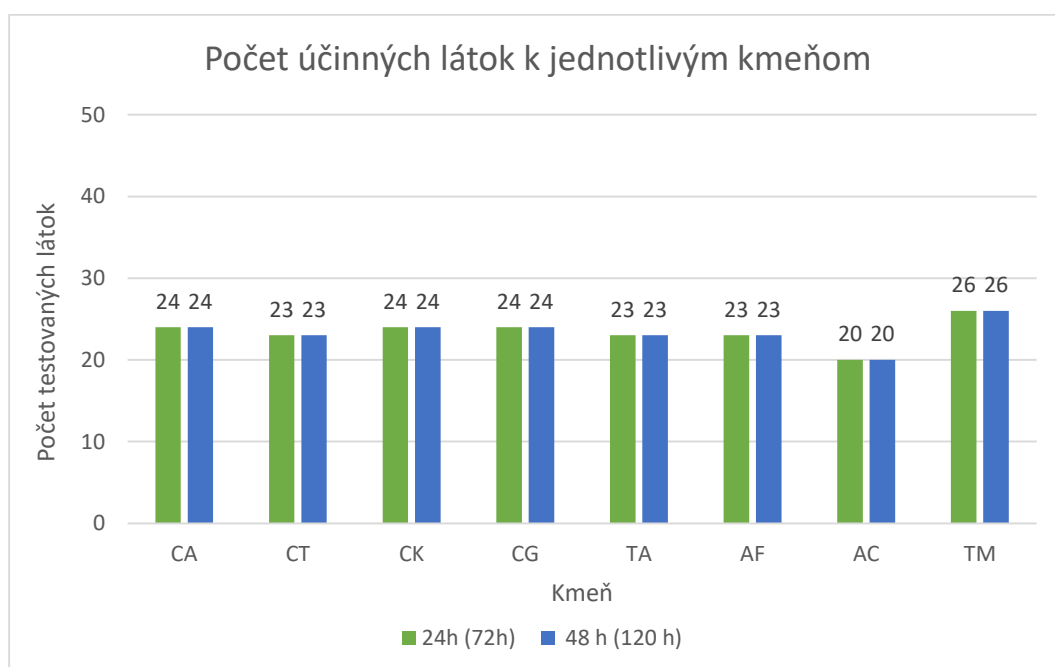
Ostatné látky neobsahovali naviazaný karboxamid ale v polohe R karboxylovú skupinu a v polohe R v prípade POA-A-1 sulfamoylovú skupinu naviazanú na fenyle, v prípade POA-A-2 bol naviazaný len fenyl a pri látke POA-A-3 bola naviazaná izonikotinoylamino skupina. Ani jedna z týchto látok neprejavila antimykotickú účinnosť pri koncentrácii 500 μmol.l<sup>-1</sup>.

**Pyrazinamid** (pyrazín-2-karboxamid) je derivátom pyrazínu a je antituberkulotikom v prvej línii liečby spolu s izoniazidom, rifampicínom a etambutolom. Problémom tuberkulózy je prítomnosť multi-rezistentných kmeňov, preto sa neustále hľadajú nové potencionálne antituberkulotiká. Pyrazinamid výrazne znižuje dobu liečby na 6 mesiacov a je aktívny pri slabo kyslom pH (Lincová *et al.*, 2002).

V tejto skupine derivátov sme testovali len 2 látky (POA-I-1 a POA-I-1-Ac), kde obe boli substituované sulfamoylovou skupinou a látka POA-I-1-Ac navyše obsahovala acetylovú skupinu. Ani jedna z dvoch testovaných látok neprejavila antimykotickú aktivitu.

Cieľom práce bolo stanoviť antimykotickú aktivitu testovaných látok a zároveň vyhodnotiť najcitlivejší a naopak najmenej citlivý kmeň. Podľa **grafu č. 1** (pozri nižšie) z celkových testovaných 52 látok vykazovalo až 26 (50 %) látok antimykotickú aktivitu k TM, ktorý bol najcitlivejším kmeňom spomedzi kvasiniek a vláknitých húb.

Ako najmenej citlivým k testovaným látkam bol kmeň vláknitej huby AC, ktorého nárast inhibovalo len 20 testovaných látok.



**Graf č. 1:** Počet účinných látok k jednotlivým kmeňom

Legenda: CA = *Candida albicans* ATCC® 44859™ (American testing culture collection), CT = *Candida tropicalis* 156, CK = *Candida krusei* E28, CG = *Candida glabrata* 20/I,

TA = *Trichosporon asahii* 1188, AF = *Aspergillus fumigatus* 231, AC = *Absidia corymbifera* 272, TM = *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Z celkovo 52 látok zostalo 26 látok s potencionálne antimykotickým účinkom, ktoré je možné ďalej testovať. Tieto výsledky sú len orientačné, nevylučuje sa riziko chýb pri testovaní, ktoré mohli vzniknúť nepozornosťou alebo náhodnou kontamináciou. Validita výsledkov by mala byť potvrdená opakovaným testovaním.

Vývoj liečivého prípravku a jeho uvedenie na trh je veľmi zdĺhavý a finančne náročný proces, ktorý potvrdzuje účinnosť a taktiež bezpečnosť pre človeka, preto je potreba, aby potencionálne antimykotiká prešli ďalšími podrobnejšími štúdiami.

## 10. ZÁVER

V tejto práci sme testovali 52 potencionalne antimykotických látok, kde 26 látok vykázalo antimykotickú účinnosť v koncentráciách nižších ako  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Testovanie prebiehalo mikrodilučnou bujónovou metódou na testovaných kmeňoch kvasiniek a vláknitých húb.

Zo skupiny derivátov a analógov izoniazidu ani jedna zo siedmich testovaných látok nemala antimykotický účinok. Podobne bez antimykotického účinku boli skupiny derivátov benzohydrazidu a pyrazínu.

Naopak výbornú účinnosť preukázali deriváty 4-aminobenzoovej, 4-aminosalicylovej a 5-aminosalicylovej kyseliny. Najúčinnjšou bola látka PABA-3 z derivátov 4-aminobenzoovej kyseliny so substituovaným jódom a chlóróm, ktorý inhiboval nárast niektorých kmeňov v najnižšej koncentrácii  $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka 5-PAS-3 z derivátov 5-aminosalicylovej kyseliny vykazovala antimykotický účinok pri nízkych koncentráciách hlavne k testovaným kmeňom kvasiniek.

Z rozsiahlej skupiny derivátov sulfónamidov, ktoré prekvapivo mali aj antimykotický účinok, sa za najúčinnjšiu dá považovať látka SDZ-S-20 obsahujúca 2 atómy jódu, ktorá dosahovala veľmi nízke hodnoty MIC pri všetkých testovaných kmeňoch.

Za najcitlivejším kmeň sa dal považovať dermatofyt *Trichophyton mentagrophytes*, naopak najmenej inhibovaným kmeňom bola vláknitá huba *Absidia corymbifera*.

Týmto testovaním bol prevedený prvotný screening potencionalných antimykotík. Je potreba ďalších výskumov a dlhodobých testovaní pre zistenie celkového spektra účinnosti, ozrejmenie presného mechanizmu účinku, farmakodynamiky a farmakokinetiky derivátov. Výzvou naďalej zostáva vývoj antifungálneho liečiva, ktoré selektívne účinkuje na bunky húb bez poškodenia ľudských buniek.

## 11. ZOZNAM TABULIEK A GRAFOV

### TABULKY:

<b>Tabuľka č. 1:</b> Mechanizmy účinku a rezistencie vybraných antimykotík.....	44
<b>Tabuľka č. 2:</b> Deriváty izoniazidu.....	61
<b>Tabuľka č. 3:</b> Analóga izoniazidu .....	62
<b>Tabuľka č. 4:</b> Deriváty 4-aminobenzoovej kyseliny .....	62
<b>Tabuľka č. 5:</b> Deriváty 4-aminosalicylovej kyseliny .....	63
<b>Tabuľka č. 6:</b> Deriváty 5-aminosalicylovej kyseliny .....	64
<b>Tabuľka č. 7:</b> Deriváty sulfónamidov .....	65
<b>Tabuľka č. 8:</b> Deriváty benzohydrazidu .....	68
<b>Tabuľka č. 9:</b> Deriváty pyrazínu/pyrazínamidu .....	69
<b>Tabuľka č. 10:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov izoniazidu .....	72
<b>Tabuľka č. 11:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity analógov izoniazidu.....	73
<b>Tabuľka č. 12:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov 4-aminobenzoovej kyseliny .....	74
<b>Tabuľka č. 13:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov 4-aminosalicylovej kyseliny .....	75
<b>Tabuľka č. 14:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov 5-aminosalicylovej kyseliny .....	76
<b>Tabuľka č. 15. a)</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity sulfónamidov: deriváty sulfadiazínu a derivát sulfamethoxazolu .....	77
<b>Tabuľka č. 16. b)</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity sulfónamidov: deriváty sulfathiazolu a derivát sulfamethazínu .....	79
<b>Tabuľka č. 17:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov benzohydrazidu .....	80
<b>Tabuľka č. 18:</b> Výsledky stanovenia antimykotickej aktivity derivátov pyrazínu alebo pyrazínamidu.....	82

### GRAFY:

<b>Graf č. 1:</b> Počet účinných látok k jednotlivým kmeňom.....	91
--	----

## 12. ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok č. 1:</b> A) Kolónia <i>C. albicans</i> na Sabouraudovom agare, B) Blastospóry a chlamyospóry <i>C. albicans</i> , C) Pučiace bunky <i>C. albicans</i> farbené kryštálovou violetou, D) Kvasinkovité bunky a germ tubes <i>C. albicans</i> .....	17
<b>Obrázok č. 2:</b> <i>C. tropicalis</i> na Sabouraudovom agare .....	19
<b>Obrázok č. 3:</b> <i>C. krusei</i> na Sabouraudovom agare.....	21
<b>Obrázok č. 4:</b> <i>C. glabrata</i> na Sabouraudovom agare.....	22
<b>Obrázok č. 5:</b> CHROMagar: (a) <i>C. albicans</i> , (b) <i>C. tropicalis</i> , (c) <i>C. krusei</i> , (d) <i>C. glabrata</i> , (e) <i>C. parapsilosis</i> .....	24
<b>Obrázok č. 6:</b> A) Kolónia <i>Trichosporon asahii</i> , B) Mikroskopický dôkaz hýf s hladkým povrchom a reťazovo usporiadanými arthrokonídiami .....	27
<b>Obrázok č. 7:</b> A) Kolónia <i>A. fumigatus</i> na Sabouraudovom agare, B) Mikroskopický dôkaz <i>A. fumigatus</i> .....	29
<b>Obrázok č. 8:</b> A) <i>A. corymbifera</i> na Sabouraudovom agare, B) 1 – rizoid, 2 – začiatok rastu sporangiofóru, 3 – sporangiofór, 4 – sporangium, C) Sporangia .....	31
<b>Obrázok č. 9:</b> A) <i>T. mentagrophytes</i> na Sabouraudovom agare, B) Opačná strana kolónie <i>T. mentagrophytes</i> , C) Mikroskopická kolónia <i>T. mentagrophytes</i> .....	33
<b>Obrázok č. 10:</b> Pôsobenie antimykotík (upravené).....	34
<b>Obrázok č. 11:</b> Amfotericín B a nystatín A <sub>1</sub> .....	36
<b>Obrázok č. 12:</b> Ketokonazol a flukonazol .....	38
<b>Obrázok č. 13:</b> Terbinafín.....	40
<b>Obrázok č. 14:</b> Kaspofungín.....	41
<b>Obrázok č. 15:</b> Flucytozín .....	42
<b>Obrázok č. 16:</b> Neo-Sensitabs. ....	49
<b>Obrázok č. 17:</b> Sensititre YeastOne; citlivosť <i>C. glabrata</i> k azolom .....	52
<b>Obrázok č. 18:</b> E-test; <i>C. albicans</i> citlivá k testovaným antimykotikám .....	53
<b>Obrázok č. 19:</b> Schéma prvej mikrotitračnej platničky .....	60
<b>Obrázok č. 20:</b> Porovnanie 4-amino a 5-aminosalicylovej kyseliny .....	86
<b>Obrázok č. 21:</b> Sulfanilamid.....	86
<b>Obrázok č. 22:</b> Sulfamethoxazol .....	87
<b>Obrázok č. 23:</b> Sulfadiazín .....	88
<b>Obrázok č. 24:</b> Sulfathiazol .....	89
<b>Obrázok č. 25:</b> Sulfamethazín .....	89

### 13. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Abegg, M., Alabarse, P., Casanova, A., *et al.* Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, 2010, vol. 170, no. 1, p. 11-20. ISSN 1573-0832.

Ahmad, K., Kokošar, J., Guo, X., *et al.* Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 2014, vol. 14, no. 4, p. 529-535. ISSN 1567-1364.

Alexander, B., Johnson, M., Pfeiffer C., *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, vol. 56, no. 12, p. 1724-1732. ISSN 1537-6591.

Alexander, B., Johnson, M., Pfeiffer, C., *et al.* Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 2013, vol. 56, no. 12, p. 1724-1732. ISSN 1537-6591.

Ates, A., Ozcan, K., Ilkit, M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Medical Mycology*, 2008, vol. 46, no. 8, p. 811-822. ISSN 1460-2709.

Atlas online de microbiologie - Disciplina de Microbiologie UMF Târgu-Mureș. *Candida krusei* [online]. [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://atlas.microumftgm.ro/micologie/levuri/ckrusei.php>.

Atlas online de microbiologie - Disciplina de Microbiologie UMF Târgu-Mureș. *Candida glabrata* [online]. [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://atlas.microumftgm.ro/micologie/levuri/cglabrata.php>.

Barton, R. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica*, 2012, vol. 2013, 29 p. ISSN 2090-908X.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996. 558 p.



- Bowyer, P., Moore, C., Rautemaa, R., *et al.* Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*. *Current Infectious Disease Reports*, 2011, vol. 13, no. 6, p. 485-491. ISSN 1534-3146.
- Boyce, K., Andrianopoulos, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, vol. 39, no. 6, p. 797-811. ISSN 1574-6976.
- Briard, B., Heddergott, C., Latgé, J. Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2. ISSN 2150-7511.
- Brilhante, R., Fechine, M., Cordeiro, R., *et al.* *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, vol. 54, no. 9, p. 3978-3979. ISSN 1098-6596.
- Brown, G., Denning, D., Gow, N., *et al.* Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 2012, vol. 4, no. 165, p. 1-9. ISSN 1946-6242.
- Brüggemann, R., Alffenaar, J., Blijlevens, N., *et al.* Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, vol. 48, no. 10, p. 1441-1458. ISSN 1537-6591.
- Brunke, S., Hube, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular Microbiology*, 2013, vol. 15, no. 5, p. 701-708. ISSN 1462-5822.
- Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., *et al.* *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. 192 p. ISBN 80-7184-565-5.
- Bursová, Š., Dušková, M., Necedová, L., Karpíšková, R., Myšková, P. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014b. 80 p. ISBN 978-80-7305-676-6.
- Bursová, Š., Karpíšková, R., Dušková, M., Necedová, L. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie*. Revidované vydání. 2. ed. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014a. 73 p. ISBN 978-80-7305-683-4.
- Carrillo-Muñoz, A., Giusiano, G., Ezkurra, P., *et al.* Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*, 2006, vol. 19, no. 2, p. 130-139. ISSN 1988-9518.

- Colombo, A., Padovan, A., Chaves, G. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, vol. 24, no. 4, p. 682-700. ISSN 1098-6618.
- Cordeiro, R., Marques, F., Cordeiro, R., *et al.* Synthesis and antifungal activity *in vitro* of isoniazid derivatives against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, vol. 58, no. 5, p. 2504-2511. ISSN 1098-6596.
- Costa-de-Oliveira, S., Sampaio-Marques, B., Barbosa, M., *et al.* An alternative respiratory pathway on *Candida krusei*: implications on susceptibility profile and oxidative stress. *FEMS Yeast Research*, 2012, vol. 12, no. 4, p. 423-429. ISSN 1567-1364.
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-Del-Campo, M., Cañas-Villamar I., *et al.* High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by the single catalase, Cta1p, and controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p and Msn4p. *Eukaryotic Cell*, 2008, vol. 7, no. 5, p. 814-825. ISSN 1535-9786.
- Česká sbírka mikroorganismů. *Lékařská mykologie (Bi3390) Kandidózy* [online]. Masarykova Univerzita Přírodovědecká fakulta: Ústav experimentální biologie [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3663656/>.
- Deacon, J. *Fungal Biology*. 4. ed. Wiley-Blackwell, 2005. 384 p. ISBN 978-1-4051-3066-0.
- Denning, D. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 2003, vol. 362, no. 9390, p. 1142-1151. ISSN 0140-6736.
- Doležal, M., Buchta, V. Aktuální pohled na skupiny antimykotik. *Praktické lékařství*, 2006, vol. 1, no. 2, p. 10-14. ISSN 1803-5329.
- Doležal, M., Zitko, J., Kešetovičová, D., *et al.* Substituted *N*-Phenylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Molecules*, 2009, vol. 14, no. 10, p. 4180-4189. ISSN 1420-3049.
- Drgoňa, Ľ. *Infekčné komplikácie onkologických pacientov – vybrané kapitoly*. Bratislava: Univerzita Komenského, 2013. 85 p. ISBN 978-80-223-3468-6.
- Edmond, M., Wallace, S., McClish, D., *et al.* Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical infectious diseases*, 1999, vol. 29, no. 2, p. 239-244.

EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs* [online]. 2017 [cit. 24.03.2017]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/Antifungal\\_breakpoints\\_v\\_8.1\\_March\\_2017.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8.1_March_2017.pdf).

EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* [online]. 2010 [cit. 07.02.2017]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/previous\\_versions\\_of\\_documents/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/).

EUCAST. *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts* [online]. 2017 [cit. 24.03.2017]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_7\\_3\\_1\\_Yeast\\_testing\\_definitive.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf).

Eucker, J., Sezer, O., Graf, B., *et al.* Murcomycoses. *Mycoses*, 2001, vol. 44, no. 7-8, p. 253-260. ISSN 1439-0507.

Fernandez, J., Erstad, B., Petty, W., *et al.* Time to positive culture end identification for *Candida* blood stream infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, vol. 64, no. 4, p. 402-407. ISSN 0732-8893.

Fidel, P., Vazquez, J., Sobel, J. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, vol. 12, no. 1, p. 80-96. ISSN 1098-6618.

Fun with microbiology. *Absidia corymbifera* [online]. Publikované 24.02.2012 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/02/absidia-corymbifera-lichtheimia.html>.

Fun with microbiology. *Aspergillus fumigatus* [online]. Publikované 20.01.2012 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>.

Fun with microbiology. *Candida albicans* [online]. Publikované 09.12.2009 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2009/12/candida-albicans.html>.

Fun with microbiology. *Trichophyton mentagrophytes* [online]. Publikované 14.04.2013 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2013/04/trichophyton-mentagrophytes-complex.html>.

Fun with microbiology. *Trichosporon asahii* [online]. Publikované 21.08.2014 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2014/08/trichosporon-species.html>.

Gill, K., Kumar, S., Xess, I., Dey, S. Novel synthetic anti-fungal tripeptide effective against *Candida krusei*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2015, vol. 33, no. 1, p. 110-116. ISSN 0255-0857.

Gotz, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 2002, vol. 43, no. 6, p. 1367-1378. ISSN 1365-2958.

Gow, N., Hube, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, vol. 15, no. 4, p. 406-412. ISSN 1369-5274.

Groll, A., Piscitelli, S., Walsh, T. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Advances in Pharmacology*, 1998, vol. 44, p. 343-500.

Haber, J. ABELCET (Lipidový komplex amfotericinu B, ABLC) - nové možnosti léčby aspergilových infekcí u orgánových transplantací. *Bulletin HPB: Časopis české hepato-pankreato-biliární chirurgie*, 2000, vol. 8, no. 3, p. 31-35. ISSN 1210-6755.

Hamal, P. Molekulárně genetické metody v lékařské mykologii: současný stav a perspektivy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007, vol. 13, no. 4, p. 136-144. ISSN 1211-264X.

Hanafy, A., Uno, H., Mitani, Y., et al. *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2007, vol. 48, no. 1, p. 47-50. ISSN 1882-0476.

Havlickova, B., Czaika, V., Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 2008, vol. 52, no. 1, p. 2-15. ISSN 1439-0507.

Hector, R. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 1993, vol. 6, no. 1, p. 1-21. ISSN 1098-6618.

Heizerová, M. Onychomykózy - stále aktuálny problém. *Dermatológia pre prax*, 2013, vol. 7, no. 2-3, p. 66-69. ISSN 1339-4207.

Hida, S., Yoshida, M., Nakabayashi, I., *et al.* Anti-fungal activity of sulfamethoxazole toward *Aspergillus* species. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, vol. 28, no. 5, p. 773-778. ISSN 0918-6158.

Hof, H. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? *Drug Resistance Updates*, 2008, vol. 11, no. 1-2, p. 25-31. ISSN 1368-7646.

Hof, H., Kupfahl, C. Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: an example that mycotoxins are potential virulence factors. *Mycotoxin Research*, 2013, vol. 25, no. 3, p. 123-131. ISSN 1867-1632.

Hospenthal, D., Rinaldi, M. *Diagnosis and treatment of fungal infections*. 2. ed. Springer, 2015. 299 p. ISBN 978-3-319-13090-3.

Chauhan, N., Latge, J., Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, vol. 4, no. 6, p. 435-444. ISSN 1740-1534.

Chiba University Research center for pathogenic fungi and microbial toxicoses. *Candida tropicalis* [online]. Publikované 1999 [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: [http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/c/Candida\\_tropicalis\\_colony.htm](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/c/Candida_tropicalis_colony.htm).

Jacobsen, I., Wilson, D., Wächtler, B., *et al.* *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2012, vol. 10, no. 1, p. 85-93. ISSN 1744-8336.

Jain, N., Kohli, R., Cook, E., *et al.* Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol. 73, no. 6, p. 1697-1703. ISSN 1098-5336.

Jespersen, L., Nielsen, D., Hønholt, S., *et al.* Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 2005, vol. 5, no. 4-5, p. 441-453. ISSN 1567-1364.

Joseph, J., Jain, R., Danziger, L. Micafungin: a new echinocandin antifungal. *Pharmacotherapy*, 2007, vol. 27, no. 1, p. 53-67. ISSN 1875-9114.

Kahlmeter, G., Brown, D., Goldstein, F., *et al.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, vol. 52, no. 2, p. 145-148. ISSN 1460-2091.

Kalhotka L. *Vláknité mikromycety: Plísň* [online]. Mendelova univerzita v Brně. Publikované 2013 [cit. 07.03.2017]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty/files/21/21-plisne.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/21/21-plisne.pdf).

Kanafani, Z., Perfect, J. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, vol. 46, no. 1, p. 120-128. ISSN 1537-6591.

Kaur, S, Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 2013, vol. 52, no. 1, p. 2-9. ISSN 1460-2709.

Kocmanová, I. *Lékařská mykologie* [online]. Masarykova univerzita, 2015 [cit. 23.03.2017]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2015/BLKLM0422p/um/18\\_Mykologie.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2015/BLKLM0422p/um/18_Mykologie.pdf).

Kontoyiannis, D., Lewis, R. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy. *British Journal of Haematology*, 2004, vol. 126, no. 2, p. 165-175. ISSN 1365-2141.

Kurtz, M., Heath, I., Marrinan, J., *et al.* Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, vol. 38, no. 7, p. 1480-1489. ISSN 1098-6596.

Larone, D. *Medically important fungi: a guide to identification*. 4. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 2002. 409 p. ISBN 978-1555811723.

Leboffe, M., Pierce, B. *A photographic atlas for the microbiology laboratory*. 4. ed. Colorado: Morton, 2011. 256 p. ISBN 978-089582-872-9.

Li, L., Redding, S., Dongari-Bagtzoglou, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, 2007, vol. 86, no. 3, p. 204-215. ISSN 15440591.

Lincová, D., Farghali, H., *et al.* *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, 2002. 601 p. ISBN 8072621688.

Loeffler, J., Stevens, D. Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, vol. 36, no. 1, p. 31-41. ISSN 1537-6591.

Maertens, J., Raad, I., Marr, K., *et al.* Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *The Lancet*, 2016, vol. 387, no. 10020, p. 760-769. ISSN 0140-6736.

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* [online]. Příloha 5/2011. ISSN 1212-4184. [cit. 08.02.2017]. Dostupné z:

<http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/testovani-citlivosti-mikromycet-k-antimykotikum-in-vitro-u-imunosuprimovanych-pacientu-doporuceni-odborniku-s-podporou-cell-a-slm-cls-jep-462246>.

Mallátová, N., Mencl, K. *Laboratorní diagnostika invazivní kandidózy* [online]. *Postgraduální medicína*: Publikované 05.11.2010. [cit. 29.01.2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/laboratorni-diagnostika-invazivni-kandidozy-455845>.

Mandras, N., Roana, J., Scalas, D., *et al.* *In vitro* antifungal activity of fluconazole and voriconazole against non-*Candida* yeasts and yeast-like fungi clinical isolates. *New Microbiologica*, 2015, vol. 38, no. 4, p. 583-587. ISSN 1121-7138.

Manzano-Gayosso, P., Mendéz-Tovar, L., Hernández-Hernández, F., *et al.* Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. *Gaceta Medica de Mexico*, 2008, vol. 144, no. 1, p. 23-26. ISSN 0016-3813.

Medical Cheat Sheets. *Terbicip Tablets (Terbinafine Hydrochloride)* [online]. 2011 [cit. 03.02.2017]. Dostupné z: <http://medicalcheatsheets.blogspot.sk/2011/06/terbicip-tablets-terbinafine.html>.

Miyajima, Y., Satoh, K., Uchida, T., *et al.* Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with *tinea unguium* and *tinea pedis* using specific fluorescent probes. *Journal of Dermatological Science*, 2013, vol. 69, no. 3, p. 229-235. ISSN 0923-1811.

- Mor, V., Rella, A., Farnoud, A., *et al.* Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 3. ISSN 2150-7511.
- Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, T., Hacker, J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, vol. 153, no. 2, p. 349-355. ISSN 1574-6968.
- Mukherjee, P., Leidich, S., Isham, N., *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, vol. 47, no. 1, p. 82-86. ISSN 1098-6596.
- Munro, C., Selvaggini, S., de Bruijn, I., *et al.* The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 2007, vol. 63, no. 5, p. 1399-1413. ISSN 1365-2958.
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., *et al.* Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012, vol. 31, no. 7, p. 1399-1412. ISSN 1435-4373.
- Nobile, C., Schneider, H., Nett, J., *et al.* Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Current Biology*, 2008, vol. 18, no. 14, p. 1017-1024. ISSN 0960-9822.
- Nucci, M., Colombo, A. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007, vol. 58, no. 1, p.77-82. ISSN 0732-8893.
- Oceanside Pharmaceuticals. *Flucytosine* [online]. 2014 [cit. 04.02.2017]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/pro/flucytosine.html>.
- Odds, F., Brown, A., Gow, N. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 2003, vol. 11, no. 6, p. 272-279. ISSN 0966-842X.
- Offner, F., Krcmery, V., Boogaerts, M., *et al.* Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, vol. 48, no. 12, p. 4808-4812. ISSN 1098-6596.
- Okawa, Y., Miyauchi, M., Kobayashi, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, vol. 31, no. 8, p. 1507-1510. ISSN 1347-5215.



- Osborne, C., Leitner, I., Hofbauer, B., *et al.* Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, vol. 50, no. 6, p. 2234-2236. ISSN 1098-6596.
- Pánková, R. Komplexní léčba kandidóz. *Urologie pro praxi*, 2012, vol. 13, no. 5, p. 209-211. ISSN 1803-5299.
- Pannu, J., McCarthy, A., Martin, A., *et al.* NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, no. 8, p. 3273-3279. ISSN 1098-6596.
- Park, S., Kelly, R., Kahn, J., *et al.* Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, no. 8, p. 3264-3273. ISSN 1098-6596.
- Pemán, J., Cantón, E., Quindós, G., *et al.* Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, vol. 67, no. 5, p. 1181-1187. ISSN 1460-2091.
- Perea, S., Patterson, T. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases*, 2002, vol. 35, no. 9, p. 1073-1080. ISSN 1537-6591.
- Perlin, D. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates*, 2007, vol. 10, no. 3, p. 121-130. ISSN 1368-7646.
- Pfaller, M. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 2012, vol. 125, no. 1, p. S3-S13. ISSN 0002-9343.
- Pfaller, M., Castanheira, M., Lockhart, S., *et al.* Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, vol. 50, no. 4, p. 1199-1203. ISSN 1098-660X.

Pfaller, M., Diekema, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, vol. 20, no. 1, p. 133-163. ISSN 1098-6618.

Philpot, C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. *Medical Mycology*, 2009, vol. 5, no. 3, p. 189-193. ISSN 1460-2709.

*PubChem Compound Database, CID = 3767* [online]. National Center for Biotechnology Information. [cit. 15.02.2017]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3767>.

*PubChem Compound Database, CID = 4075* [online]. National Center for Biotechnology Information. [cit. 15.02.2017]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4075>.

Pukkila-Worley, R., Holson, E., Wagner, F., *et al.* Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts. *Current Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 16, no. 13, p. 1588-1595. ISSN 1875-533X.

Rast, T., Kullas, A., Southern, P., Davis, D. Human epithelial cells discriminate between commensal and pathogenic interactions with *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 4, p. 1-16. ISSN 1932-6203.

Ray, D., Goswami, R., Banerjee, U., *et al.* Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diabetes Care*, 2007, vol. 30, no. 2, p. 312-317. ISSN 1935-5548.

Reen, F., Phelan, J., Woods, D., *et al.* Harnessing bacterial signals for suppression of biofilm formation in the nosocomial fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7, p. 2074. ISSN 1664-302X.

Richardson, M., Warnock, D. *Fungal Infection Diagnosis and Management*. 3. ed. Victoria: Blackwell, 2003. 366 p. ISBN 1-4051-15785.

Ruzzini, A., Sit, C., Arnam, E., *et al.* Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, vol. 113, no. 46, p. 12940-12945. ISSN 0027-8424.

Samaranayake, Y. *Candida krusei*: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 1994, vol. 41, p. 295-310. ISSN 0022-2615.

Sangshetti, J., Lokwani, D., Sarkate, A., *et al.* Synthesis, antifungal activity, and docking study of some new 1,2,4-triazole analogs. *Chemical Biology & Drug Design*, 2011, vol. 78, no. 5, p. 800-809. ISSN 1747-0285.

Scorzoni, L., Lucas, M., Mesa-Arango, A., *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 3. ISSN 1932-6203.

Sendid, B., Poirot, J., Tabouret, M., *et al.* Combined detection of mannan and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, vol. 51, p. 433-442. ISSN 0022-2615.

Shirazi, F., Ferreira, J., Stevens, D., *et al.* Biofilm filtrates of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients inhibit preformed *Aspergillus fumigatus* biofilms via apoptosis. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3. ISSN 1932-6203.

Schwenker, G. *New antifungal drug approved by FDA* [online]. 2015 [cit. 04.02.2017]. Dostupné z: <http://formularyjournal.modernmedicine.com/formulary-journal/news/new-antifungal-drug-approved-fda>.

Skořepová, M. Klinické obrazy dermatomykóz. *Interní medicína pro praxi*, 2003, vol. 10, no. 5, p. 11-14. ISSN 1803-5256.

Speirs, J., van der Ent, C., Beekman, J. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*, 2012, vol. 18, no. 6, p. 632-638. ISSN 1531-6971.

Srikantha, T., Zhao, R., Daniels, K., *et al.* Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryotic Cell*, 2005, vol. 4, no. 8, p. 1434-1445. ISSN 1535-9786.

Špaček, J., Buchta, V., Jílek, P., *et al.* *Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí*. Praha: Grada, 2013. 360 p. ISBN 978-80-247-4554-1.

- Tosti, A., Piraccini, B., Lorenzi, S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2000, vol. 42, no. 2, p. 217-224. ISSN 0190-9622.
- Urbášková, P., Žemliková, H., Hrabák, J. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*, 2010, vol. 19, no. 9, p. 266-267. ISSN 1804-8676.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, A. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012, vol. 2012, 26 p. ISSN 1687-9198.
- Verweij, P., Snelders, E., Kema, G., *et al.* Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious Diseases*, 2009, vol. 9, no. 12, p. 789-795. ISSN 1473-3099.
- Vijaya, D., Dhanalakshmi, T., Kulkarni, S. Changing trends of vulvovaginal candidiasis. *Journal of Laboratory Physicians*, 2014, vol. 6, no. 1, p. 28-30. ISSN 0974-2727.
- Volleková, A. Antimykotiká v dermatologii. *Dermatológia pre prax*, 2012, vol. 6, no. 4, p. 152-157. ISSN 1339-4207.
- Votava, M., Růžička, F., Woznicová, V., *et al.* *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. 1. ed. Brno: Neptun, 2010. 495 p. ISBN 978-80-86850-04-7.
- Walker, L., Munro, C., de Bruijn, I., *et al.* Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathogens*, 2008, vol. 4, no. 4, p. 1-12. ISSN 1553-7374.
- Whelan, W., Simon, S., Beneke, E., *et al.* Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. *FEMS Microbiology Letters*, 1984, vol. 24, no. 1, p. 1-4. ISSN 1574-6968.
- Xie, Z., Thompson, A., Sobue, T., *et al.* *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012, vol. 206, no. 12, p. 1936-1945. ISSN 1537-6613.
- Xiong, Z-Q., Tu, X-R., Wei, S-J., *et al.* The mechanism of antifungal action of a new polyene macrolide antibiotic antifungalmycin 702 from *Streptomyces padanus* JAU4234 on the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 8, p. 1-6. ISSN 1932-6203.

Zheng, J., Rubin, E., Bifani, P., *et al.* *para*-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no. 32, p. 23447-23456. ISSN 1083-351X.

Zotchev, S. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 10, no. 3, p. 211-223. ISSN 0929-8673.