

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biologických a lékařských věd

**Studium morfo-fyziologických aspektů růstu**  
***Candida albicans* ve vztahu k lidským hormonům**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2007

Petra VACULÍKOVÁ

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE**  
**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ**

Department of Biological and Medical Sciences

**Study of morpho-physiological aspects of the growth of**  
***Candida albicans* on the dependence to human hormones**

Diploma thesis

Hradec Králové, 2007

Petra VACULÍKOVÁ

Za odborné vedení při vzniku této diplomové práce děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc.

Za technickou pomoc v laboratoři a psychickou podporu děkuji paní laborantce Idě Dufkové.

Za trpělivost, vstřícnost, cenné rady i úsměv děkuji paní Mgr. Marcele Vejsové.

# OBSAH

OBSAH.....	4
SEZNAM ZKRATEK.....	6
1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Význam houbových organismů.....	8
2.2. Systém patogenních hub.....	9
2.3. <i>Rod Candida</i> .....	10
2.4. <i>Candida albicans</i> .....	10
2.5. Onemocnění vyvolaná houbami.....	11
2.6. Kandidóza.....	12
2.7. Vulvovaginální infekce.....	13
2.8. Léčba mykotických infekcí.....	15
2.9. Léčba vulvovaginální infekce.....	24
2.10. Hormony.....	27
2.11. Menstruační cyklus.....	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1. Materiál.....	32
3.2. Schéma pokusu.....	33
3.3. Příprava testovacích kmenů a inokula.....	33
3.4. Složení a příprava médií.....	34
3.5. Příprava testovaných látek.....	34
3.6. Vlastní pokus.....	36
4. VÝSLEDKY.....	41
5. DISKUSE.....	52
6. ZÁVĚR.....	54
7. ABSTRAKT.....	55
8. ABSTRACT.....	56

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	57
10. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKU .....	58

## SEZNAM ZKRATEK

CA – *Candida albicans*

cfu – colony forming units

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MOPS- Kyselina morfolinpropansulfonová

SGA – Sabouraudův glukózový agar

TRH - thyroliberin

TSH - thyrotropin

# 1. ÚVOD

Vaginální zánět vyvolaný mikroskopickými houbami je velmi častou komplikací žen fertilního věku. Odhaduje se, že přibližně 75 % žen se s tímto problémem setká alespoň jednou za život. Jde o nepříjemné infekční onemocnění, které se v případě chronického průběhu stává nejenom medicínským a ekonomickým problémem, ale může být i důvodem vážného narušení partnerského života postižené ženy.

Léčba akutní ataky je dnes snadná a velmi účinná, nejčastěji používanými lokálními antimykotiky jsou azolové deriváty. Rekurentní vaginální kandidóza je onemocněním vyskytující se méně často, ale medikace je obtížnější, protože přináší jen dočasnou úlevu. Ženy postiženy alespoň třikrát až čtyřikrát ročně. Při léčbě chronické formy je třeba myslet také na vyloučení či upravení predispozičních faktorů.

Obecně se má za to, že vznik vulvovaginální kandidózy je podmíněn hormonálně. Ne všechny aspekty působení pohlavních hormonů jsou však známy a prostudovány.

Cílem předložené diplomové práce bylo posouzení změn růstu a morfologie kmenů *Candida albicans* podmíněných přítomností pohlavních hormonů. Studium bylo zaměřeno na vliv pohlavních hormonů na růst a citlivost sledovaných kmenů kandid k antifungálním lékům.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Význam houbových organismů

Houby tvoří zcela samostatnou říši, která se nazývá Fungi. Jedná se o jedno- a vícebuněčné organismy s typickou eukaryotickou stavbou buňky. Houby jsou chemoheterotrofní organismy, zdrojem uhlíku i energie jsou jim tedy organické látky. Vedle primárního metabolismu je pro houby typický metabolismus sekundární, kterým mohou produkovat, mimo jiné, i látky pro člověka toxické.

Základní morfologickou jednotkou hub je hyfa splétající vláknité mycelium. To může být někdy redukováno na jedinou buňku, jako je tomu u kvasinek. Některé houby (např. *Candida albicans*) mohou v závislosti na prostředí růst jak ve formě vláknité, tak ve formě kvasinek. Tento zajímavý jev se nazývá dimorfismus.

Houby se vyznačují převážně saprofytickým způsobem výživy, jsou to destruenti zejména ligninu, celulózy, keratinu apod.

Některé houby mohou být pro člověka patogenní a způsobit mykoalergie, mykotoxikózy, mycetismy nebo mykózy, na druhou stranu se mnoho z hub uplatňuje při genetických manipulacích či v průmyslu při výrobě vína, piva, sýrů, léků apod.



## 2.2. Systém patogenních hub

Tab. 1 Systém lékařsky významných hub pro člověka

<b>EUMYCOTA (pravé houby)</b>
<b>Zygomycetes (spájkivé houby)</b>
MUCORALES
<i>Rhizomucor, Mucor, Rhizopus, Absidia</i>
ENTOMOPHTHORALES
<i>Basidiobolus, Conidiobolus</i>
<b>Ascomycetes (vřeckovýtrusé houby)</b>
<i>Talaromyces, Eurotium, Arthroderma, Ajellomyces, Saccharomyces, Claviceps</i>
<b>Basidiomycetes (stopkovýtrusé houby, makromycety)</b>
AGARICALES
<i>Amanita, Boletus, Inocybe, Tricholoma</i>
<b>Fungi Imperfecti (Deuteromycetes, nedokonalé houby)</b>
BLASTOMYCETES
<i>Candida, Cryptococcus, Malassezia, Rhodotorula, Trichosporon</i>
HYPHOMYCETES
<i>Alternaria, Aspergillus, Blastomyces, Epidermophyton, Fusarium, Geotrichum,</i>
<i>Histoplasma, Microsporium, Pencillium, Trichophyton</i>

### **2.3. Rod *Candida***

Kvasinky rodu *Candida* jsou na celém světě řazeny k původcům jak povrchových, tak i systémových mykóz. Vyskytují se celosvětově, u zdravých jedinců jsou součástí jeho přirozené mikroflóry, zejména sliznice trávicího traktu a orofaryngu, méně kolonizují kůži. Kvasinky najdeme na rostlinném i na živočišném materiálu, mohou žít také na rozkládajících se zbytcích jejich těl (Fragner, 1984).

Onemocnění vyvolaná rodem *Candida* jsou velmi pestrá. Záleží především na tom, kterou kvasinkou jsou způsobena, na lokalizaci, na celkovém zdravotním stavu pacienta a na řadě dalších faktorech. Nejčastějším původcem nozokomiálních mykóz je *Candida albicans*, dalšími významnými patogenními druhy jsou *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a další (Bednář, 1996).

U nemocných oslabených vážnou chorobou mohou některé kvasinky (především *Candida albicans*) přestoupit sliznici dutiny ústní, žaludku nebo střeva do krevních cest a diseminovat do kteréhokoliv orgánu (Fragner, 1984).

### **2.4. *Candida albicans***

*Candida albicans* se vyskytuje v nejrůznějších vzorcích lidského původu, běžně ji najdeme např. ve sputu nebo výtěrech z dutiny ústní. Makroskopický vzhled kolonií závisí na podmínkách prostředí, v němž se nalézají, např. na typu kultivačního média.

*Candida albicans* je aerobní mikroorganismus, rozmezí teplot růstu na Sabouraudově glukozovém agaru je od 2°C do 40°C, optimum je 25 až 35°C (Bednář, 1996).

*Candida albicans* je schopna tvořit blastospóry, hyfy, pseudohyfy, chlamydospóry a zárodečné (klíční) hyfy. Kvasinky se množí pučením. Oválné blastokonidie měří kolem 3-6 μm a p ůí z nich dceřinné buňky. Pseudohyfa je tvořena pučícími buňkami, které se protahují a zůstávají spojené. Tyto buňky jsou širší než pravé hyfy a v místě jejich spojení je pseudohyfa zaškrcena. Chlamydospóry jsou kulaté, o něco větší než blastokonidie, v nativním preparátu jsou silně světlolomné. Většinou jsou umístěné na konci pseudohyfy. Zárodečné hyfy jsou pozorovatelné už po 1 hod kultivace v indukčním

médiu. Jsou to tenké trubičkovité útvary, které klíčí z blastokonidií bez zaškrcení v místě, kde opouštějí mateřskou buňku. Při kandidóze se ve tkáni nacházejí jak (pseudo)vláknité formy, tak i kvasinky (Votava, 2003). Všechny morfotypy se barví pozitivně dle Grama.

*Candida albicans* vytváří dva hlavní typy kolonií. Z klinického materiálu jsou kolonie hladké, smetanově bílé, vypouklé, mazlavé konzistence, okraj je kruhovitý, nevláknitý. Průměr kolonií je 3–7 cm. (Fragner, 1984). Buňky jsou kulaté nebo oválné. Kolonie izolované z vnějšího prostředí jsou matné, složené z protáhlých buněk (Bednář, 1996).

Kandidy zkvašují různé cukry a těchto jejich aktivit se využívá k určování druhů. Testy se nazývají zymogramy. *Candida albicans* štěpí glukózu, maltózu, sacharózu, neštěpí laktózu. Pro identifikaci kandid se využívá také jejich schopnost využít cukry a dusíkaté látky. Tyto asimilační testy se nazývají auxanogramy a jsou hojně využívány v laboratorní diagnostice kvasinek (Bednář, 1996).

Charakteristickou vlastností *C. albicans* je schopnost klíčení, což je tvorba tzv. klíčnicích hyf (germ tubes). Tvorba zárodečných hyf je nejsilnější u kmenů izolovaných z močových cest a z pochvy (Kaban, 2005).

Z hlediska patogenity *C. albicans* je významná adherence k hostitelským buňkám, tvorba klíčnicích hyf (vláknitá forma se pokládá za virulentnější, klíčnicí hyfy lépe adherují), důležitá je také biosyntéza enzymů fosfolipázy a proteáz (Votava, 2003).

## 2.5. Onemocnění vyvolaná houbami

Houbové organismy mohou poškozovat lidské zdraví čtyřmi způsoby. První možností jsou alimentární otravy způsobené požitím plodnic vyšších hub a intoxikací jejich toxiny, **mycetismy**. Nejčastějšími původci těchto otrav jsou druhy makromycetů jako jsou *Amanita phalloides*, *Amanita muscaria*, *Amanita pantherina*, *Boletus satanus* a další.

Druhý způsob představují otravy mykotoxiny po požití kontaminované potravy, tzv. **mykotoxikózy**. Hlavní producenti těchto toxinů jsou rody mikroskopických hub *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*.

Houby mohou také vyvolat hypersenzitivní reakce imunitního systému, **mykoalergie**. Nejfrekventovanější alergeny jsou vázány na spóry rodů *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* a další.

Nejběžnějšími a nejvýznamnějšími houbovými onemocněními jsou **mykózy**, které mají za následek přímé poškození tkáně hostitele působením rostoucí a rozmnožující se houbou. Rozdělují se na povrchové, kožní, podkožní a hluboké (lokalizované i systémové). Nejčastější jsou kožní mykózy (dermatomykózy), které postihují keratinizované vrstvy kůže, vlasové folikuly a nehty. Původci jsou jak dermatofyty (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*), tak i kvasinky a další houby. Odhadem postihují 10-20% populace. Nejedná se o závažné onemocnění, jde spíše o onemocnění obtěžující, ale poměrně dobře léčitelné. Chronický charakter často mají podkožní mykózy, které postihují hlubší vrstvy dermis, subkutánní tkáň i kosti. Vyskytují se v tropických a subtropických oblastech.

Systémové mykózy dělíme na primární a sekundární. Primární mykotické infekce jsou nejčastěji způsobeny dimorfními houbami, také kvasinkou *Cryptococcus neoformans*. Z hlediska klinické praxe je u nás důležitější výskyt sekundárních mykóz. Jsou to relativně vzácná onemocnění, ale mnohem závažnější a hůře léčitelná. Nejčastěji se s nimi setkáváme v nemocničním prostředí jako s tzv. nozokomiálními nákazami, které se vyznačují vysokou smrtností. Jedná se o kandidózy, aspergilózy, zygomykózy (Buchta, 1998).

## 2.6. Kandidóza

Kandidóza je nejčastější systémová mykóza v lékařské praxi (Bednář, 1996). Nejvýznamnějším původcem kandidózy je *C. albicans* (odpovídá 50 až 90% všech kandidóz), dalšími původci jsou tzv. non-*albicans* druhy (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* atd.)

Kandidóza (candidosis, soor, moučnivka) napadá především sliznice trávicího, urogenitálního systému a ústní dutiny. Generalizované kandidózy bývají pravidelně diagnostikovány post mortem (Fragner, 1984).

Klinický obraz kandidóz je velmi pestrý. Projevuje se jako onychomykóza, ústní sór, kandidémie, kandidurie, kožní kandidóza, kandidová tonzilitida, vulvovaginitida (Fragner, 1984).

Kandidózy dutiny ústní najdeme nejčastěji u novorozenců a u imunodeficientních pacientů (např. lidé s AIDS). Kožní kandidózy vznikají snadno na vlhkých místech se zápačkou a macerací. Jde o různě velká ložiska s kůží v centru zarudlou, při okrajích bílou. Kandidové onychomykózy se projevují bělavými, šedavými nebo jinak zbarvenými skvrnami na nehtové ploténce, která se nijak nerozpadá a netřepí, často si zanechává svůj lesk. V postižených místech se nehet ztenčuje. Častěji jsou postiženy prsty na ruce, než na nohou a to pouze na několika prstech, ne na celé končetině (Fragner, 1984).

Mezi významné predispozice a rizikové faktory vzniku mykóz je dlouhodobá terapie širokospektrými antibakteriálními antibiotiky, léčba kortikoidy, cytostatiky, diabetes mellitus, imunosupresivní terapie, věk, katetrizace, kontaminované infuzní roztoky atd.

## **2.7. Vulvovaginální infekce**

Nejčastějším onemocněním v běžné gynekologické praxi jsou vulvovaginální infekce. Většina infekcí postihuje vulvu i pochvu, ovšem můžeme se setkat i s atakou postihující lokálně pouze vulvu. Klinicky se projevují výtokem, pálením nebo svěděním vnějších rodidel. Tyto infekce se obecně rozdělují podle původce na virové, bakteriální, plísňové nebo parazitární. Může jít o trichomoniázu, vulvovaginální kandidózu, bakteriální vaginózu, atrofickou vaginitidu, herpes genitalis a poševní lactobacilózu (Mašata, 2004).

### **2.7.1. VULVOVAGINÁLNÍ KANDIDÓZA**

Výskyt vulvovaginálních kandidóz je velmi častý a má u některých pacientek tendenci k recidivám. Předpokládá se, že až 75% žen fertilního věku prodělá v životě alespoň jednu ataku vulvovaginální kandidózy, 40 až 50% onemocní kvasinkovou infekcí dvakrát za život. Kandidy jsou při kultivačních vyšetřeních klinického materiálu nalézány přibližně ve 20% i u asymptomatických žen. Malé procento žen (3-5%) trpí rekurentní kandidovou vaginitidou, která se opakuje čtyřikrát až šestkrát ročně (Mašata, 2004).

Nejčastějšími projevy jsou svědění až pálení, zarudnutí vulvy, bělavý povlak vagíny, hustý, bílý až nažloutlý nezapáchající výtok někdy s příměsí hmot tvarohovité konzistence, bolestivost pochvy.

Vznikem vulvovaginálních kandidóz jsou ohroženy ženy užívající antibiotika, orální antikoncepci, těhotné, diabetičky, ženy léčené kortikosteroidní terapií, imunosupresí, ženy nosící těsně přiléhající syntetické spodní prádlo. Mladé dívky v předmenstruačním období nebo ženy v menopauze vulvovaginální kandidózou trpí velmi zřídka. Existuje také skupina žen, která se léčí na rekurentní kandidózu několikrát ročně, aniž by se u nich předem vyskytly nějaké rizikové faktory. Možnou příčinou vzniku rekurentní kandidózy může být i vrozená nebo získaná lokální dysfunkce normální ochranné imunitní odpovědi organismu na antigen (Mašata, 2004).

Při kvasinkové infekci v 85-90% případů je v pochvě zjištěna přítomnost kmenů *C. albicans*. Další procentuální zastoupení připadá na *C. glabrata* a *C. tropicalis*. Tzv. non-*albicans* druhy kandid vyvolávají většinou poševní infekce rezistentní na léčbu flukonazolem. Kvasinková forma se podílí na šíření a přenosu kandid, zapříčiňuje asymptomatické osídlení pochvy. Symptomatické onemocnění je způsobeno vláknitými formami kvasinky. *C. albicans* lépe adhezuje k povrchu poševní sliznice než tzv. non-*albicans* druhy, tím se i vysvětluje častější nález *C. albicans* u vulvovaginálních infekcí. Na virulenci kandid se podílí i jejich proteolytické enzymy, zvláště aspártátové proteázy, fosfolipáza, možná i toxiny (gliotoxin) (Mašata, 2004).

Akutní epizody se nejčastěji vyskytují v luteální fázi menstruačního cyklu a během těhotenství, tedy ve fázích zvýšené koncentrace estrogenu a progesteronu. Ovšem doposud není znám přesný vliv pohlavních hormonů na rozvoj kandidózních infekcí, každopádně podporují morfologickou konverzi *C. albicans* z blastické do vláknité formy. Je možné, že klesající koncentrace estrogenu ovlivňuje vznik vaginálních kandidóz, koncentrace progesteronu významný vliv na vznik vaginálních mykóz zřejmě nemá (Field, 2000).

Vaginální infekce nejčastěji vznikají několik dnů před nebo po ovulaci. Zdá se, že koncentrace estrogenu je důležitým rizikovým faktorem pro vznik vaginální mykózy. Jedním z možných důsledků je snížená schopnost vaginálních epitelálních buněk inhibovat růst kolonií *C. albicans* (Field, 2000).

### **Predispoziční faktory:**

**Těhotenství:** Během celé gravidity je poševní sliznice vnímavější k osídlení kandidami. Nejčastěji se infekce vyskytují v třetím trimestru těhotenství. Vyšší hladina pohlavních hormonů způsobuje zvýšené koncentrace glykogenu v pochvě. Ten je důležitý pro růst a množení kandid. Estrogeny zvyšují vnímavost poševní sliznice k adhezenci kvasinek. U kandid byl nalezen cytosolový receptor pro vazbu pohlavních hormonů. Hormony také urychlují tvorbu mycelií. Úspěšnost léčby kvasinkových infekcí v těhotenství je velmi nízká.

**Hormonální kontracepce:** U perorální hormonální antikoncepce s vyššími dávkami estrogenů je obdobný mechanismus působení na růst kandid jako v těhotenství.

**Diabetes mellitus:** U některých žen s rekurentní vulvovaginální kandidózou byla prokázána souvislost mezi přejídáním se sladkostmi a exacerbací infekce.

**Léčba antibiotiky:** Antibiotika eliminují přirozené endogenní vaginální osídlení, které spolu s ostatními faktory zabraňuje vzniku kandidové infekce.

**Přílnavé spodní prádlo:** Prádlo zvyšuje teplotu a vlhkost peritoneální oblasti. Také není vhodné používat výplachy, parfémované toaletní pomůcky, časté plavání v chlorované vodě a dlouhodobé nošení vlhkých plavek (Mašata, 2004).

## **2.8. Léčba mykotických infekcí**

Antimykotika se obvykle rozdělují na:

- a) **polyenová antibiotika:** amfotericin B, nystatin, natamycin
- b) **antimetabolity:** flucytosin
- c) **azolové (triazolové, imidazolové) deriváty:** mikonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol atd.
- d) **allylaminové deriváty:** terbinafin, naftifin
- e) **ostatní:** griseofulvin, ciklopiroxolamin

Z klinického hlediska se mohou rozdělovat na antimykotika celková a místní.

## 2.8.1. POLYENOVÁ ANTIMYKOTIKA

### Amfotericin B

Amfotericin A a B jsou antifungální antimykotika izolovaná z půdní bakterie *Streptomyces nodosus*. Amfotericin A se v terapii nevyužívá.

Amfotericin B je amfoterní polyenový makrolid se systémovým antimykotickým účinkem, nerozpustný ve vodě. Je dosud nejúčinnějším antimykotikem s nejširším spektrem účinku a nejmenším výskytem rezistencí. Jeho nevýhodou je toxicita a častý výskyt nežádoucích účinků. Mikrokrytalické přípravky lze aplikovat místně. Pro celkovou aplikaci intravenózních injekcí se používá koloidní léčivo.

Amfotericin B inhibuje *in vitro* *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* a další mikroorganismy způsobující mykotická onemocnění. Není účinný proti bakteriím.

Polyenová antibiotika se pevně vážou na ergosterol v buněčné membráně hub. Tato membrána je změněna a únik makromolekul a iontů z buňky vede k jejímu irreverzibilnímu poškození. Rezistence vůči amfotericinu B může být důsledkem snížení množství ergosterolu v membráně nebo modifikace jeho struktury tak, že se s ním hůře spojuje.

Amfotericin B se špatně absorbuje z gastrointestinálního traktu. Perorálně podaný amfotericin působí jen na houby v lumen zažívacího ústrojí, takto podaný tedy nemůže sloužit k celkové léčbě. Více než 90 % amfotericinu B je vázáno na bílkoviny krevní plazmy, jeho distribuční objem je obrovský. Intravenózně se vylučuje močí velmi pomalu, v průběhu několika dnů. Amfotericin B se rozsáhle distribuuje do tkání. Nejvyšší koncentrace dosahuje v játrech a ve slezině.

Při léčbě celkových infekcí patogenními houbami se amfotericin B podává v pomalé intravenózní infúzi po dobu 4 – 6 hodin. Po úvodní dávce se nastavuje dávkování tak, aby výsledná koncentrace dosahovala 0,7 až 1,5 mg/kg/den. Tato dávka je pak obvykle podávána po dobu 6-12 týdnů nebo i déle. Po počáteční odpovědi na léčbu jsou tyto dávky podávány pouze dvakrát až třikrát týdně.

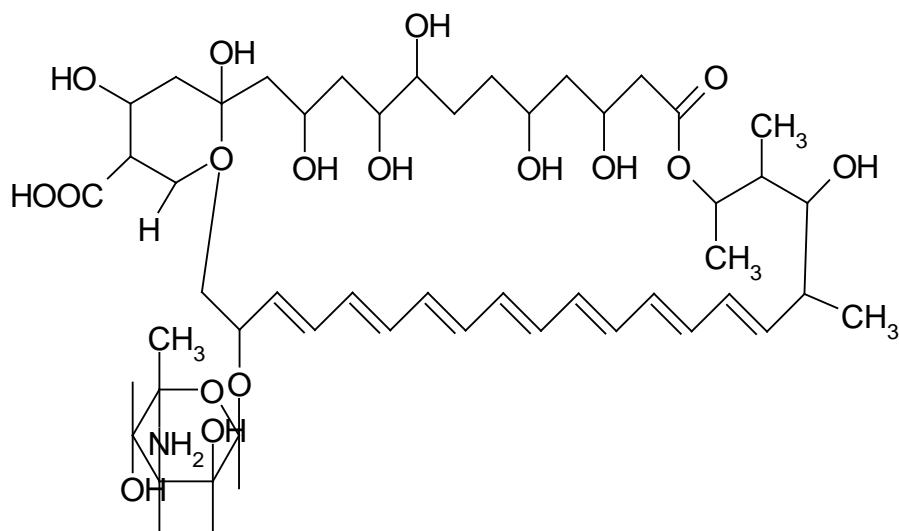
Při meningitidě vyvolané amébou *Naegleria* může být amfotericin B podáván intrathékálně, třikrát týdně, po dobu 10 týdnů, ale i déle. U meningitidy vyvolané druhy *Candida* a *Cryptococcus* a u celkové kandidémie se, vedle triazolových antimykotik, používá kombinace amfotericinu B



s flucytosinem.. Tato kombinace zpomaluje vznik možné rezistence vůči flucytosinu a umožňuje nižší dávkování amfotericinu B.

Intravenózní injekce amfotericinu B nejčastěji vyvolává akutní nežádoucí účinky, jako je mrazení, nauzea, zvracení, horečka, rigor, třesavka a bolest hlavy, svalů i kloubů. Intenzita akutních nežádoucích účinků může být zmírněna spolupodáváním kyseliny acetylsalicylové, fenothiazinů, antiastmatik či kortikoidů. Chronické nežádoucí účinky představují především projevy nefrotoxicity s následnou elektrolytickou nerovnováhou.

Nový polyenový preparát, AmBisome, je liposomální přípravek amfotericinu B. Při zachování účinného antimykotického spektra je u něj minimální výskyt nežádoucích projevů.



Obr. 1 Amfotericin B

## 2.8.2. ANTIMETABOLITY

### Flucytosin (5-fluorcytosin, 5-FC)

Flucytosin je fluorovaná pyrimidinová báze, jediný zástupce ze skupiny antimetabolitů. V buňkách mikromycet je deaminován na vlastní účinnou látku, 5-fluoruracil, který je inkorporován do RNA s následnou inhibicí syntézy nukleových kyselin.

Antimikrobní spektrum flucytosinu zahrnuje především druhy *Candida*, *Cryptococcus* a také některé kmeny druhu *Aspergillus*.

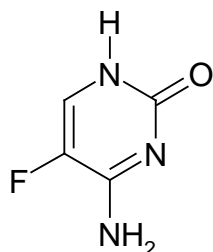
V terapeutických dávkách působí fungistaticky, v nižších blokuje adhezivní schopnost kandid na sliznice.

Flucytosin je hydrofilní molekula, jen asi z 20% je vázán na plazmatické bílkoviny. Proniká do všech tkání a tělesných tekutin, včetně likvoru a předpokládá se i jeho průnik do mateřského mléka. Vylučuje se močí, kde jsou 100krát vyšší koncentrace než v plazmě. Při selhání ledvin se může flucytosin kumulovat až k dosažení toxických hladin.

Mezi jeho nejvýznamnější nežádoucí účinky se řadí granulocytopenie, vypadávání vlasů, přechodné zvýšení jaterních testů a abnormality v činnosti jater. Příležitostně se mohou vyskytovat problémy v oblasti gastrointestinálního traktu (nauzea, zvracení) a kožní projevy.

V klinické praxi je dnes flucytosin používán výhradně v kombinaci (s amfotericinem B nebo s triazolovými antimykotiky) k léčbě orgánové kandidózy, kryptokokózy, blastomykózy.

Závažné lékové interakce doposud nejsou známy, toxicitu flucytosinu ovšem zvyšují všechny léky, které omezují jeho renální vylučování. Klinicky významná je synergní interakce s amfotericinem B, synergismus byl prokázán i u kombinace s azolovými antimykotiky.



Obr. 2 5-fluorcytosin

### 2.8.3. AZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA

Antifungální azoly jsou syntetické látky, které zahrnují starší imidazoly mikonazol a ketokonazol, novější triazoly flukonazol, itrakonazol, vorikonazol a posakonazol. Mechanismus fungistatického účinku je u azolových antimykotik společný a spočívá v blokádě syntézy fungálních sterolů, zejména ergosterolu v membránách hub.

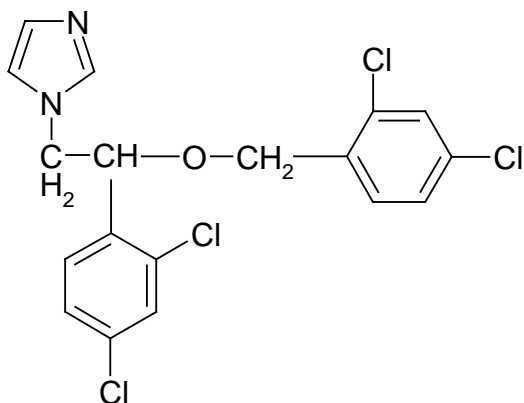
Antimikrobní spektrum zahrnuje rod *Candida*, *Blastomyces*, dále *C. immitis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, dermatofyty (rody *Microsporum*, *Trichophyton* a *Epidermophyton*). U kryptokokových

infekci je účinek nestabilní, u aspergilózy je účinný vorikonazol, posakonazol a částečně itrakonazol, u zygomykózy jen posakonazol proti některým druhům.

Významným klinickým problémem se stává vzrůstající rezistence k azolovým antimykotikům, zvláště k flukonazolu.

### **Mikonazol**

Mikonazol je nejstarší azolové antimykotikum s fungistatickým účinkem. Jeho významnými indikacemi byly především systémové kandidózy, kryptokokóza, dermatomykózy s těžším průběhem, blastomykózy, histoplazmózy, nokardióza a další. Kvůli častým a významným nežádoucím účinkům (zvracení, hyperlipidémie, tromboflebitida, alergické projevy až anafylaktický šok) se dnes mikonazol v léčbě nepoužívá .



Obr. 3 Mikonazol

### **Ketokonazol**

Ketokonazol je širokospektré syntetické lipofilní imidazolové antimykotikum, které je stejně jako mikonazol nahrazováno novějšími azoly. Byl prvním léčivem této skupiny, které mohlo být podáváno per os a zároveň bylo účinné i u některých celkových mykóz.

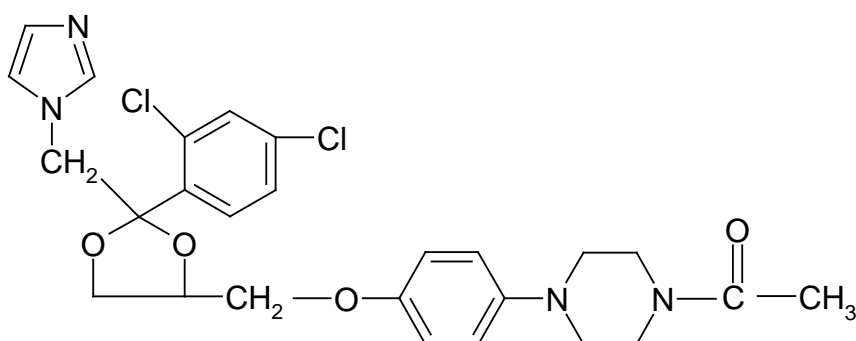
Významně se akumuluje v kůži, kde depot může přetrvat až 5 dnů po vysazení léčby.

Indikací ketokonazolu jsou infekce kůže, nehtů a vlasů způsobené dermatofyty nebo kvasinkami (dermatofytóza, onychomykóza, kandidová perionyxitis, pityriasis versicolor, chronická mukokutánní kandidóza), dále kvasinkové infekce trávicího traktu.

Denní aplikace potlačuje kandidové infekce v ústech nebo v pochvě během 1-2 týdnů, dermatofytózy během 3-8 týdnů.

Nežádoucí účinky ketokonazolu se projevují jako nauzea, zvracení, kožní vyrážky, velmi vzácně se může vyskytnout progredující hepatitida. Ketokonazol ve vysokých koncentracích blokuje syntézu steroidů a androgenů v nadledvinkách a může vyvolat gynekomastii.

Současné podávání antacid, cimetidinu nebo rifampicinu snižuje jeho perorální absorpci.



Obr. 4 Ketokonazol

## Flukonazol

Flukonazol je systémové triazolové antimykotikum pro perorální i parenterální podání. Od ostatních antifungálních azolů se liší svou farmakokinetikou. Má hydrofilní molekulu (je lépe rozpustnější ve vodě a lépe se absorbuje ze zažívacího traktu než ketokonazol), má nejvyšší terapeutický index, nízký výskyt nežádoucích účinků a lékových interakcí

Po perorálním podání se flukonazol dobře a rychle vstřebává, jeho koncentrace v plazmě jsou téměř stejně vysoké po perorální i intravenózní aplikaci. Vazba na plazmatické bílkoviny je velmi nízká, rozsáhle se distribuuje do všech tkání i tělesných tekutin. Dlouhodobý depot vytváří zejména v kůži a nehtech. Vylučuje se převážně močí. Biologický poločas flukonazolu je přibližně 30 hodin a výrazně se prodlužuje u pacientů s insuficiencí ledvin.

Antimikrobní spektrum flukonazolu zahrnuje rod *Candida* (méně účinný je proti tzv. non-*albicans* kmenům), *Cryptococcus*, dermatofyty, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* a další. Primárně

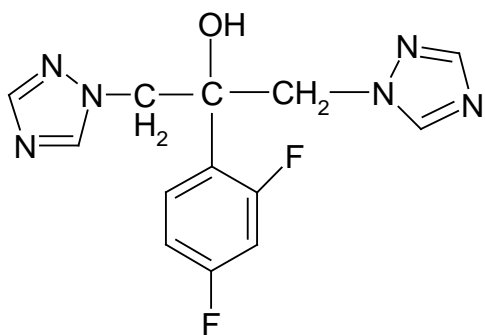
rezistentní je *C. krusei*. *Candida glabrata* se stává dalším kmenem se vzrůstající incidencí získané rezistence. Flukonazol je neúčinný u aspergilózy a zygomykózy.

Nejdůležitější klinické indikace flukonazolu jsou kandidózy (orgánové, kandidémie, slizniční orofaryngeální, chronická orální atrofická kandidóza, kandidóza genitálu), kryptokokózy (flukonazol je lékem volby v udržovací fázi léčby kryptokokové meningitidy), dermatomykózy (tinea pedis, tinea versicolor), systémové endemické mykózy (kokcidiomykózy, sporotrichózy, histoplazmóza).

Nežádoucí účinky flukonazolu zahrnují zvracení, průjem, kožní exantém, bolesti hlavy. Vzácně může dojít při léčbě flukonazolem k závažnému poškození jaterních buněk.

Flukonazol může v séru zvyšovat koncentrace perorálních antidiabetik (zejména derivátů sulfonylmočoviny), midazolamu, warfarinu, antikoagulancií, cyklosporinu. Při současném podávání rifampicinu se snižuje účinek flukonazolu. Flukonazol vykazuje synergický účinek s flucytosinem a mikonazolem, antagonistický účinek s amfotericinem B.

Dávkování je závislé na formě a rozsahu infekce, je stejné u perorální i parenterální formy aplikace. Počáteční dávka (1. den) je u systémových mykóz dvojnásobná, dále se aplikuje jedna denní dávka ještě 2-3 dny po klinickém a laboratorním vymizení nálezu. Předčasné ukončení léčby vede k relapsu. V primární i sekundární profylaxi je flukonazol lékem volby.

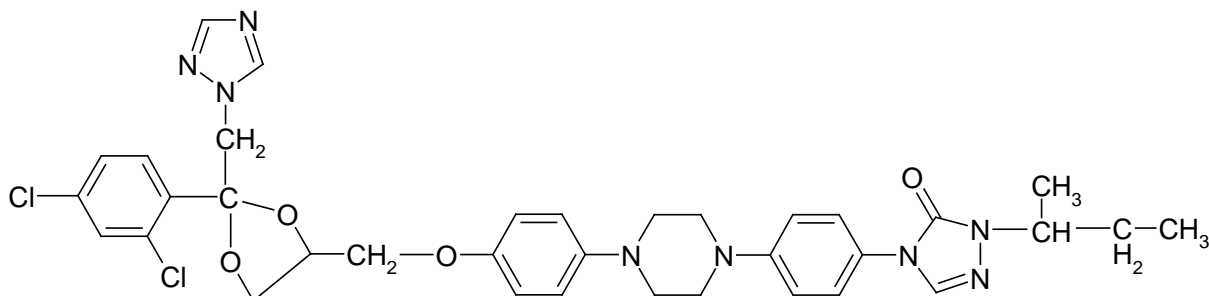


Obr. 5 Flukonazol

### Itrakonazol

Itrakonazol je systémové triazolové antimykotikum pro perorální i parenterální podání. Je účinný proti aspergilům, avšak v této indikaci je léčivem až druhé volby po amfotericinu B a vorikonazolu.

Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou nauzea, zvracení, průjemy, bolesti břicha, závratě, běžné jsou lékové interakce



Obr. 6 Itrakonazol

### 2.8.3.1 Lokální azolová antimykotika

Lokální azolová antimykotika jsou syntetické látky, které mají podobný mechanismus účinku, také farmakodynamické i farmakokinetické parametry, obdobné klinické indikace. Jde o důležitá dermatologika, resp. gynekologika.

#### **Ekonazol**

Ekonazol, podobně jako ostatní azolová antimykotika, blokuje syntézu ergosterolu vazbou na cytochrom P-450. Působí fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky, plísně. I když je systémová absorpce ekonazolu při lokální aplikaci na zdravou pokožku velmi nízká, ve stratum corneum se vytvářejí koncentrace, které přesahují minimální inhibiční koncentrace pro dermatofyty. Nejdůležitějšími indikacemi ekonazolu jsou dermatomykózy vyvolané dermatofyty, kvasinkami, fakultativně patogenními houbami a plísněmi.

#### **Klotrimazol**

Klotrimazol působí fungistaticky až fungicidně na proliferující houby, kvasinky, plísně. Indikacemi klotrimazolu jsou dermatofytózy, kandidózy, paronychie, vulvitidy.

## **Fentikonazol**

Fentikonazol je obdobou předchozích antimykotik. Je indikován k léčbě lokálních dermatomykóz, při smíšených mykotických a bakteriálních kožních infekcích.

## **Tiokonazol**

Tiokonazol je výlučně určen k léčbě kandidových vulvovaginitid.

### **2.8.4. ALYLAMINOVÁ ANTIMYKOTIKA**

#### **Terbinafin**

Terbinafin je analog naftifinu. Na rozdíl od azolových antimykotik nezasahuje do procesů závislých na cytochromu P-450. Jeho fungicidní účinek je založen na inhibici skvalenepoxidázy. Dochází k hromadění skvalenu, k deficitu ergosterolu a následkem toho k porušení buněčné membrány hub.

Spektrum aktivity zahrnuje dermatofyty, už méně je účinný na kvasinky (*Candida*), plísně (*Aspergillus*), dimorfní houby a parazity (*Trypanosoma cruzi*). Terbinafin je účinnější na vláknité formy hub, které jsou vůči inhibici syntézy buněčné membrány citlivější, než na kvasinky.

Mezi indikace terbinafinu patří zejména onychomykóza a léčba tineí (tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris), kvasinkových infekcí způsobených zástupci rodu *Candida*.

Terbinafin je vysoce lipofilní a keratofilní, postupně se koncentruje v tukové tkáni, v kůži a v jejích adnexech. Vazba na plazmatické bílkoviny dosahuje až 99%. Jeho metabolity jsou vylučovány více močí, částečně stolicí. Opatrnost je třeba u pacientů s hepatální či renální insuficiencí, kdy u nich může dojít ke kumulaci terbinafinu. Z nežádoucích účinků se objevují lehčí dyspeptické potíže, alergický kožní exantém, později je možná i ztráta chuti (nejdříve na slané, poté i na sladké).

Terbinafin vykazuje synergický účinek s ketokonazolem, potencuje účinek azolových antimykotik.

## 2.8.5. OSTATNÍ ANTIMYKOTIKA

### Griseofulvin

Griseofulvin je benzofuranové antibiotikum s antimykotickým účinkem. Je izolován z kmenů *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium patulum* a dalších. Griseofulvin má lipofilní molekulu, je velmi špatně rozpustný ve vodě, ale velmi stabilní i při vyšších teplotách.

Griseofulvin je schopen denaturovat proteinový cytoskelet (mikrotubulární aparát buňky), bez kterého se buňka nemůže dělit. Jde zejména o narušení syntézy buněčné stěny.

Griseofulvin inhibuje jen růst dermatofytů (*Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporon*), není účinný na kandidy, aspergily ani na bakterie.

Absorpce griseofulvinu je obecně dobrá, lepší po tučnějším jídle. Významně se váže na bílkoviny krevní plazmy. Ukládá se v nově vytvořené kůži, v nehtech, ve vlasových folikulech. Vylučuje se převážně stolicí.

### Ciklopiroxolamin

Ciklopiroxolamin je lokální antimykotikum, které působí fungicidně proti patogenům způsobující plísňové infekce nehtů. Jeho použití je vhodné i u dětských pacientů.

## 2.9. Léčba vulvovaginální infekce

K dispozici je celá řada lokálních antimykotik v různých lékových formách. V současnosti jsou nejčastěji používaná azolová antimykotika, jejich účinnost se uvádí mezi 85-90%. V posledních letech je tendence ke zkracování léčebných cyklů a k používání vyššího dávkování. Mnozí gynekologové upřednostňují 1-3 denní léčebný cyklus.

Perorální preparáty se jeví také jako vysoce účinné k léčbě vulvovaginální kandidózy. V České republice je často používaný flukonazol (jednorázová aplikace 150 mg) a itraconazol (jednorázově 400 mg nebo 200 mg po 3 dny).

Léčba rekurentní vulvovaginální infekce je velmi obtížná. Před zahájením terapie je potřeba vyloučit a identifikovat všechny predispoziční faktory (léčba diabetu, vysazení hormonální



antikoncepce, imunosupresivní nebo kortikoidní terapie atd.). U žen trpící rekurentní vulvovaginální kandidózou je nutná dlouhodobá profylaktická aplikace antimykotik, vhodnější je perorální aplikace. Doporučuje se podávat 150-300 mg flukonazolu vždy při zahájení menses po dobu 4-12 měsíců. Při rezistenci k flukonazolu lze použít itrakonazol, alternativou mohou být i lokální azolová antimykotika (Mašata, 2004).

Tab. 2 Antimykotika k léčbě kandidóz dostupná na našem trhu \*

Účinná látka	Firemní název	Léková forma
<b>acidum undecylenicum</b>	Mycoseptin	ung.
	Mycodecidin	liq.
	Devilan	plv. ads.
<b>amfotericin B</b>	Abelcept	inf.
	Amphocil	inf.
	Amphotericin B Squibb	inj. sic.
	Rabipur	inj. sic.
<b>bifonazol</b>	Mycospor	crm., liq.
<b>ciklopiroxolamin</b>	Batrafen	liq., crm., <b>vag. crm.**</b>
	Dafnegin	<b>vag. crm., sup. vag.</b>
<b>chloronitrofenol</b>	Nitrofungin	sol.
<b>ekonazol</b>	Gyno- Pevaryl	<b>sup. vag.</b>
	Gyno- Pevaryl Combipack	<b>sup. vag. + crm.</b>
	Pevaryl	crm. pst., crm., pst., liq.
<b>flukonazol</b>	Diflucan	cps., plv. sus., inf.
	Flukonazol Slovakofarma	cps.
	Mycomax	cps., sir., inf.
	Mycosyst	inf., cps.
<b>flutrimazol</b>	Micetal	crm., gel
<b>itrakonazol</b>	Sporanox	<b>cps., sol.</b>
<b>ketokonazol</b>	Nizoral	crm., tbl. drm. sat.
	Oronazol	tbl.
<b>klotrimazol</b>	Candibene	<b>tbl. vag., spr., crm.</b>
	Canesten	crm., <b>tbl. vag.</b>
	Canifug	crm., liq.
	Clotrimazol AL	crm., <b>tbl. vag., spr.</b>
	Clotrimazol QW	crm., <b>tbl. vag.</b>
	Clotrimazol Polfa	<b>tbl. vag.</b>
	Imacort	crm.
	Imazol	crm. pst., crm.
	Jenamazol	<b>crm. vag.</b>
<b>mikonazol</b>	Mycosolon	ung.
<b>naftifin</b>	Exoderil	crm., sol.
<b>natamycin</b>	Pimafucin	crm., <b>glo. vag.</b>
	Pimafucort	crm., lot., ung.
<b>nystatin</b>	Fungicidin	ung.
	Macmiror complex	<b>ung. vag., sup. vag.</b>
	Nystatin Galoex	<b>sup. vag.</b>

	Polygynax	<b>cps. vag.</b>
<b>oxikonazol</b>	Myfungar	crm.
<b>posakonazol</b>	Noxafil	por. susp.
<b>terbinafin</b>	Lamisil	crm., tbl.
	Onychon	tbl.
<b>vorikonazol</b>	Vfend	tbl.

\* dle AISLP 2002

\*\* tučným písmem jsou zvýrazněné lékové formy určené k vaginální aplikaci

## 2.10. Hormony

Hormony jsou specifické působky, které umožňují přenos signálů mezi buňkami různých částí těla.

Dělíme je do skupin podle několika hledisek.

1. **Vzdálenost**, na jakou mohou působit.

- a) **Autokrinní** hormony působí přímo na buňku, ve které vznikly.
- b) **Parakrinní** hormony působí v bezprostředním okolí buněk, ve kterých vznikly.
- c) **Endokrinní** hormony působí na buňky, které jsou i značně vzdálené od místa jejich vzniku.

2. **Chemické složení, rozpustnost**

- a) **Hormony skupiny I** jsou lipofilní molekuly (výjimkou je trijodthyronin a thyroxin), po sekreci se vážou na transportní proteiny, volný hormon snadno prochází plazmatickou membránou, poté se váže na receptor v cytosolu nebo v jádře cílových buněk.
- b) **Hormony skupiny II** jsou hydrofilní molekuly, jejich receptory jsou umístěné na plazmatické membráně cílové buňky, komunikují pomocí tzv. druhých posílů.

Tab. 3 Obecné znaky skupin hormonů

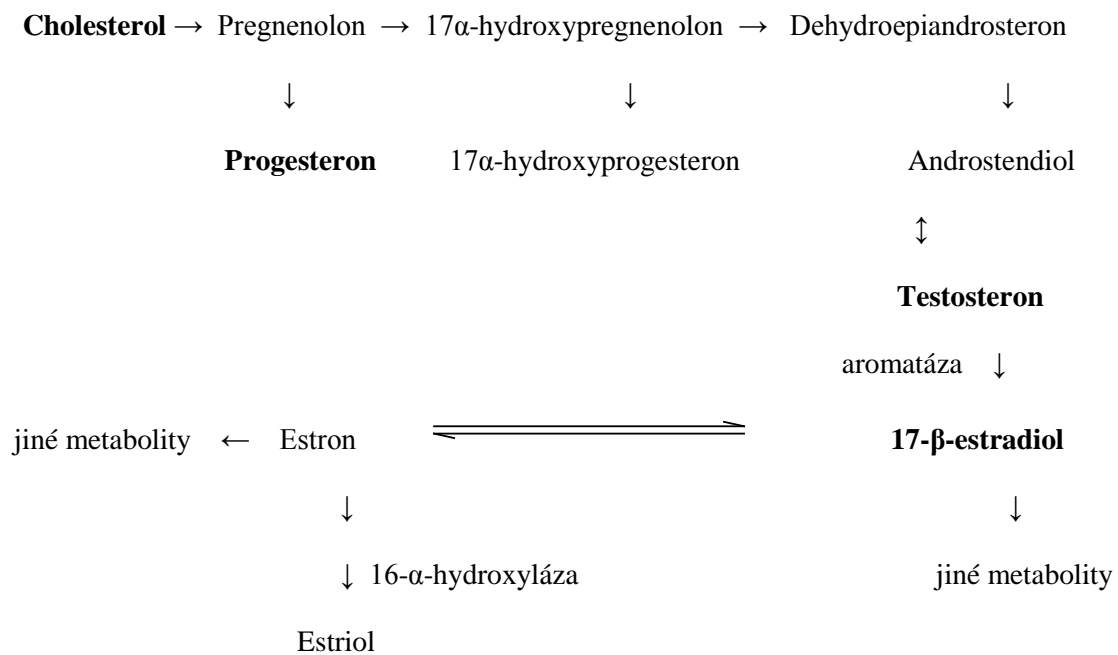
	<b>SKUPINA I</b>	<b>SKUPINA II</b>
<b>ROZPUSTNOST</b>	V tucích	Ve vodě
<b>TRANSPORTNÍ PROTEINY</b>	Má	Zřejmě nemá
<b>RECEPTOR</b>	Intracelulární	Na plasmatické membráně
<b>PLASMATICKÝ POLOČAS</b>	Hodiny až dny	Minuty
<b>ZÁSTUPCI</b>	Steroidní hormony, hormony štítné žlázy	TRH, TSH, oxytocin, vazopresin, inzulín atd.

### 2.10.1. STEROIDNÍ POHLAVNÍ HORMONY

Mezi steroidní pohlavní hormony jsou řazeny estrogeny, gestageny a androgeny. Estrogen a progesteron vznikají ve vaječnicích, varlata jsou místem vzniku testosteronu a malého množství 17- $\beta$ -estradiolu. Také ve vnitřní zóně (zóna reticularis) probíhá syntéza steroidů s androgenním, estrogením i gestagením účinkem.

Tvorba steroidů je regulována kaskádou hypothalamických a adenohipofyzárních hormonů. Významným hormonem je hormon uvolňující gonadotropin, folikuly stimulující hormon a luteinizační hormon.

Steroidní pohlavní hormony jsou syntetizovány v buňkách Graafova folikulu, žlutého tělíska i v intersticiálních buňkách varlat ze stejných prekurzorů. Hlavním prekurzorem endogenního gestagenu, progesteronu, je pregnenolon a vzniká z cholesterolu. Z pregnenolonu, přes meziprodukt 17- $\alpha$ -hydroxypregnenolon, je syntetizován dehydroepiandrosteron. Ten je významný pro další syntézu androgenů. Estradiol vzniká z testosteronu za účasti aromatázy.

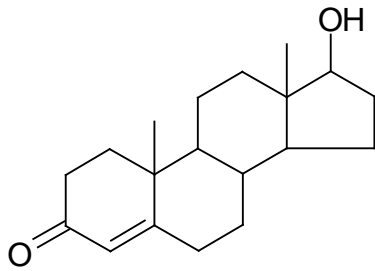


Obr. 7 Biosyntéza pohlavních hormonů

### 2.10.2. TESTOSTERON

Hlavním mužským androgenem je testosteron. Produkci testosteronu si zdraví muži uchovávají od puberty po celý život. Testosteron podporuje vývoj sekundárních pohlavních znaků, zrání reprodukčních orgánů, somatický růst, ovlivňuje typicky mužské chování, podílí se na regulaci spermatogeneze.

Testikulární androgeny se syntetizují v intersticiální tkáni Leydigových buněk. Testosteron se metabolizuje buď na 17-ketosteroidy (tyto metabolity jsou inaktivní nebo méně aktivní než samotný testosteron) nebo z testosteronu vznikne účinnější metabolit, dehydrotestosteron. Testosteron také může být přeměněn na estradiol či androstadiol. Ty se v játrech konjugují na ve vodě rozpustné glukosiduronáty a sulfáty.



Obr. 8 Testosteron

### 2.10.3. 17- $\beta$ -ESTRADIOL A PROGESTERON

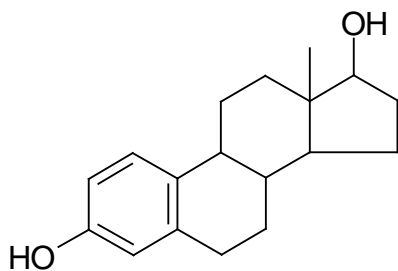
Estrogeny vznikají v ovariu, gestageny jsou produkovány žlutým tělískem. Gestageny ke svému účinku obvykle potřebují předchozí nebo současnou přítomnost estrogenů. Ty zřejmě podporují tvorbu progesteronových receptorů. Estrogeny a gestageny mohou působit synergicky, ale i antagonisticky.

Estrogeny ovlivňují vývoj sekundárních pohlavních znaků u žen, podporují růst mléčné žlázy, zlepšují resorpci vápníku a jeho využití kostní tkání, vyvolávají proliferaci ovaria, mírně snižují koncentraci celkového cholesterolu a současně zvyšují hladiny HDL cholesterolu a snižují koncentraci LDL cholesterolu.

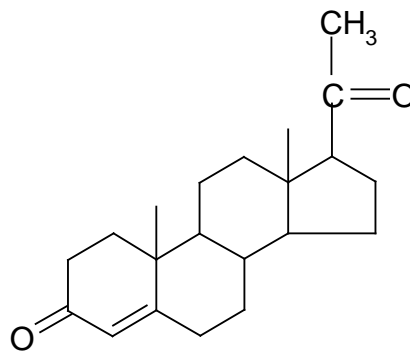
Během menopauzy dochází u žen ke stále se snižující produkci ovariálního estrogenu, syntéza tohoto hormonu je zachována ve velmi malém množství v nadledvinách. Deficit estrogenu se projevuje zvýšenou resorpcí kostní hmoty, osteoporózou a osteopatií.

Progesteron připravuje děložní epitel k implantaci oplozeného vajíčka, snižuje kontraktilitu myometria, převádí endometrium do sekreční fáze cyklu (musí ovšem předcházet působení estrogenů na endometrium).

Významným metabolitem progesteronu je pregnandiol-20-glukosiduronát sodný, estradiol se v játrech konvertuje na estriol.



Obr. 9 17- $\beta$ -estradiol



Obr. 10 Progesteron

## 2.11. Menstruační cyklus

Průměrná délka menstruačního cyklu je 28 dnů. Cyklus je rozdělen do tří fází, první je fáze folikulární, další fáze je luteální a následuje menstruace.

Ve folikulární fázi, pod vlivem folikuly stimulujícího hormonu, se folikuly začínají zvětšovat. Hladiny estradiolu jsou v 1. týdnu cyklu velmi nízké, poté se postupně začínají zvyšovat. Maximální koncentrace estradiolu je 24 hodin před vrcholem sekrece luteálního hormonu. Tento krátkodobý vzestup estradiolu vyvolá zduření a rupturu zralého Graafova folikulu a nastává ovulace. Hladiny progesteronu jsou v této fázi velmi nízké.

Dva dny po ovulaci, během luteální fáze, vzniká žluté tělísko, které produkuje vysoké množství progesteronu. Maximum koncentrace estradiolu je v polovině luteální fáze, poté klesá k velmi nízkým hodnotám.

Pokud nedošlo k oplodnění vajíčka, nastupuje tzv. fáze regresní, kdy se snižuje produkce progesteronu, endometrium se ztenčuje a snižuje se jeho prokrvení. Dochází k menstruačnímu krvácení.

Pokud k oplodnění došlo, funkci luteálního hormonu přebírá placentární choriogonadotropin, který stimuluje syntézu progesteronu ve žlutém tělísku až do té doby, než velké množství progesteronu produkuje placenta (Katzung, 1994).

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Materiál

#### **Použité kmeny *Candida albicans***

*Candida albicans* ATCC 90028

*Candida albicans* RVVK 8797/03

*Candida albicans* VVK 25188/97

*Candida albicans* SC 13-81

Auxotrofní kmeny:

*Candida albicans* BWP 17

*Candida albicans* BWOZ

#### **Pomůcky**

Erlenmayerovy baňky

Skleněné i plastové zkumavky

Mikrotitrační destičky

Automatické pipety

Speciální vaničky pro rozplnění látek

Analytické váhy

Laminární box

Mikrobiologický inkubátor

Třepačka

Spektrofotometr

#### **Roztoky**

DMSO

Testovací médium RPMI + MOPS

Hydroxid sodný 10%

Roztoky hormonů (testosteron, estradiol, progesteron)

Roztoky antimykotik (flukonazol, amfotericin B, fluorcytosin)

Uridin

Destilovaná voda



### 3.2. Schéma pokusu

Kmeny *Candida albicans* byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou.

1. Fáze: Příprava pokusu: a) příprava testovacích kmenů

b) příprava média

c) příprava testovacích látek

2. Fáze: Vlastní pokus:

a) příprava pracovního média

b) příprava suspenzí

c) naředění testovacích látek dvojkovým ředěním

d) rozplnění látek do mikrotitračních destiček

e) inokulace destiček testovanými kmeny

f) inkubace v termostatu při 35°C

3. Fáze: Odečítání výsledků vizuálně i spektrofotometricky

a) odečítání MIC po 24 hod a 48 hod vizuálně

b) odečítání v čase 0 hod, 24 hod a 48 hod spektrofotometricky

4. Fáze: Vyhodnocení, zpracování výsledků

### 3.3. Příprava testovacích kmenů a inokula

Do pokusů bylo zahrnuto 6 kmenů *Candida albicans*. Použité byly kmeny ATCC 90028, RVVK 8797/03, VVK 25188/97 a autotrofní kmeny SC 13-81, BWP 17, BWOZ. Všechny kmeny byly izolovány z klinického materiálu pacientek trpících kandidovou vulvovaginitidou.

Kmeny byly udržovány na SGA v lednici při teplotě 4°C. Před pokusem byly pasážovány na SGA a inkubovány 24 hod ve tmě a při teplotě 37°C. Velikost inokula byla ověřena pomocí Burkerovy komůrky. Výsledná velikost inokula v jamce testovací destičky byla 10<sup>4</sup> cfu/ml.

### 3.4. Složení a příprava médií

#### Sabouraudův glukózový agar (SGA)

Složení:	glukóza ( Lachema)	20,0 g
	Neopepton ( Difco)	10,0 g
	Destilovaná voda	1000,0 ml

Příprava: Jednotlivé složky byly smíchány, rozvařeny a sterilizovány v autoklávu 15 min při 121°C, pH půdy nebylo upraveno ( dosahuje  $5,6 \pm 0,2$ ).

#### Tkáňové médium RPMI 1640 s glutaminem

Složení:	RPMI 1640 (Sevapharma)	200,0 ml
	MOPS (Sigma)	43,0 g
	Destilovaná voda	1000,0 ml

Příprava: Kyselina morfolinpropansulfonová ( 0,165 M) byla rozpuštěna v destilované vodě a sterilizována v autoklávu. Těsně před pokusem bylo asepticky přidáno RPMI 1640 v poměru 1: 4 k celkovému objemu a pomocí 10M NaOH bylo upraveno pH roztoku na hodnotu  $7,0 \pm 0,2$ .

U auxotrofních kmenů bylo na každých 100 ml média přidáno 50 ml uridinu.

### 3.5. Příprava testovaných látek

#### Příprava roztoků s antimykotiky

**Flukonazol** – počáteční koncentrace flukonazolu v prvním sloupci byla 64µg/ml. Protože do jedné jamky byl pipetován jak roztok antimykotika, tak roztok hormonů ( došlo k naředění v poměru 1:1), bylo potřeba získat první koncentraci 128µg/ml. Na tři destičky odpovídala spotřeba asi 2 ml, z toho vyplývá, že pro 6 destiček (1 destička pro jeden kmen) bylo zapotřebí 4 ml. Jednoduchou trojčlenkou bylo vypočítáno množství média, které je nutné k rozpuštění navážky.

4x128 µg/l.....100µg  
Navážka.....x µl MOPS + RPMI

**Flucytosin** – postupujeme obdobně jako u flukonazolu, výjimkou je počáteční koncentrace flucytosinu. V prvním sloupci byla koncentrace 128 $\mu$ g/ml.

**Amfotericin B** – počáteční koncentrace amfotericinu B byla 8 $\mu$ g/ml. Bylo potřeba získat koncentraci 16 $\mu$ g/ml. Spotřeba pro 6 destiček byla asi 2 ml.

2 $\times$ 16  $\mu$ g/ml.....20  $\mu$ l

Navážka..... $\times$   $\mu$ l DMSO

### **Příprava roztoků s hormony**

#### **Testosteron**

První koncentrace hormonu byla 2 x 10<sup>-3</sup> mol/L. Navážku testosteronu bylo potřeba rozpustit v ethanolu, množství alkoholu bylo vypočítáno ze vzorce :

$$V = m / c \times M$$

V.....objem alkoholu (ml)

m.....navážka hormonu (mg)

c.....molární koncentrace (mol/L)

M.....molekulová hmotnost

V našem případě byla navážka 10,1 mg, molekulová hmotnost testosteronu je 288,43 a výchozí koncentrace 2 x 10<sup>-3</sup> mol/L. Objem alkoholu potřebný k rozpuštění 10,1 mg testosteronu byl 17,5 ml.

Naše navážka.....10,1 mg

M.....288,43

c.....2 x 10<sup>-3</sup> M

V.....17,5 ml

Vznikl zásobní roztok A.

#### *Zásobní roztoky*

Zásobní roztok B byl připraven z 0,1 ml roztoku A a z 9,9 ml alkoholu. Roztok B měl koncentraci 2 x 10<sup>-5</sup> mol/L. Roztok C byl připraven obdobně, z 0,1 ml roztoku B a 9,9 ml alkoholu. Tento roztok měl koncentraci 2 x 10<sup>-7</sup> mol/L. Stejně bylo pokračováno až k ředění 2 x 10<sup>-9</sup> mol/L.

#### *Pracovní roztoky*

Pracovní roztok P<sub>1</sub> byl získán smísením 0,1 ml zásobního roztoku B (2 x 10<sup>-5</sup> mol/L) s 9,9 ml média (MOPS + RPMI). Roztok P<sub>1</sub> měl koncentraci 2 x 10<sup>-6</sup> mol/L. Pracovní roztok P<sub>2</sub> byl připraven z 0,1 ml roztoku C (2 x 10<sup>-7</sup> mol/L) a 9,9 ml média. Obdobně bylo pokračováno až k pracovnímu roztoku P<sub>10</sub> s koncentrací 2 x 10<sup>-10</sup> mol/L.

#### **Progesteron**

Progesteron bylo potřeba rozpustit stejně jako testosteron v alkoholu, změnou byl jiný objem alkoholu v závislosti na použité navážce.

Naše navážka.....9,8 mg  
M.....314,47  
c..... $2 \times 10^{-3}$  M  
V.....15,58 ml

Další postup byl totožný s postupem uvedeným u testosteronu.

### **Estradiol**

Postup viz. Testosteron.

Naše navážka.....9,8 mg  
M.....272,39  
c..... $2 \times 10^{-3}$  M  
V.....17,99 ml

U všech hormonů (estradiol, progesteron, testosteron) bylo užito ředění  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  mol/l.

## **3.6. Vlastní pokus**

Na začátku bylo připraveno pracovní médium RPMI 1640 a suspenze testovaných kmenů (viz výše).

Dále se postup lišil podle rozpustnosti antimykotika. Jiný postup byl u látek hydrofilních (flukonazol a flucytosin), jiný u látky lipofilní (amfotericin B).

Hydrofilní látky: Prvním krokem bylo naředění testovaných hormonů. Z roztoku s pracovním označením A (nejkoncentrovanější roztok) bylo přeneseno 80 $\mu$ l do 7,92 ml tláňového média RPMI, vznikl roztok B – stokrát naředěný. Z roztoku B bylo odebráno 800  $\mu$ l a přidáno k 7,2 ml RPMI, vznikl roztok C a takto bylo pokračováno až k roztoku F.

7,92 ml RPMI	7,2 ml RPMI	7,2 ml RPMI
80 $\mu$ l rA	800 $\mu$ l rB	800 $\mu$ l rC
Roztok A → Roztok B	→ Roztok C	→ Roztok D.....→ Roztok F

Dále byla připravena řada 10-ti Erlenmayerových baněk. Do baněk číslo 2 až 10 bylo napipetováno 4 ml média. V 1. baňce bylo smícháno 7,8 ml média a 200 $\mu$ l antimykotika. Poč byly

z 1. baňky přetáhnuty 4 ml do baňky druhé, 4 ml z baňky číslo 2 byly přetáhnuty do baňky třetí a tento postup pokračoval až k desáté baňce.

7,8 ml RPMI

200 µl

4 ml

4 ml

4 ml

baňka 1.

→

baňka 2.

→

baňka 3.

→

.....baňka 10.

Poté následovala příprava kontroly ethanolu. Do 1. zkumavky bylo napipetováno 1,990 ml RPMI a 10 µl C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH., ze zkumavky bylo přetáhnuto 100 µl roztoku do zkumavky číslo 2. Ve druhé zkumavce již bylo nachystáno 900 µl média. Takto bylo pokračováno v přenášení 100 µl roztoku až k páté zkumavce.

1,990 ml RPMI

900 µl média

10 µl alkoholu

100 µl

100 µl

zkumavka 1.

→

zkumavka 2.

→

..... zkumavka 5.

Lipofilní látka: Byla připravena řada 10-ti zkumavek. V první zkumavce byla navážka amfotericinu B a vypočtené množství DMSO, v ostatních zkumavkách bylo 0,5 ml DMSO. Ze zkumavky číslo 1 bylo přetáhnuto 0,5 ml do druhé zkumavky a takto bylo pokračováno až k desáté zkumavce. V řadě Erlenmayerových baněk bylo nachystáno v každé baňce 5,97 ml média, k tomu bylo postupně přidáváno 30 µl roztoku z odpovídajících zkumavek.

Kontrola DMSO a RPMI byla připravena z 30 µl DMSO a 5,97 ml RPMI.

Další postup byl stejný jako u látky hydrofilní.

Následovalo rozplnění látek do mikrotitrační polystyrenové destičky. Do sloupců byly pipetovány hormony, do řad antimykotika. Do posledního sloupce byla nanášena kontrola ethanolu, ve sloupci předposledním byla kontrola hormonu. V šesté řadě byla pipetována kontrola antimykotika, v řadě sedmé kontrola RPMI. Do každé jamky v pokusu bylo pipetováno 200 µl, u jamek se dvěma látkami bylo vnášeno 100 µl antimykotika a 100 µl hormonů.

Dalším krokem byla inokulace roztoků látek suspenzí houby. Inokuloval se vždy jen jeden kmen na jednu destičku. Podle koncentrace inokula (množství kolonií bylo ověřeno pomocí Burkerovy komůrky) bylo pipetováno 10-12  $\mu$ l suspenze kvasinek.

Tab. 4 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>B</b>	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>C</b>	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>D</b>	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>E</b>	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>F</b>	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>K<sub>A</sub></b>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>	K <sub>A</sub>		
<b>K<sub>M</sub></b>	K <sub>M</sub>	K <sub>M</sub>	K <sub>M</sub>									

K<sub>A</sub> – kontrola antimykotika; K<sub>E</sub> – kontrola ethanolu; K<sub>H</sub> – kontrola hormonu; K<sub>M</sub> – kontrola média

Tab. 5 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad flukonazol + hormon  
Koncentrace flukonazolu ( $\mu$ g/ml) / Ředění hormonů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	K <sub>H</sub>	K <sub>E</sub>
<b>B</b>	64 10 <sup>-6</sup>	32 10 <sup>-6</sup>	16 10 <sup>-6</sup>	8 10 <sup>-6</sup>	4 10 <sup>-6</sup>	2 10 <sup>-6</sup>	1 10 <sup>-6</sup>	0,5 10 <sup>-6</sup>	0,25 10 <sup>-6</sup>	0,13 10 <sup>-6</sup>	0 10 <sup>-6</sup>	0 0
<b>C</b>	64 10 <sup>-7</sup>	32 10 <sup>-7</sup>	16 10 <sup>-7</sup>	8 10 <sup>-7</sup>	4 10 <sup>-7</sup>	2 10 <sup>-7</sup>	1 10 <sup>-7</sup>	0,5 10 <sup>-7</sup>	0,25 10 <sup>-7</sup>	0,13 10 <sup>-7</sup>	0 10 <sup>-7</sup>	0 0
<b>D</b>	64 10 <sup>-8</sup>	32 10 <sup>-8</sup>	16 10 <sup>-8</sup>	8 10 <sup>-8</sup>	4 10 <sup>-8</sup>	2 10 <sup>-8</sup>	1 10 <sup>-8</sup>	0,5 10 <sup>-8</sup>	0,25 10 <sup>-8</sup>	0,13 10 <sup>-8</sup>	0 10 <sup>-8</sup>	0 0
<b>E</b>	64 10 <sup>-9</sup>	32 10 <sup>-9</sup>	16 10 <sup>-9</sup>	8 10 <sup>-9</sup>	4 10 <sup>-9</sup>	2 10 <sup>-9</sup>	1 10 <sup>-9</sup>	0,5 10 <sup>-9</sup>	0,25 10 <sup>-9</sup>	0,13 10 <sup>-9</sup>	0 10 <sup>-9</sup>	0 0
<b>F</b>	64 10 <sup>10</sup>	32 10 <sup>10</sup>	16 10 <sup>10</sup>	8 10 <sup>10</sup>	4 10 <sup>10</sup>	2 10 <sup>10</sup>	1 10 <sup>10</sup>	0,5 10 <sup>10</sup>	0,25 10 <sup>10</sup>	0,13 10 <sup>10</sup>	0 10 <sup>10</sup>	0 0
<b>K<sub>A</sub></b>	64 0	32 0	16 0	8 0	4 0	2 0	1 0	0,5 0	0,25 0	0,13 0		
<b>K<sub>M</sub></b>	0 0	0 0	0 0									

K<sub>A</sub> – kontrola antimykotika; K<sub>E</sub> – kontrola ethanolu; K<sub>H</sub> – kontrola hormonu; K<sub>M</sub> – kontrola média

Tab. 6 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad amfotericin B + hormon

Koncentrace amfotericinu B ( $\mu\text{g/ml}$ ) / Ředění hormonů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$K_H$	$K_E$
<b>B</b>	8 $10^{-6}$	4 $110^{-6}$	2 $10^{-6}$	1 $10^{-6}$	0,5 $10^{-6}$	0,25 $10^{-6}$	0,13 $10^{-6}$	0,06 $10^{-6}$	0,03 $10^{-6}$	0,02 $10^{-6}$	0 $10^{-6}$	0 0
<b>C</b>	8 $10^{-7}$	4 $10^{-7}$	2 $10^{-7}$	1 $10^{-7}$	0,5 $10^{-7}$	0,25 $10^{-7}$	0,13 $10^{-7}$	0,06 $10^{-7}$	0,03 $10^{-7}$	0,02 $10^{-7}$	0 $10^{-7}$	0 0
<b>D</b>	8 $10^{-8}$	4 $10^{-8}$	2 $10^{-8}$	1 $10^{-8}$	0,5 $10^{-8}$	0,25 $10^{-8}$	0,13 $10^{-8}$	0,06 $10^{-8}$	0,03 $10^{-8}$	0,02 $10^{-8}$	0 $10^{-8}$	0 0
<b>E</b>	8 $10^{-9}$	4 $10^{-9}$	2 $10^{-9}$	1 $10^{-9}$	0,5 $10^{-9}$	0,25 $10^{-9}$	0,13 $10^{-9}$	0,06 $10^{-9}$	0,03 $10^{-9}$	0,02 $10^{-9}$	0 $10^{-9}$	0 0
<b>F</b>	8 $10^{10}$	4 $10^{10}$	2 $10^{10}$	1 $10^{10}$	0,5 $10^{10}$	0,25 $10^{10}$	0,13 $10^{10}$	0,06 $10^{10}$	0,03 $10^{10}$	0,02 $10^{10}$	0 $10^{10}$	0 0
<b><math>K_A</math></b>	8 0	4 0	2 0	1 0	0,5 0	0,25 0	0,13 0	0,06 0	0,03 0	0,02 0		
<b><math>K_M</math></b>	0 0	0 0	0 0									

$K_A$  – kontrola antimykotika;  $K_E$  – kontrola ethanolu;  $K_H$  – kontrola hormonu;  $K_M$  – kontrola média

Tab. 7 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad flucytosin + hormon

Koncentrace flucytosinu ( $\mu\text{g/ml}$ ) / Ředění hormonů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$K_H$	$K_E$
<b>B</b>	128 $10^{-6}$	64 $10^{-6}$	32 $10^{-6}$	16 $10^{-6}$	8 $10^{-6}$	4 $10^{-6}$	2 $10^{-6}$	1 $10^{-6}$	0,5 $10^{-6}$	0,25 $10^{-6}$	0 $10^{-6}$	0 0
<b>C</b>	128 $10^{-7}$	64 $10^{-7}$	32 $10^{-7}$	16 $10^{-7}$	8 $10^{-7}$	4 $10^{-7}$	2 $10^{-7}$	1 $10^{-7}$	0,5 $10^{-7}$	0,25 $10^{-7}$	0 $10^{-7}$	0 0
<b>D</b>	128 $10^{-8}$	64 $10^{-8}$	32 $10^{-8}$	16 $10^{-8}$	8 $10^{-8}$	4 $10^{-8}$	2 $10^{-8}$	1 $10^{-8}$	0,5 $10^{-8}$	0,25 $10^{-8}$	0 $10^{-8}$	0 0
<b>E</b>	128 $10^{-9}$	64 $10^{-9}$	32 $10^{-9}$	16 $10^{-9}$	8 $10^{-9}$	4 $10^{-9}$	2 $10^{-9}$	1 $10^{-9}$	0,5 $10^{-9}$	0,25 $10^{-9}$	0 $10^{-9}$	0 0
<b>F</b>	128 $10^{-10}$	64 $10^{-10}$	32 $10^{-10}$	16 $10^{-10}$	8 $10^{-10}$	4 $10^{-10}$	2 $10^{-10}$	1 $10^{-10}$	0,5 $10^{-10}$	0,25 $10^{-10}$	0 $10^{-10}$	0 0
<b><math>K_A</math></b>	8 0	4 0	2 0	1 0	0,5 0	0,25 0	0,13 0	0,06 0	0,03 0	0,02 0		
<b><math>K_M</math></b>	0 0	0 0	0 0									

$K_A$  – kontrola antimykotika;  $K_E$  – kontrola ethanolu;  $K_H$  – kontrola hormonu;  $K_M$  – kontrola média

Inokulované mikrotitrační destičky byly uloženy v termostatu při 33°C. Nárůst kmenů byl pravidelně odečítán po 24 hod a 48 hod. vizuálně a spektrofotometricky. Spektrofotometricky přístroj (iEMS Leader MF, Labsystem) určil v každé jamce hodnotu optické density při 540 nm (OD540) v čase 0 hod, 24 hod a 48 hod. Před každým spektrofotometrickým měřením byly destičky intenzivně protřepány na třepačce.

Jako MIC byla považována koncentrace v té jamce, ve které byl nárůst testovaného kmene houby do 20 % nárůstu kontroly.

Výsledky byly zpracovány podle protokolů z vizuálního hodnocení, v nejasných situacích byly hodnoty porovnány s daty ze spektrofotometrických měření. Vždy byla odečtena MIC samotného antimykotika a porovnána s jednotlivými kombinacemi antimykotika s hormony. Jestliže inhibice růstu *C. albicans* nastala směrem k nižším koncentracím antimykotika (tzn. na tabulce směrem doprava), jednalo se o adici. Naopak při inhibici růstu směrem k vyšším hodnotám (tzn. na tabulce vlevo) se projevil antagonismus. Nedošlo-li k žádné změně (na tabulce se MIC samotného antimykotika neposunula vzhledem k MIC kombinace), jednalo se o indiferentní (neutrální) reakci.



## 4. VÝSLEDKY

Tab. 8 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	Flukonazol	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	1	2	1	1	1	1	sAN
RVVK	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	sAN
VVK	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	sAN
SC	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	sAD
BWP	2	1	1	2	2	2	sAD
BWOZ	2	1	1	1	2	2	sAD

48 hod.	Flukonazol	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	1	2	1	1	1	1	sAN
RVVK	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	sAN
VVK	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	sAN
SC	2	0,5	1	1	1	2	AD
BWP	2	2	2	2	2	2	N
BWOZ	2	2	2	2	2	2	N

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK – RVVK 8797/03 , VVK - VVK 25188/97, SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ

Tab. 9 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	Flukonazol	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	1	4	2	1	1	1	AN
<b>RVVK</b>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	sAN
<b>VVK</b>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	sAN
<b>SC</b>	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	sAD
<b>BWP</b>	2	2	2	2	2	2	N
<b>BWOZ</b>	1	1	1	1	1	1	N

48 hod.	Flukonazol	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	2	4	2	2	2	2	sAN
<b>RVVK</b>	1	2	1	1	1	1	sAN
<b>VVK</b>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	sAN
<b>SC</b>	2	0,5	1	2	2	2	AD
<b>BWP</b>	2	*	2	2	2	2	N
<b>BWOZ</b>	2	4	2	2	2	2	sAN

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: **ATCC** – ATCC 90028, **RVVK** – RVVK 8797/03 , **VVK** – VVK 25188/97 , **SC** - SC13-81, **BWP** - BWP17, **BWOZ** - BWOZ

Tab. 10 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	Flukonazol	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	2	4	2	2	2	2	sAN
RVVK	0,5	2	1	1	1	0,5	AN
VVK	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	AN
SC	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
BWP	2	1	2	2	2	2	sAD
BWOZ	1	1	1	1	1	1	N

48 hod.	Flukonazol	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	2	4	2	2	2	2	sAN
RVVK	1	2	1	1	1	1	AN
VVK	0,5	2	1	0,5	0,5	0,5	AN
SC	2	1	1	2	2	2	sAD
BWP	1	2	1	1	1	1	sAD
BWOZ	1	2	1	1	1	1	sAN

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK – RVVK 8797/03, VVK – VVK 25188/97 , SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ

Tab. 11 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC $\mu$ g/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	AmfoB	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC ( $\mu$ g/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
RVVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
VVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
SC	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
BWP	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
BWOZ	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD

48 hod.	AmfoB	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC ( $\mu$ g/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
RVVK	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
VVK	1	0,25	0,5	0,5	0,5	1	sAD
SC	1	0,25	0,5	1	1	1	AD
BWP	1	0,25	0,5	1	1	1	sAD
BWOZ	1	0,25	0,5	1	1	1	AD

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK – RVVK 8797/03, VVK – VVK 25188/97, SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ

Tab. 12 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	AmfoB	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	N
RVVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
VVK	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	N
SC	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
BWP	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
BWOZ	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD

48 hod.	AmfoB	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	N
RVVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
VVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
SC	1	0,5	1	1	1	1	sAD
BWP	1	0,5	1	1	1	1	sAD
BWOZ	1	0,5	1	1	1	1	sAD

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK – RVVK 8797/03, VVK – VVK 25188/97, SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ

Tab. 13 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	AmfoB	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
RVVK	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	sAD
VVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
SC	0,5	0,13	0,25	0,25	0,25	0,25	AD
BWP	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
BWOZ	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD

48 hod.	AmfoB	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
RVVK	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	sAD
VVK	1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
SC	2	0,13	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
BWP	2	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	AD
BWOZ	2	0,25	0,5	0,5	0,5	1	AD

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK –RVVK 8797/03 , VVK – 25188/97, SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ

Tab. 14 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	5 FC	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	8	4	4	4	4	4	sAD
<b>RVVK</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>VVK</b>	32	8	16	32	32	32	AD
<b>SC</b>	16	2	4	8	8	16	AD
<b>BWP</b>	128	4	32	128	128	128	AD
<b>BWOZ</b>	32	16	32	32	32	32	sAD

48 hod.	5 FC	Testosteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>RVVK</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>VVK</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>SC</b>	16	4	8	8	8	16	AD
<b>BWP</b>	*	4	*	*	*	*	*
<b>BWOZ</b>	*	*	*	*	*	*	*

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: **ATCC** – ATCC 90028, **RVVK** – RVVK 8797/03 , **VVK** – VVK 25188/97 , **SC** - SC13-81, **BWP** - BWP17, **BWOZ** - BWOZ

Tab. 15 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	5 FC	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	8	8	8	8	8	8	N
RVVK	*	*	*	*	*	*	*
VVK	*	8	16	*	*	*	*
SC	8	2	4	4	8	8	AD
BWP	*	16	*	*	*	*	*
BWOZ	32	4	8	16	32	32	AD

48 hod.	5 FC	Estradiol (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
ATCC	*	*	*	*	*	*	*
RVVK	*	*	*	*	*	*	*
VVK	*	64	*	*	*	*	*
SC	16	4	8	8	8	16	AD
BWP	*	*	*	*	*	*	*
BWOZ	*	*	*	*	*	*	*

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: ATCC – ATCC 90028, RVVK – RVVK 8797/03, VVK – VVK 25188/97, SC - SC13-81, BWP - BWP17, BWOZ - BWOZ



Tab. 16 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů *Candida albicans*

24 hod.	5 FC	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	4	4	4	4	4	4	N
<b>RVVK</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>VVK</b>	16	8	16	16	16	16	sAD
<b>SC</b>	8	2	4	4	4	8	AD
<b>BWP</b>	*	8	64	*	*	*	*
<b>BWOZ</b>	64	8	16	64	64	64	AD

48 hod.	5 FC	Progesteron (mol/L)					Výsledek interakce
Kmen	MIC (µg/ml)	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
<b>ATCC</b>	32	32	32	32	32	32	N
<b>RVVK</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>VVK</b>	64	*	*	*	*	*	*
<b>SC</b>	16	4	4	8	8	8	sAD
<b>BWP</b>	*	*	*	*	*	*	*
<b>BWOZ</b>	*	*	*	*	*	*	*

N – neutrální reakce; AD – adice; sAD – slabá adice; sAN – slabý antagonismus; AN –antagonismus;

\* - neměřitelné

Kmeny *C. albicans*: **ATCC** – ATCC 90028, **RVVK** – RVVK 8797/03, **VVK** – VVK 25188/97, **SC** - SC13-81, **BWP** - BWP17, **BWOZ** - BWOZ

### **Testosteron + flukonazol**

Testosteron v kombinaci s flukonazolem ovlivnil růst standardních kmenů kvasinek po 24 hodinovém odečtu slabě antagonisticky, u auxotrofních kmenů slabě adičně. U standardních kmenů se situace nezměnila ani po 48 hodinách, u kmene SC byla patrná adice, u ostatních auxotrofních kmenů se slabá adice růstu změnila v indiferenci.

### **Estradiol + flukonazol**

Tato kombinace způsobila u kmenů RVVK a VVK slabý antagonismus v růstu po 24 hod. i po 48 hod. U kmene BWP se neutrální reakce vyskytla po 24 hod. i po 48 hod. Kmen ATCC byl ovlivněn k antagonismu. U kmene SC jsme určili po 24 hod. adici slabější, která se po odečtu po 48 hod. zdála jako adice silnější.

### **Progesteron + flukonazol**

Vliv progesteronu na MIC se u kmenů RVVK a VVK po 24 hod. jevil jako antagonismus, u kmene ATCC jako slabý antagonismus, u BWP a SC kmenů byla patrná slabá adice. Rozdílný odečet po 24 hod. a 48 hod. byl pozorován u auxotrofního kmene BWOZ.

Kombinace flukonazolu a hormonů u většiny kmenů *C. albicans* vyvolala slabý antagonismus.

### **Testosteron + amfotericin B**

Testosteron v kombinaci s amfotericinem B způsobil u všech sledovaných kmenů po 24 hodinovém odečtu slabou adici, po 48 hod. se adice vyskytla u kmenů SC a BWOZ.

### **Estradiol + amfotericin B**

Estradiol v prostředí amfotericinu B poskytl slabou adici po 24 hod. i po 48 hod. u kmenů RVVK, SC, BWP i BWOZ. Neutrální reakci jsme sledovali u kmene ATCC.

### **Progesteron + Amfotericin B**

Progesteron v kombinaci s amfotericinem B poskytl téměř u všech sledovaných kmenů adici, slabá adice se vyskytla u kmene RVVK.

Testosteron a estradiol v kombinaci s amfotericinem B vyvolaly u většiny kmenů *C. albicans* slabou adici, progesteron s amfotericinem B způsobil adici silnější.

### **Testosteron + 5- fluorcytosin**

Vliv testosteronu na MIC 5-flucytosinu byl hůře sledovatelný, než u kombinací s jinými antimykotiky. Výsledky jsme získali jen po 24 hod. měření (s výjimkou RVVK kmene). Jednalo se

buď o adici nebo o slabou adici. Hodnoty po 48 hod. měřitelné nebyly, došlo k přerůstání mikrotitračních destiček bez možnosti vizuálního zhodnocení. Tato situace je v tabulkách označena hvězdičkou.

#### **Estradiol + 5- fluorcytosin**

U kombinace estradiolu a 5-fluorcytosinu jsme měřitelné hodnoty odečetli pouze u kmene SC a BWOZ. Zde se jednalo o adici. U ATCC kmene kombinace poskytla reakci indiferentní. U ostatních kmenů výsledek hodnotitelný nebyl vůbec.

#### **Progesteron + 5- fluorcytosin**

Kombinace progesteronu s 5-fluorcytosinem po 24 hod. odečtu poskytla u auxotrofních kmenů SC a BWOZ adici, u ATCC kmene reakci neutrální.

Použitá kombinace 5-fluorcytosinu se steroidními hormony nevykazovala významný vliv na inhibici růstu kmenů *Candida albicans*. U auxotrofních kmenů SC, BWP a BWOZ kombinace testosteronu s 5- fluorcytosinem způsobila adici, růst ostatních kmenů kombinací ovlivněn nebyl. Tato kombinace působila pouze na kmen SC a to adičně.

Zpracované hodnoty ze spektrofotometrického měření jsou dostupné na CD.

## 5. DISKUSE

Cílem práce bylo zjistit, zda pohlavní hormony v přítomnosti antimykotika významně ovlivňují růst kmenů *Candida albicans*.

Z našich výsledků je patrné, že k žádnému signifikantnímu vlivu nedošlo ani u jedné z použitých kombinací. Mírnou naději ovšem poskytuje kombinace amfotericinu B s progesteronem, kde u většiny sledovaných kmenů *C. albicans* došlo k adiční reakci. Při kombinaci hormonů s flukonazolem jsme našli nejvariabilnější možné efekty, od adice, přes indiferentní reakci až k antagonismu. Kombinace hormonů s flucytosinem poskytla u některých kmenů adici, u kmene ATCC došlo k reakci neutrální.

Z medicínského hlediska je nejdůležitější synergní reakce, kterou jsme však u žádného kmene a žádné testované kombinace neodhalili. Adice se objevila nejčastěji u kmenů v kombinaci hormonů s amfotericinem B, dá se předpokládat, že právě takovéto prostředí inhibuje růst kmenů *C. albicans* nejvíce ze sledovaných kombinací. Tendence k antagonismu byla patrná v kombinaci hormonů s flukonazolem.

Studie probíhající na zvířatech (zejména krysí modely) ukázaly významný vliv estrogenu na vznik vulvovaginitidy. Předpokládá se, že estrogen bude důležitý z hlediska vzniku, průběhu a možná i léčby žen postižených touto infekcí (Fidel, 2000).

Vaginální infekce nejčastěji vznikají v průběhu luteální fáze menstruačního cyklu a v těhotenství, tedy v době, kdy jsou hladiny jak estrogenů tak i gestagenů zvýšené. Hladiny progesteronu ovšem v této fázi převyšují koncentrace estrogenů. Uvažuje se tedy o dominantním vlivu estrogenu na vznik kandidové vaginitidy. Je známo, že estrogen ovlivňuje epitel vaginální sliznice, kde následně dochází k lepší adhezenci kandid. Klinické studie zatím nepotvrdily významnější možnost využití estrogenů či gestagenů v léčbě vulvovaginitidy. (Fidel, 2000). Avšak omezené experimentální a klinické zkušenosti naznačují, že progesteron resp. poměr jeho hladiny k estrogenu by mohl být využitelný u části žen trpících rekurentní formou vulvovaginální kandidózy – vzhledem k tomu, že podání progesteronového preparátu Depoprovera významně pomohlo některým pacientkám. (Dennerstein 1986, Špaček et al. 2007).

Ze studie vlivu hormonů na růst potenciálně patogenních kvasinek vyplývají zajímavé závěry. *Candida albicans* vykazuje kmenovou variabilitu v tvorbě klíčních hyf v prostředí různých pohlavních hormonů. Nejvyšší stimulace tvorby klíčních hyf byla vyhodnocena právě ve fyziologických koncentracích ( $10^{-10}$  mol/L/l) estradiolu, progesteronu i testosteronu. Tyto výsledky podporují tezi, že pohlavní hormony mohou mít vliv na morfologii růstu mikroskopických hub (Buchta, 2000). Z hlediska patogenity je u dominantního původce mykotické vulvovaginitidy *C. albicans* významná tvorba klíčních hyf, která je považována za invazivní faktor. Vzhledem k tomu, že vláknitá forma sejeví jako citlivější k působení některých antimykotik, dalo by se teoreticky předpokládat, že kombinace antimykotik s estradiolem nebo progesteronem budou vykazovat tendenci k vyšší citlivosti, tj. k adici nebo synergismu. Tento předpoklad se v našich experimentálních podmínkách nepotvrdil.

V naší práci se jako nejužitečnější kombinace antimykotika s hormonem jevil právě progesteron. Nejučinnější antifungální látkou byl amfotericin B, který se ovšem v léčbě vulvovaginitid neuplatňuje pro své systémově toxické nežádoucí účinky.

## 6. ZÁVĚR

V naší práci jsme se zaměřili na kombinace steroidních hormonů s antimykotiky. Testovali jsme vždy kombinaci jednoho antimykotika s jedním hormonem na každém z použitých kmenů *Candida albicans*.

Flukonazol v kombinaci s hormony vykazoval u standardních kmenů *C. albicans* spíše slabý antagonismus, u kmenů auxotrofních se vyskytla buď reakce slabě adiční nebo indiference. Adiční reakci jsme určili u kombinace flukonazolu se všemi hormony pouze u kmene SC a to i po 48 hod. odečítání.

Amfotericin B v kombinaci s testosteronem a estradiolem působil na růst kandid slabě adičně, u auxotrofních kmenů se tato kombinace jevila jako adiční, ale až po 48 hod. inkubace. Nejcitlivějšími kmeny k této kombinaci se zdají být SC a BWOZ. Kombinace s progesteronem poskytla adici silnější. Progesteron s amfotericinem B měl vliv na růst téměř všech sledovaných kmenů.

Prostředí 5-fluorcytosinu s hormony na růst kvasinek silně nepůsobilo, docházelo k přerůstání destiček s nemožností vizuálního hodnocení. Kombinace tohoto antimykotika pouze s testosteronem poskytla u kmene VVK, SC a BWP reakci adiční.

Pro farmakoterapii jsou při kombinaci dvou látek nejdůležitější reakce synergií. Tuto reakci jsme ovšem u sledovaných kmenů neodhalili v žádné kombinaci. Výhodná je také adice, kterou v našem pokuse poskytla kombinace amfotericinu B s hormony.

## 7. ABSTRAKT

Vaginální zánět vyvolaný mikroskopickými houbami je velmi častou komplikací žen fertilního věku. Mezi faktory, podílející se na vzniku vulvovaginální kandidózy jsou rovněž pohlavní hormony. Praktické zkušenosti ukazují, že tato nemoc často vzniká u žen v luteální fázi menstruačního cyklu, tedy v době, kdy jsou zvýšené hladiny estrogenu i progesteronu..

V naší práci jsme se zaměřili na vliv pohlavních hormonů na růst a citlivost sledovaných kmenů k antifungálním látkám.

Do pokusů bylo zahrnuto 6 kmenů *Candida albicans*. Všechny kvasinky byly vaginálními izoláty získanými od pacientek trpících vulvovaginální kandidózou. Testována byla kombinace vždy jednoho antimykotika (flukonazol, amfotericin B, flucytosin) s jedním hormonem (testosteron, estradiol, progesteron). Vizualně a spektrofotometricky jsem odečítali MIC antimykotika v kombinaci s pěti koncentracemi ( $10^{-6}$  –  $10^{-10}$  mol/L) daného hormonu.

Z našich výsledků vyplynulo, že nejlepší antifungální efekt na růst kmenů *C. albicans* měla kombinace amfotericinu B s progesteronem. Tato kombinace byla hodnocena jako adice. Naopak nevýhodnou – antagonistickou - kombinací se jevila kombinace flukonazolu se všemi testovanými hormony.

## 8. ABSTRACT

Vaginal infection caused by yeasts is very frequent complication of women in fertile age.. One the most important predisposed factor are considered sexual hormones, especially estardiol. The results of clinical observations shows that this infection often occurs in women during the luteal phase of menstrual cycle, when estrogen and progesteron levels are elevated.

We studied antifunal effect of sexual hormones on the growth of *Candida albicans* in combination with antifungal drugs.

We used six clinical strains of *Candida albicans* from the patients with vulvovaginal candidiasis. A combination of one antifungal drug (fluconazole, amphotericin B, flucytosine) with a hormone (testosterone, progesterone, estradiol) was tested in all these strins. The results expressed as MIC of these combinations of hormone and antifungals were determined visually and spectrophotometrically.

The best combination in terms of antifungal activity *in vitro* was amfotericin B with progesterone which showed addition. In contrast, combinations of flukonazol with all hormones were indifferent or antagonistic.



## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bednář, M, Fraňková, V: Lékařská mikrobiologie. Praha, Marvil, 1996, s.344 – 355.
2. Bertram Katzung, G.: Základní a klinická farmakologie. Nakladatelství a vydavatelství HaH, 1994, s.701 – 706.
3. Buchta, V, Jílek, P, Horáček, J et al.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. Praha, Karolinum, 1998, s. 143 – 157.
4. Buchta, V et al.: Studium vlivu hormonů v podmínkách *in vitro* na kvasinky potenciálně patogenní pro člověka. Grantová agentura Univerzity Karlovy, Závěrečná zpráva.
5. Dennerstein G. Depo-Provera in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. J Reprod Med 1986; 31:801-803
6. Field, P et al.: Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiosis. Infection and Imunity. Vol. 68, No 2, 2000, str. 651 - 656
7. Fragner, P.: Malá lékařská mykologie. Praha, Avicenum, 1984, s.88 – 93.
8. Habera, J et al.: Systémové mykózy a jejich léčba. Praha, Galén, 1995, s. 44 – 45.
9. Horáček, J et al.: Základy lékařské mikrobiologie. Praha, Karolinum, 2000, s.258 – 259.
10. Kaban, V: Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Praha, Galén, 2005, s.102.
11. Kocková-Kratochvílová, A: Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmoch. Bratislava, APSA, 1990, s.50, s.57.
12. Lincová, D, Farghali, H et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Praha, Galén, 2002, s. 470 – 478.
13. Mašata, J, Jedličková, A et al.: Infekce v gynekologii a porodnictví. Praha, Maxdorf, 2004, s. 34, 50-55.
14. Murray, R et al.: Harperova biochemie. Jinočany, nakladatelství a vydavatelství HaH, 2002, s.509 – 521, s.570 – 582.
15. Špaček J., Buchta V., Jílek P., Förstl M. 2007. Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. Eur J Obstet Gyn Reprod Biol 92: 131(2):198-202
16. Votava, M et al.: Lékařská mikrobiologie speciální. Brno, Neptun, 2003, s. 219- 220.

## 10. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKU

Obr. 1 Amfotericin B .....	17
Obr. 2 5-fluorecytosin .....	18
Obr. 3 Mikonazol.....	19
Obr. 4 Ketokonazol.....	20
Obr. 5 Flukonazol .....	21
Obr. 6 Itrakonazol.....	22
Obr. 7 Biosyntéza pohlavních hormonů.....	29
Obr. 8 Testosteron.....	30
Obr. 9 17- $\beta$ -estradiol    Obr. 10 Progesteron.....	31
Tab. 1 Systém lékařsky významných hub pro člověka .....	9
Tab. 2 Antimykotika k léčbě kandidóz dostupná na našem trhu * .....	26
Tab. 3 Obecné znaky skupin hormonů.....	28
Tab. 4 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky.....	38
Tab. 5 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad flukonazol + hormon.....	38
Tab. 6 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad amfotericin B + hormon .....	39
Tab. 7 Rozplnění látek do mikrotitrační destičky – příklad flucytosin + hormon.....	39
Tab. 8 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC, $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	41
Tab. 9 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	42
Tab. 10 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci flukonazolu (MIC $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	43
Tab. 11 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	44
Tab. 12 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	45
Tab. 13 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci amfotericinu B (MIC $\mu$ g/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	46

Tab. 14 Vliv testosteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	47
Tab. 15 Vliv estradiolu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	48
Tab. 16 Vliv progesteronu (mol/L) na minimální inhibiční koncentraci 5-flucytosinu (MIC, µg/ml) kmenů <i>Candida albicans</i> .....	49