

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Aneta Staňková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Farmaceutická analýza antimykotik pomocí voltametrických metod
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Aneta Staňková**
Osobní číslo: **C17085**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Farmaceutická analýza antimykotik pomocí voltametrických metod**
Téma práce anglicky: **Pharmaceutical analysis of antimycotics using voltammetric methods**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupné literatury zpracujte rešerši obsahující základní charakterizaci a klasifikaci antimykotik na základě jejich mechanismu účinku. Pokud je to možné, použijte v hodné ilustrace.
2. Zaměřte se především na možnosti využití voltametrie ve farmaceutické analýze antimykotik. Ve vaší bakalářské práci prosím použijte přehlednou tabulku obsahující voltametrické metody vyvinuté pro konkrétní antimykotikum. Tato tabulka by měla obsahovat typ pracovní elektrody, zvolený elektrolyt a analytické parametry (lineární rozsahy a limity detekce pro jednotlivé příklady).
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**
Katedra analytické chemie
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Farmaceutická analýza antimykotik pomocí voltametrických metod, jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2022

Aneta Staňková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu této bakalářské práce prof. Ing. Karlu Venturovi, CSc. a konzultantovi Ing. Milanu Sýsi Ph.D, za poskytnutí odborných rad v rámci pravidelných konzultací. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a všem ostatním, kteří mě během mého studia podporovali.

Děkuji Vám!

Název

Farmaceutická analýza antimykotik pomocí voltametrických metod

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá možnostmi využití voltametrických metod ve farmaceutické analýze léčiv, a to konkrétně antimykotik, která se využívají při léčbě nemocí způsobených patogenními houbami (plísněmi a kvasinkami). Práce zahrnuje stručnou charakterizaci původců mykóz a symptomy jimi vyvolaných onemocnění a přehled dosavadně používaných léčiv, včetně jejich indikace. Největší důraz je pak kladen na samotné elektrochemické stanovení aktivních látek, kde dominuje přímá voltametrie, jenž svými analytickými parametry může konkurovat v praxi používaným chromatografickým metodám.

Klíčová slova

Mykózy, antimykotika, voltametrie, farmaceutická analýza, organická syntéza.

Title

Pharmaceutical analysis of antimycotics using voltammetric methods

Annotation

This bachelor's thesis deals with the possibilities of using voltammetric methods in the pharmaceutical analysis of drugs, namely antifungals, which are applied in the treatment of diseases caused by pathogenic fungi, especially by molds and yeasts. The thesis contains a brief description of the causative agents of mycoses with the symptoms of the disease caused by them, and an overview of the drugs including their indications. The main emphasis is placed on the electrochemical determination of active substances itself, where direct voltammetry dominates, while with its analytical parameters can compete with the chromatographic methods used in practice.

Keywords

Mycoses, antifungals, voltammetry, pharmaceutical analysis, organic synthesis.

Obsah

Seznam ilustrací, tabulek a schémat	10
Úvod.....	14
1. Obecné vlastnosti hub	15
1.1. Patogenní mikroskopické houby	15
1.2. Patogenní plísně	16
1.2.1. Zygomycety.....	16
1.2.1.1. Rod <i>Mucor</i>	16
1.2.2. Hyalinní houby	17
1.2.2.1. Rod <i>Aspergillus</i>	17
1.2.2.2. Rod <i>Penicillium</i>	19
1.2.3. Pigmentované houby (čeleď <i>Dematiacea</i>).....	20
1.2.4. Dermatofyta.....	20
1.2.4.1. Rody <i>Trichophyton</i> , <i>Epidermophyton</i> a <i>Microsporum</i>	21
1.3. Patogenní kvasinky	21
1.3.1. Rod <i>Candida</i>	22
1.3.2. Rod <i>Cryptococcus</i>	23
1.3.3. Rod <i>Pneumocystis</i>	24
2. Mykotické onemocnění.....	25
2.1. Mykotoxikózy	25
2.1.1. Aflatoxikóza	25
2.1.2. Ergotismus.....	26
2.1.3. Akutní srdeční beri-beri.....	26
2.1.4. Alimentární toxická aleukie	26
2.2. Mykózy	26
2.2.1. Povrchové mykózy	27
2.2.1.1. Dermatofytóza.....	27

2.2.1.2.	Keratomykóza	29
2.2.1.3.	Povrchové a slizniční kandidózy	30
2.2.2.	Systémové mykózy	33
2.2.2.1.	Systémové kandidózy	33
2.2.2.2.	Aspergilóza	34
2.2.2.3.	Kryptokokóza	35
2.2.2.4.	Mukormykóza	36
3.	Léčba mykotických onemocnění	36
3.1.	Prevence mykotických onemocnění	36
3.1.1.	Přírodní antimykotika	37
3.1.1.1.	Silice z <i>Melaleuca alternifolia</i>	37
3.1.1.2.	Silice z <i>Cinnamomum verum</i>	38
3.1.1.3.	Silice z <i>Thymus vulgaris</i>	38
3.1.1.4.	Alkaloid z <i>Chelidonium majus</i>	38
3.1.1.5.	<i>Cocos nucifera</i>	39
3.1.1.6.	Flavonoidy z propolisu	39
3.1.2.	Doplňky stravy	40
3.2.	Antimykotika	41
3.2.1.	Polyenová antimykotika	42
3.2.1.1.	Amfotericin B	42
3.2.1.2.	Nystatin a natamycin	43
3.2.2.	Azolová antimykotika	44
3.2.2.1.	Mikonazol	44
3.2.2.2.	Ketokonazol	45
3.2.2.3.	Flukonazol	46
3.2.2.4.	Itrakonazol	47
3.2.2.5.	Vorikonazol	48

3.2.2.6.	Ekonazol.....	48
3.2.2.7.	Posakonazol.....	49
3.2.2.8.	Klotrimazol.....	49
3.2.3.	Antimetaboly.....	50
3.2.4.	Echinokandiny.....	50
3.2.4.1.	Kaspofofungin	50
4.	Analýza léčiv	51
4.1.	Příprava léčiv k analýze	51
4.2.	Elektroanalytické metody v analýze antimykotik.....	52
4.2.1.	Voltametrie a polarografie v analýze antimykotik.....	53
4.2.1.1.	Pracovní elektrody.....	54
4.2.1.2.	Složení pracovního média	54
4.2.1.3.	Elektrochemické techniky	54
4.2.1.4.	Příklady vyvinutých voltametrických metod v analýze antimykotik.....	56
4.2.1.4.1.	Stanovení nystatinu v tabletě a masti	58
4.2.1.4.2.	Stanovení klotrimazolu v krému	58
4.2.1.4.3.	Stanovení flukonazolu v kapsli	60
4.2.1.4.4.	Stanovení itrakonazolu v kapslích, séru a moči	60
4.2.1.4.5.	Stanovení ketokonazolu v šampónu.....	62
	Závěr	63
	Seznam literatury	64

Seznam ilustrací, tabulek a schémat

Obr. 1 Sporangiofor <i>M. plumbeus</i> (vlevo) a kolonie <i>M. plumbeus</i> na agaru ze sladového extraktu (MEA) po šesti dnech kultivace při 25 °C (vpravo) [9].	17
Obr. 2 Konidiofor <i>Aspergillus flavus</i> [11].	18
Obr. 3 Kolonie <i>A. flavus</i> narostlé na Sabourodově agaru (SA) při 30 °C po 72 h [16].	18
Obr. 4 Mikroskopie <i>A. fumigatus</i> [17].	19
Obr. 5 Typy konidioforů rodu <i>Penicillium</i> [18].	20
Obr. 6 Morfologie kvasinek [21].	21
Obr. 7 Kolonie <i>Candida albicans</i> na SA [26].	23
Obr. 8 Kolonie <i>C. neoformans</i> na SA [28].	24
Obr. 9 P. jirovecii v plicní tkáni [29].	24
Obr. 10 Formy onychomykózy [42].	28
Obr. 11 <i>Tinea capitis</i> u mladého chlapce [46].	29
Obr. 12 Keratomykóza [49].	29
Obr. 13 Moučnivka (neboli soor) u dítěte [51].	32
Obr. 14 HRCT plic s aspergilomy (kavity obsahující plíseň) [60].	35
Obr. 15 Květ <i>Melaleuca alternifolia</i> (vlevo) a molekula terpinen-4-olu (vpravo) [71,72].	37
Obr. 16 Kůra z <i>Cinnamomum verum</i> (vlevo) a molekula cinnamaldehydu (vpravo) [77,78].	38
Obr. 17 Listy a květ <i>Chelidonium majus</i> (vlevo) a chemická struktura chelerythrinu (vpravo) [85,86].	39
Obr. 18 Struktura amfotericinu B [102].	43
Obr. 19 Struktura itrakonazolu [111].	47
Obr. 20 Chemická struktura ekonazolu [132].	48
Obr. 21 Schematické znázornění klasického tří-elektrodového článku [134].	53
Obr. 22 Pravděpodobný mechanismus elektrodové reakce terkonazolu [132].	55
Obr. 23 Záznamy z DPV 1×10^{-4} mol/l terkonazolu na O-BDDE (a), GCE (b) a PGE (c) v BRB pufrch o různém pH [132].	56
Obr. 24 Odezva biosenzorů (na bázi kyslíku a oxidu uhličitého) na koncentraci nystatinu Podmínky: 2 g/l glukózy, 0,5 ml imobilizovaných buněk, 50 U/ml nystatinu [146].	58
Obr. 25 Elektrochemická redukce klotrimazolu [136].	59
Obr. 26 Katodické stripovací voltamogramy 0,345 µg/ml klotrimazolu ve fosfátovém pufru (pH 7,0) po dobu akumulace 30 s (křivka II) a 90 s (křivka III). $E_{ac} = -0,2$ V; $v = 100$ mV/s. Křivka I=slepý roztok (blank) [136].	59

Obr. 27 Cyklické voltamogramy získané v roztoku fosfátového pufru (pH 8,0) obsahujícím $5,0 \times 10^{-4}$ % flukonazolu na PCE (—), Pt (.....) a GCE (---). Experimentální podmínky: $0,25 \text{ V} \leq E_{\text{appl}} \leq 1,25 \text{ V}$ při $v = 100 \text{ mV/s}$ [147].	60
Obr. 28 Návrh mechanismu elektrodové reakce itrakonazolu [148].	61
Obr. 29 Cyklický voltamogramy pro (-) KCZ na GCE a (- - -) KCZ na modifikované CDMGCE [149].	62
Tabulka 1 Toxigenní plísňe rodu <i>Penicillium</i>	19
Tabulka 2 Terapie při léčení <i>Tinea pedis</i>	29
Tabulka 3 Terapie při léčení keratomykóz.	30
Tabulka 4 Terapie při léčení orofaryngeální kandidózy.	31
Tabulka 5 Terapie při léčbě vulvovaginální kandidózy.	33
Tabulka 6 Terapie léčby systémových kandidóz.	34
Tabulka 7 Terapie léčby Aspergilózy.	34
Tabulka 8 Terapie při léčbě kryptokokózy.	35
Tabulka 9 Terapie používaná při léčbě mukormykóz.	36
Tabulka 10 Složení mikrobiálního lyzátu v jedné tobolce	40
Tabulka 11 Složení přípravku Candida Support.	40
Tabulka 12 Přehled vybraných antimykotik a jejich léková forma.	41
Tabulka 13 Dělení antimykotik podle chemické struktury	42
Tabulka 14 Složení jednotlivých pufrů	52
Tabulka 15 Přehled metod používaných ke stanovení antimykotik.	57
Schéma 1 Syntéza mikonazolu [109].	45
Schéma 2 Syntéza ketokonazolu [109].	46
Schéma 3 Syntéza flukonazolu [109].	47
Schéma 4 Syntéza klotrimazolu [109].	49

Seznam zkratk a značek

BRB	Britton-Robinsonův pufr
CD	cyklodextrin
5- FC	5 Flucytosin
OM	Onychomykóza
ITZ	Itrakonazol
5-FU	5-Fluorouracil
GIT	Gastrointestinální trakt
MEA	Agar ze sladového extraktu
SA	Sabouradův agar
CNS	Centrální nervový systém
PGE	Pyrolytická grafitová elektroda
UTGE	Ultrastopová grafitová elektroda
CPE	Uhlíková pastová elektroda
SDS	Dodecylsírán sodný
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
FLU	Flukonazol
CV	Cyklická voltametrie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
HIV	Virus lidské imunodeficiency
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
VVK	Vulvovaginální kandidóza
DMF	Dimethylformamid
AdS	Adsorpční anodické stripování
p-AgSAE	Leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda
DME	Kapková rtuťová elektroda
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda
SWV	Square – wave (čtvercová) voltametrie
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
PB	Fosfátový pufr
MWCNTs	Vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
PCE	Tužková grafitová elektroda

O-BDDE	o-terminovaný borem-dopovaný diamant
RSD	Rovnovážná směrodatná odchylka
CGMGCE	Elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná β -cyklodextriny
KCZ	Ketokonazol

Úvod

Cílem bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s problematikou onemocnění vyvolaných patogenními houbami, jejich léčbou pomocí synteticky vyrobených léčiv (antimykotik) a možnostmi využití elektrochemických metod ve farmaceutické analýze. Z tohoto důvodu je počáteční kapitola věnována klasifikaci patogenních plísní a kvasinek, kdy je větší pozornost kladena na jejich morfologické znaky. Následující kapitola popisuje jednotlivá onemocnění vyvolaná těmito patogeny, přičemž dominují mykotická infekční onemocnění kůže (lokální) nebo celých orgánů (systémové), u pacientů se sníženou imunitou.

Většinu těchto onemocnění lze předejít patřičnou prevencí spočívající ve správné životosprávě a hygieně, kdy se doporučuje užívat přírodní látky (extrakty z rostlin) a doplňky stravy. Nicméně vážnější onemocnění se musí léčit antimykotiky. Přehled těchto běžně používaných aktivních látek, včetně jejich syntézy a mechanismu účinku, je rovněž obsahem této vědecké práce.

Poslední část je věnována analýze léčiv obsahující syntetická antimykotika, jež představují hlavní analyt. Jelikož tato práce pojednává o možnostech využití elektrochemických metod ve farmaceutické analýze, jsou standardní metody jen okrajově zmíněny. Nicméně je nutné podotknout, že příprava léčiv ve formě tablet, masti a šampónu je zcela totožná. Závěrem lze usoudit, že voltametrické metody využívající anodickou oxidaci antimykotik na uhlíkových elektrodách mohou být účinným nástrojem nejen ve farmaceutické analýze.

1. Obecné vlastnosti hub

Houby jsou eukaryotické, heterotrofní organismy, které tvoří samostatnou říši *Fungi*. V ekosystému se mohou chovat jako saprofyty, symbionti, komenzálové nebo parazité. Existuje na 100 tisíc druhů hub, z nichž je asi 100 patogenních pro člověka. Tyto patogeny mohou způsobovat infekce, které dělíme na kožní, podkožní, systémové a oportunní. Těmto patogenním houbám mikroskopických rozměrů, které parazitují na člověku říkáme mikromycety [1,2,3].

Od rostlin se liší tím, že nejsou schopny fotosyntézy, tudíž neobsahují chlorofyl. Buněčná stěna hub je tvořena sacharidy, hlavně chitin a glukán, tím se liší od buněčné stěny rostlin a bakterií. Důležitý rozdíl je ve složení cytoplazmatické membrány, kterou tvoří ergosterol, na rozdíl od lidské buňky obsahující cholesterol. Tohoto rozdílu využívají antimykotika, léky proti infekcím vyvolané mikroskopickými houbami, kdy dochází k blokaci syntézy ergosterolu v membráně hub a tím zůstává membrána lidské buňky nepoškozena. Houby z říše *Eumycota* (pravé houby) klasifikujeme do čtyř základních oddělení [2,3,4,5,6]:

- *Zygomycota* (tzv. pravé plísňe)
- *Chytridiomycota*
- *Basidiomycota* (houby stopkovýtrusné)
- *Ascomycota* (houby vřekovýtrusné)

1.1. Patogenní mikroskopické houby

Stáří mikroskopických hub se odhaduje zhruba na 300 miliónů let. Mikroskopické houby dělíme na kvasinky (kvasinkové mikroorganismy), dimorfní houby a vláknité mikroskopické houby (plísňe). Základní část jejich těla tvoří blastospora a vlákno (tzv. hyfa). Některé hyfy mohou být odděleny přepážkami, tzv. septy. Hyfy společně tvoří mycelium, které může být vegetativní (vyživující houbu) nebo vzdušné (nesoucí pohlavní orgány). Kvasinka má většinou kulovitý nebo oválný tvar s tendencí pučit. U některých kvasinek se vyskytuje tzv. pseudomycelium (útvary podobné vláknům) [1,2,3,5,6].

Mezi charakteristické vlastnosti hub patří jejich způsob rozmnožování. Rozlišujeme dva druhy reprodukce, nepohlavně-asexuálně a pohlavně-sexuálně. Při asexuální reprodukci (mitózou) se houby vyskytují jako tzv. anamorfy, kdy vznikají rozmnožovací tělíska (konidie nebo sporangiospory). Při sexuální reprodukci (meiózou), tvoří houby tzv. teleomorfy, kdy vznikají pohlavní tělíska, které se nazývají spory. Tyto spory vznikají ze dvou haploidních buněk, kdy vznikne diploidní buňka. Ta pomocí meiózy přejde na haploidní sporu [1,2,3].

1.2. Patogenní plísně

Velmi využívaný český název pro vláknité mikromycety „plísně“ zavedl v polovině 19. století český přírodovědec Jan Svatopluk Presl, a to pro zástupce rodu *Mucor*. V současné době má tento název mnohem širší uplatnění. Patogenní plísně jsou parazitické mikroorganismy, jež mohou způsobit infekci u lidí, kteří mohou být i v dobrém zdravotním stavu. Vláknité mikromycety se dělí na základě morfologie a jejich patogenity, a to následovně [1,2]:

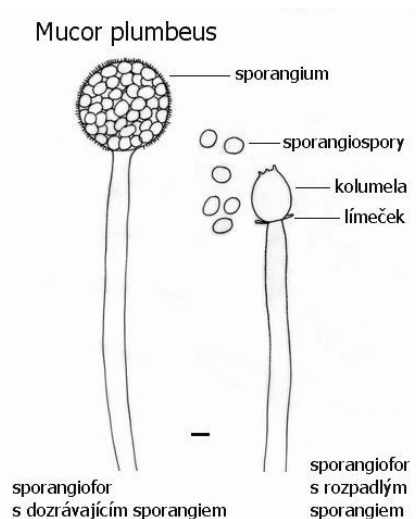
- Zygomycety
- Hyalinní mikromycety
- Pigmentované mikromycety (čeleď *Dematiaceae*)
- Dermatofyta

1.2.1. Zygomycety

Zygomycety se vyskytují jako saprofyty na rostlinných substrátech (obilné výrobky či ovoce), jsou nepatogenní pro zdravého člověka, ale u imunosuprimovaných pacientů mohou vzácně vyvolat infekce. K jejich vlastnostem patří osídlovat velké cévy, což vede k vytvoření tzv. živé tromby s následující embolií, která může vést až ke smrti dotčeného. Zygomycety jsou charakterizovány rychlým růstem, neseptovanými hyfy a kožiškovitým vzhledem povrchu kolonií, které se při kultivaci zbarvují hnědošedě až černošedě. Jsou schopny tvořit i mykotoxiny. Mezi nejznámější zástupce patří rod *Absidia*, *Rhizopus* a *Mucor*. Tyto houby vyvolávají u imunodeficitních pacientů nebo u lidí s diabetes mellitus rhinocerebrální a pulmonární zygomykózy. U predisponovaných jedinců bývá čím dál častější výskyt povrchových infekcí, především otomykóz zevního zvukovodu. K infikování může dojít inhalací spor, proniknutím spor přes kůži nebo méně často požitím [1,5,7].

1.2.1.1. Rod *Mucor*

Mucor je charakteristický velmi rychlým růstem na kultivačních médiích. Vytváří větvené nebo nevětvené sporangiospory (Obr. 1), které jsou ve hlenu. Mezi nejběžnější zástupce, patří *M. piriformis* a *M. plumbeus*, které způsobují rhinocerebrální mykózy, otomykózy zevního zvukovodu a infekce velkých popálenin. Jsou rezistentní vůči antimykotikům, mimo amfotericinu B. *M. plumbeus* roste a sporuluje při teplotě 5-20 °C. Při teplotě 37 °C neroste. Vytváří rychle rostoucí šedé kolonie (Obr. 1), které nejsou na spodní straně zbarveny. Tento druh netvoří žádné mykotoxiny [6,7,8,9].



Obr. 1 Sporangiiofor *M. plumbeus* (vlevo) a kolonie *M. plumbeus* na agaru ze sladového extraktu (MEA) po šesti dnech kultivace při 25 °C (vpravo) [9].

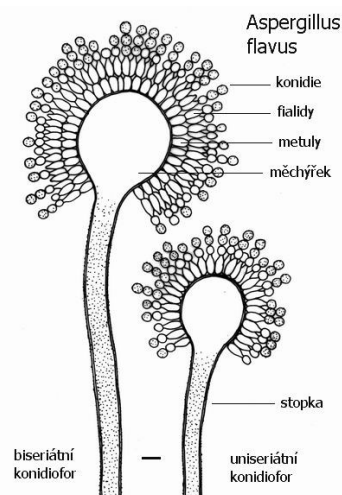
1.2.2. Hyalinní houby

Pro hyalinní houby jsou charakteristické septované hyfy bez pigmentu. U imunokompromitovaných osob vyvolávají povrchové, systémové i diseminované mykózy. Mohou vyvolávat alergické reakce i mykotoxikózy. K zástupcům se řadí rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* [6]. Níže jsou detailně popsány jednotlivé rody.

1.2.2.1. Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* zahrnuje přes 150 druhů plísní celosvětově rozšířených, z nichž bylo jen několik prokázáno jako patogenních pro člověka. Jedná se o vláknité houby, které jsou složeny z vegetativního a vzdušného mycelia. Vegetativní mycelium čerpá živiny z kultivační půdy a vzdušné mycelium (reprodukční) nese pohlavní orgány. Pro tento rod je charakteristické rozšíření konce vláken v tzv. konidiofor. Na konci tohoto konidioforu se nachází měchýřkovitý útvar, který je porostlý fialidami (Obr. 2). Tyto fialidy nesou řetízky konidií, jejichž vzhled může být kulovitý, oválný, drsný nebo hladký [5,6,10].

Mezi nejznámější zástupce patří *A. flavus* (Obr. 3), *A. fumigatus* (Obr. 4), *A. niger*, *A. terreus*, a *A. nidulans*. Nejlépe se kultivují při teplotách okolo 30-37 °C. Vytvářejí žluté, hnědé, šedozelené i černé kolonie. Tyto houby jsou běžně přítomné v prostředí, často kontaminující potraviny. Vyskytují se jako saprofyty a k jejich přenosu na člověka může dojít vzduchem inhalací mikrokonidií [1].



Obr. 2 Konidiofor *Aspergillus flavus* [11].

Kmeny, které kontaminují potraviny, mají většinou schopnost produkovat mykotoxiny. Požití potravin kontaminovaných toxiny, vede ke vzniku intoxikací, tzv. mykotoxikóz. Častější jsou chronické otravy, ke kterým dochází při požití opakovaného malého množství toxinu. Mezi neznámější toxin patří aflatoxin, který je produkován houbou *A. flavus* a *A. parasiticus*, kdy *A. flavus* produkuje A, B a C-aflatoxiny, kdežto *A. parasiticus* produkuje B a G aflatoxiny [3,12].

Intoxikace vysokými dávkami způsobuje akutní otravu, kdy může docházet až k poškození jater. Zdrojem aflatoxinů jsou cereálie, burské oříšky či sušené plody-datle, fíky. Aspergily neprodukují jen mykotoxiny, ale i řadu extracelulárních enzymů jako jsou b-galaktosidáza, b-mananáza, ale i organické kyseliny jako je kyselina citrónová či kyselina glukonová. Aspergily jsou druhou nejčastější příčinou oportunních infekcí. U imunokomprimovaných pacientů vyvolávají infekční onemocnění, tzv. aspergilózu. [8,12,13,14,15].



Obr. 3 Kolonie *A. flavus* narostlé na Sabourodově agaru (SA) při 30 °C po 72 h [16].



Obr. 4 Mikroskopie *A. fumigatus* [17].

1.2.2.2. Rod *Penicillium*

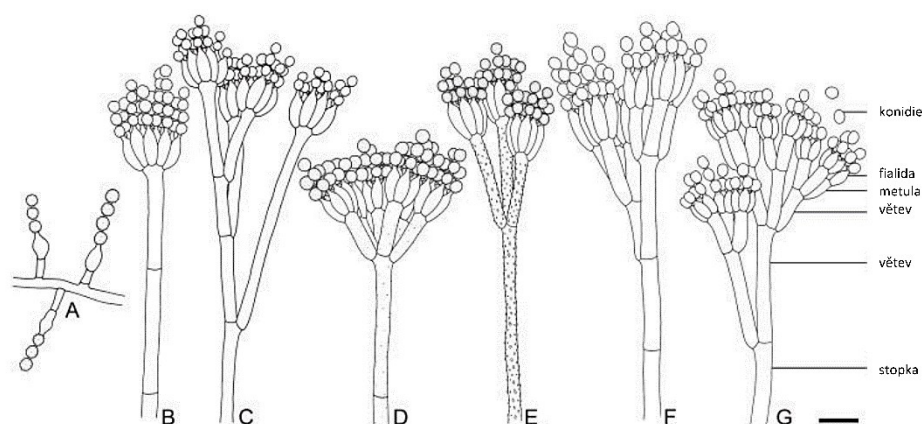
Penicillium patří mezi velice rozšířený druh. Zahrnuje asi 250 druhů, z nichž se většina uplatňuje v potravinářství a ve farmacii. Dříve byl zkoumán pro svoje antibiotické účinky a byl považován za nepatogenní pro člověka. Toto už ale dávno neplatí, protože některé druhy jsou schopny produkovat řadu mykotoxinů, které poškozují játra a ledviny například ochratoxin A, citrin a patulin. Vytváří sporulující namodralé, šedo-zelené až nazelenalé kolonie, charakteristické rychlým růstem [6,8,12,15]. Přehled patogenních penicilinů je zobrazen v Tab 1.

Tabulka 1 Toxigenní plísně rodu *Penicillium*

Druh	Produkováný mykotoxin
<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin A
<i>P. citrinum</i>	Citrinin
<i>P. expansum</i>	Patulin
<i>P. camemberti</i>	Kyselina cyklopiazonová
<i>P. citreonigrum</i>	Citreoviridin
<i>P. crustosum</i>	Penitrem A
<i>P. roqueforti</i>	Penicilin Roquefort (PR) toxin a roquefortin
<i>P. oxalycum</i>	Kyselina sekalonová

Rod *Penicillium* rozdělujeme do čtyř podrodů, podle počtu a uspořádání fialidů a metulace (Obr. 5): *Asperilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum*, a *Penicillium*. Podrod *Asperilloides* má jednoduchý (monoverticilátní, A) konidiofor. Podrod *Biverticillium* a *Furcatum* má větvený (biverticiální, D) konidiofor s elipsovitými konidiemi. Podrod

Penicillium má terveticilátní (F) konidiofor [7,15]. Tyto rozdíly slouží v mikrobiologii k jejich identifikaci.



Obr. 5 Typy konidioforů rodu *Penicillium* [18].

Prvním druhem prokázány jako původce infekce byl *P. marneffei*. Kolonie tvoří červenooranžový pigment, který difunduje do kultivačního média. U lidí s nemocí syndromu získaného selhání imunity (AIDS) vyvolává diseminované infekce, které postihují především plíce, játra a kůži. Nositelům tohoto druhu je tzv. bambusová krysa *Rhizomys pruinosus* a *R. sinensis* [1,6,8,10,19].

1.2.3. Pigmentované houby (čeleď *Dematiacea*)

Zástupci této čeledi mají přítomný tmavý pigment melanin v makrokonidiích a dalších strukturách. Tvar makrokonidií je značně variabilní. Jejich konidie se obvykle vyskytují v prachu, odkud kontaminují klinický materiál. Infekce se do tkáně dostávají přes porušenou kůži (pořezáním). Mezi nejznámější původce feohyfykóz patří rod *Alternaria* a chromomykóz rod *Cladosporium*. Rod *Alternaria* charakteristický vláknitým povrchem tvoří tmavě šedé až černošedé kolonie. Rod *Cladosporium* se velice podobá rodu *Cladophialophora*, patřící taky do této skupiny. Tvoří olivově zelené kolonie se zrnitým povrchem [1,6].

1.2.4. Dermatofyta

Dermatofyta jsou tzv. keratinofilní houby, způsobující mykózy (dermatofytózy) kůže, vlasů, chlupů a nehtů. Jedná se o dimorfní houby, které na SA při 20 °C vytváří kolonie s bazálním a vzdušným myceliem, charakteristické dle druhu povrchem a zbarvením. Pod mikroskopem lze pozorovat septovaná, větvená vlákna, na nichž jsou mikro a makrokonidie, charakteristické pro každý rod. Pomocí svých enzymů jsou schopny přeměňovat keratin. K zástupcům se řadí tři rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporium*. Z toho vyvolává

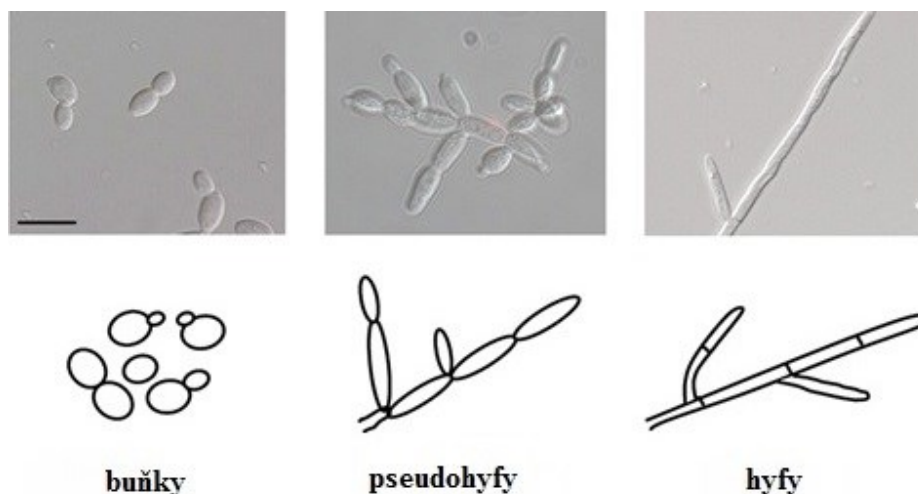
infekce asi 10 druhů, nejčastěji *T. rubrum*. Dermatofyta jsou buď antropofilní (*T. rubrum*, *E. floccosum*), zoofilní (*T. verrucosum*, *M. canis*) nebo geofilní (*M. persicolor*, *T. eboreum*) [2,3,5,6,20].

1.2.4.1. Rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporium*

Zástupci rodu *Trichophyton* jsou nejčastějšími vyvolavateli dermatomykóz v České republice. K nejznámějším původcům patří zoofilní *T. mentagrophytes*, charakteristický rychlým růstem kolonií, bělavě až nažloutle zbarvených. Dále antropofilní *T. interdigitale*, tvořící bílé chmýřité kolonie bez makrokonidií. Jako jediný zástupce rodu *Epidermophyton* je *E. floccosum*. Jde o antropofilní mikromycetu, napadající pouze nehty a kůži. Tvoří zelenožluté až hnědé kolonie. Typickým znakem pro rod *Microsporium* je tvorba septovaných makrokonii větvenovitěho tvaru. Zahrnuje druhy *M. canis*, *M. gypseum* a *M. audouini*, způsobující infekce kůže a vlasů [1].

1.3. Patogenní kvasinky

Jedná se o jednobuněčné mikroorganismy, které mají tvar kulatých, oválných či protáhlých buněk tzv. blastokonidií. Velikost těchto buněk se pohybuje okolo 3 až 15 μm . Pro kvasinky je charakteristický vegetativní způsob rozmnožování nepohlavně a to pučením, kdy dojde k oddělení dceřiné buňky od mateřské. Některé kvasinky se mohou rozmnožovat pohlavně za vzniku spor. Tyto houby rostou ve formě spojených buněk (kvasinky), pseudohyf a hyf (Obr. 6) [4,6,21].



Obr. 6 Morfologie kvasinek [21].

Pseudohyfální a hyfální forma je označována jako vláknitý typ růstu. Tyto morfologie se od sebe liší způsobem vzniku a tvarem. Jednotlivé buňky pseudohyf mají elipsovité tvar a zúžené septované spoje. Oproti tomu buňky hyf mají rovnoběžné strany, bez zúžení v přepážkách. Hyfy v těchto přepážkách obsahují póry, které slouží pro komunikaci mezi buňkami navzájem. Vlákna hyf jsou obvykle méně rozvětvená než vlákna pseudohyf, a to z toho důvodu, že buňky hyf zůstávají po dokončení prvního buněčného cyklu ve fázi G1, do té doby, než nenashromáždí cytoplazmatickou hmotu potřebnou k tomu, aby mohly vstoupit do druhého buněčného cyklu. Mezi kvasinkové mikroskopické houby, které způsobují kožní či slizniční onemocnění řadíme rody *Candida*, *Cryptococcus* a *Trichosporon* [5,6,21,22], jejichž detailní popis je popsán v následujících odstavcích.

1.3.1. Rod *Candida*

Nejčastějšími mikroorganismy způsobující povrchové i systémové mykózy jsou právě kvasinky rodu *Candida*. Existuje asi 200 druhů kvasinek tohoto rodu, z nichž je nejznámější *C. albicans*. U lidí v dobrém zdravotním stavu, jsou kandidy přítomny v dutině ústní, ve střevě, v oblasti pochvy a na dalších slizničních površích jako saprofyty. Při oslabení imunitního systému nebo potlačení přirozené mikroflóry vlivem antibiotik, dochází k přemnožení kvasinek a ke vzniku infekce. Infekce způsobené kvasinkami se nazývají kandidózy. Mezi nejběžnější zástupce tohoto rodu patří *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. krusei* [5,6,23].

C. albicans patří mezi oportunní patogeny se schopností tvořit zárodečné klíčky, které se objevují pár hodin od kultivace jako malé útvary pučící z blastokonidií, ze kterých mohou vznikat pravé hyfy. Tvorba zárodečných klíčků neboli germinace, je charakteristická pro *C. albicans*. Tato kvasinka je schopna za specifických podmínek, tvořit rezistentní buňky (chlamydospory), které mají kulatý tvar a nacházejí se na koncích i po stranách hyf [5,10,24,25].

C. albicans se obvykle kultivuje na krevním agaru, kde během 24 hodin, tvoří drobné kolonie s vůní chleba. Na SA tvoří typické krémově zbarvené hladké a vypouklé kolonie, jenž mají charakteristickou vůni (Obr. 7). *C. albicans* je součástí normální mikroflóry v gastrointestinálním traktu (GIT), pochvě a orofaryngu, při přemnožení nejčastěji způsobuje povrchové slizniční či hloubkové tkáňové infekce v místech, kde je vlhčí prostředí. Jedná se například o trísla, hýždě atd. [5,10,24,25].



Obr. 7 Kolonie *Candida albicans* na SA [26].

Ostatní kvasinky rodu *Candida*, označované jako kandidy non-*albicans* se podílejí také na vzniku mykóz. *C. tropicalis* způsobuje infekce střev, respiračního traktu, postihuje i sliznici pochvy. U lidí s rakovinou krve je dokonce patogennější než *C. albicans*. *C. parapsilosis* způsobuje endokarditidy, artritidy a záněty zevního zvukovodu [6].

1.3.2. Rod *Cryptococcus*

Tyto kvasinky se vyskytují v prostředí, jako je například půda, voda, ptačí (nejčastěji holubí) trus aj. Poprvé byl izolován v roce 1894 z broskvové šťávy. Kryptokoky se od kandid liší tím, že nedovedou tvořit pseudomycelia. Mají vzhled malé oválné buňky se schopností tvořit mukopolysacharidová pouzdra, které chrání buňku před imunitní odpovědí hostitele. Kultivace je prováděna na SA, kdy kryptokok vytváří krémové mukózní kolonie. Existuje asi 37 druhů, z nichž mezi nejznámější patogeny tohoto rodu patří *Cryptococcus neoformans* a *C. gattii*. Mnoho infekcí způsobených kryptokoky postihuje lidi s oslabenou imunitou [5,6,27].

C. neoformans je kvasinkovitá houba kulovitěho tvaru s velikostí okolo 10 μm , která netvoří pseudohyfy. Na SA agaru tvoří žluté až žlutozelené lesklé kolonie (Obr. 8). Způsobuje infekce u lidí s poškozenou imunitou, včetně pacientů s AIDS, u lidí po transplantaci, u pacientů užívajících imunosupresivní léky, a u pacientů s krevními malignitami. U relativně zdravých jedinců se může vyskytovat kryptokoková meningitida či zápal plic. Cílovými orgány kryptokoka jsou hlavně plíce a mozek, ale může postihovat i orgány jako jsou játra, penis, kůže, močové cesty, oči, myokard či klouby [5,27].



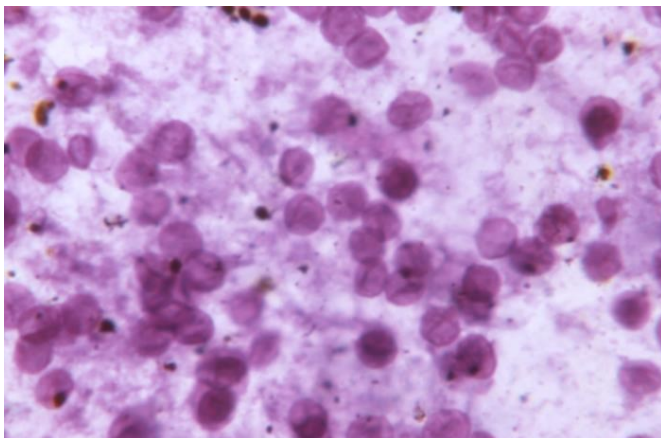
Obr. 8 Kolonie *C. neoformans* na SA [28].

1.3.3. Rod *Pneumocystis*

Jedná se o atypický mikroorganismus, který byl dříve řazen mezi prvoky. Postupem času molekulární biologie ukázala, že se jedná o houbu řazenou mezi askomycety. Tato houba se od ostatních liší stavbou membrány. V membráně obsahuje místo ergosterolu již zmíněný cholesterol, jako lidská (savčí) buňka, proto je vůči veškerým antimykotikům rezistentní [1].

Mezi významného zástupce patří *Pneumocystis jirovecii*. U imunodeficitních lidí a u nedonošených novorozenců dochází k množení *P. jirovecii* v plicích (Obr. 9). Dojde k nemožnosti vyměňovat plyny mezi alveolárními kapilárami a plicními sklípky a projeví se intersticiální pneumonie. U pacientů s AIDS dochází při neléčení této infekce k úmrtí [1].

Pneumocysty *P. jirovecii* se mohou vyskytovat ve třech životních stádiích: trofozoit, precysta a cysta. Trofozoiti se množí nepohlavně dělením. Jedná se o jednobuněčná stádia s nepravidelným tvarem. Precysta je fáze, kdy tenká stěna trofozoita není přeměněna na tlustou stěnu cysty. Poslední stádium je cysta, která má elipsoidní až kulovitý tvar. Zralé cysty obsahují 8 jader [1,6].



Obr. 9 *P. jirovecii* v plicní tkáni [29].

2. Mykotické onemocnění

Mykotická onemocnění lze definovat jako chorobné stavy způsobené patogenními houbami, nebo vyvolané jejich přítomností v prostředí (alergie). Původci onemocnění se do těla dostávají nejčastěji dýchacími cestami (vdechováním spor) nebo trávicím systémem. Nejvíce ohroženou skupinu představují lidé s oslabeným imunitním systémem, u kterých intoxikace nebo neléčení systémových mykóz může způsobit smrt, avšak smrtelné mohou být i pro zdravé osoby. Onemocnění vyvolané houbami dělíme do čtyř skupin [5]:

- Mykotoxikózy jsou způsobeny metabolickými produkty hub (mykotoxiny), které se nacházejí v kontaminované potravě.
- Mykózy (tzv. pravá infekční onemocnění) způsobené mikroskopickými houbami.
- Mykoalergózy jsou stavy přecitlivělosti na spory hub (konidie, artrospory), ale i na jejich metabolické produkty.
- Mycetismy lze definovat jako chorobné stavy vyvolané mycetickými elementy.

2.1. Mykotoxikózy

Mykotoxikóza je onemocnění vyvolané po požití toxinů, které jsou produkovány houbami. Na světě existuje asi 500 mykotoxinů, z nichž pouze malá část vyvolává u lidí mykotoxikózy. Nejvíce postiženými orgány jsou játra a ledviny, protože právě v nich dochází k metabolismu mykotoxinů. Rozsah onemocnění způsobený mykotoxiny, závisí na dávce, délce expozice, typu mykotoxinu a také na fyziologickém stavu pacienta. Rozlišujeme tři klinické formy tohoto onemocnění, a to akutní primární mykotoxikózu vznikající po požití vysokých dávek mykotoxinů. Tato forma může často končit smrtí. Dále chronické primární mykotoxikózy způsobené dlouhodobějším požíváním menších či středně vysokých dávek mykotoxinů a třetí formou je sekundární onemocnění vzniklé dlouhodobým požíváním velmi nízkých dávek mykotoxinů [30,31].

2.1.1. Aflatoxikóza

Mykotoxikóza vyvolaná požitím aflatoxinu v kontaminované potravě. Ke klinickým projevům patří zvracení, průjem, nízká horečka a nekróza jater. Studie ukázala, že akutní expozice u lidí se projevila zvracením, plicním edémem, nekrózou a smrtí. Zákeřnější a mnohem častější je chronická aflatoxikóza, způsobená požitím nízkých dávek aflatoxinů po dlouhou dobu, jejímž důsledkem je rakovina jater [13,32,33].

2.1.2. Ergotismus

Mykotoxikóza způsobená dlouhodobým požíváním námelových alkaloidů (ergotoxin, ergotamin), vyskytující se v obilovinách parazitovaných houbou *Claviceps purpurea*. Rozlišujeme dvě formy ergotismu: gangrenózní a konvulzivní. Mezi akutní příznaky otravy těmito alkaloidy patří bolesti břicha, zvracení, průjem. S postupem času dochází k edému končetin, zpomalení pulsu, ztrátě řeči, neschopnosti chůze, křeče a smrt v důsledku selhání respiračního a srdečního selhání [34,35].

2.1.3. Akutní srdeční beri-beri

Onemocnění ze „žluté rýže“ vyvolané po konzumaci neurotropního mykotoxinu citreoviridin, který je produkován především *Penicillium citreoviride*. Toxin byl na počátku 20. století spojován s akutním srdečním onemocněním vzniklým konzumací infikované rýže. Později bylo zjištěno, že rýže je ideální substrát pro *P. citreoviride*. Při pokusu na zvířatech bylo zjištěno, že způsobuje progresivní paralýzu končetin, zvracení, kardiovaskulární poškození a zástavu dechu. Z toho vyplývá, že toxin napadá motorické neurony, interneurony míchy a centrální nervový systém. Při biochemické studii bylo zjištěno, že citreoviridin inhibuje aktivitu adenosintrifosfatázy a mitochondriální energeticky spojené reakce, jako je adenosindifosfátové stimulované dýchání. Prvními příznaky u lidí je srdeční tíseň, tachypnoe, nevolnost, zvracení, dále pacient pociťuje tachykardii, zvyšující se paralýzu dýchacích svalů, dochází ke zhoršení plicní funkce oběhu, k přetížení pravé komory, a nakonec dojde k selhání srdce [12,35,36].

2.1.4. Alimentární toxická aleukie

Toto onemocnění nazývané též jako septická angína, je způsobeno T-2 toxinem, produkovaným houbami z rodu *Fusarium*. K prvním příznakům této nemoci patří poškození slizničních membrán trávicího ústrojí záněty, zvracení a průjmy. V dalších fázích dochází k poškození kostní dřeně, a tím k poklesu počtu erytrocytů a krevních destiček. T-2 toxin patřící do skupiny trichotheceny, je silně imunopresivní, inhibuje biosyntézu proteinů, inhibici translace, prostřednictvím vazby s určitým místem na eukaryotním organismu. V důsledku lidé umírají na běžné infekční onemocnění [35].

2.2. Mykózy

Jedná se o méně závažné onemocnění, způsobené mikromycetami- kvasinkovými a vláknitými houbami, které se z klinického hlediska dělí na povrchové (postihující kůži), subkutánní a systémové (postihující vnitřní orgány nebo orgánové systémy). Z kvasinek jsou

nejčastějšími původci zástupci rodu *Candida* - *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* atd. Z vláknitých hub to jsou nejčastěji dermatofyty, která způsobují povrchové infekce a rod *Aspergillus*, který způsobuje infekce systémové [5,37].

2.2.1. Povrchové mykózy

Podle vyvolavatele se povrchové mykózy dělí na dermatofytózy, keratinomykózy a kandidózy. V letním období dochází k výraznému zvýšení výskytu těchto mykóz. A to v důsledku vyšších teplot, pocení, nošení neprodyšného oblečení, obuvi a zvýšenému počtu sportovních aktivit. Nejčastějšími nositeli těchto mykóz, bývají zvířata, například pes, kočka a křeček. Pro léčbu těchto mykóz většinou stačí včasná, ale dlouhodobá lokální terapie. Celková terapie se volí při hrozícím rozšíření do hlubších tkání, nebo při selhání lokální terapie [38].

2.2.1.1. Dermatofytóza

Dermatofytózy jsou nejčastější houbové infekce způsobené dermatofyty. Nejčastějšími původci těchto infekcí jsou rody *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. Tyto infekce se dělí podle výskytu na *Tinea pedis*, *Tinea unguium*, *Tinea capitis* atd. V dnešní době dochází k vysokému nárůstu tohoto onemocnění vlivem moderního způsobu života [5,37].

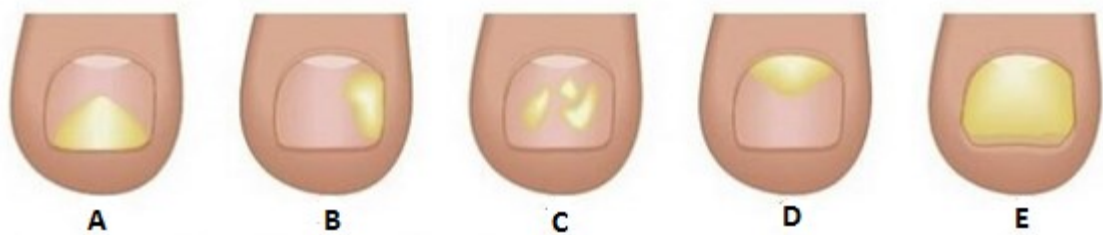
Nejčastějším patogenem vyvolávající *Tinea pedis*, je *T. rubrum*, méně častěji *T. interdigitale*. Vyvolavatelé této infekce mohou být i kvasinky rodu *Candida*. Infekce se nejběžněji vyskytuje jako plantární (na chodidle), interdigitální (meziprstí), dále se vyskytuje jako forma hyperkeratonická a vezikulo-bulózní. Nejvíce náchylní k této infekci jsou imunokompromitovaní pacienti, diabetici nebo pacienti se zhoršeným prokrvením dolních končetin. U této infekce je velmi důležitá prevence, která spočívá v odstranění či omezení predisponujících faktorů. Při neléčení této infekce může dojít k onychomykóze (OM), jenž způsobuje plísně nehtů. Další komplikace může nastat, když chodidlo postižené mykózou je napadeno bakteriální infekcí, to se projevuje mokváním a hnisavým zánětem prstů. Při této komplikaci je důležité nejprve léčit bakteriální infekci antiseptiky či antibiotiky a poté zahájit vlastní léčbu dermatofytózy [37,39].

Tinea unguium neboli onychomykóza, infekce postihující nehty. OM má několik forem (Obr. 10):

- **Distální a laterální subunguální onychomykóza (A, B)** - nejběžnější forma, vyvolaná dermatofytem *T. rubrum*. Charakteristickým znakem je ztlustělá, zakalená nebo dyskolorovaná (bělavá až žlutě zbarvená) nehtová ploténka na okrajích. Nehet se drolí a ulamuje. Terapie OM je velice obtížná. Může dojít k přenosu na jinou osobu, zejména na

osoby jako jsou diabetici, osoby imunodeficitní a osoby s ischemickou chorobou dolních končetin, kde OM už není jen kosmetickým problémem [37,40].

- **Proximální subunguální onychomykóza (D)** - tato forma se u zdravých lidí téměř nevyskytuje. Nejvíce běžná je u pacientů s poruchou imunitního systému. Nejčastějším patogenem vyvolávajícím tuto formu je *T. rubrum*. Tato vzácná forma může postihovat i hlubší vrstvy nehtové ploténky. Vzhled nehtové ploténky bývá bělavý [40].
- **Totální dystrofická onychomykóza (E)** – u této formy dochází k poškození celého nehtu. Nehty jsou deformované, ztlustělé a na povrchu matné se žlutavě hnědou diskolorací. Tato forma OM je výsledným stavem při neléčení předchozích forem [40].



Obr. 10 Formy onychomykózy [41].

Léčba (Tab.2) OM specifickými lokálními anestetiky ve formě solucí či krémů není moc efektivní, protože nedochází k dostatečnému průniku do nehtové ploténky. Více účinné přípravky představují látky ve formě laku, například 5 % amorolfin nebo terbinafin. Lokální antimykotika se používají hlavně na počátku onemocnění, ovšem pokud dojde k selhání této léčby, volí se celková terapie s použitím antimykotika terbinafin či itrakonazol. Aby mohlo vůbec dojít k zahájení celkové terapie, musí se nejprve přihlídnout k potencionálním nežádoucím účinkům terapie, možnosti interakce léčiv, věku pacienta a obzvláště k výsledkům kultivačního vyšetření [40,42,43].

Tinea capitis je u nás velice vzácné onemocnění postihující pokožku hlavy (Obr. 11). V jiných zemích (USA, Velká Británie) se jako hlavní původce uplatňuje antropofilní *Trychophyton tonsurans*. Hlavní vyvolavatel této infekce u nás je *Microsporum canis* a *Trychophyton mentagrophytes*. Jedná se o zoofilní dermatofyt, který se vyskytuje u koťat. Postihuje lidský vlas a vytváří zarudlá, okrouhlá ložiska. Vyskytuje se především u dětí. Jako lokální antimykotika se používají roztoky a antimykotické šampony. Tato terapie slouží jen jako pomocná. Vhodnější je perorální léčba griseofulvinem, který je bohužel u nás zakázaný, a proto jako lék první volby u dětí se používá terbinafin [5,38,44].



Obr. 11 *Tinea capitis* u mladého chlapce [45].

Tabulka 2 Terapie při léčení *Tinea pedis*

Lék	Léková forma	Dávkování (denně)
Bifonazol	krém	1×
Clotrimazol	krém	2-3×
	sprej	1-2 stlačení
	pasta	1-2×
Terbinafin	krém	1×

2.2.1.2. Keratomykóza

Neboli *Tinea versicolor* (Obr. 12) mykóza vyvolaná *Malassezia furfur*. Nejčastěji se vyskytuje u lidí s poruchou imunitního systému, u těhotných žen, diabetiků a u pacientů léčených kortikosteroidy. Projevuje se především na místech s vysokým obsahem mazových žláz např. horní polovina zad a střed hrudníku. Na kůži vytváří ohraničená, pravidelná ložiska bělavé barvy. Zástupci tohoto rodu *Malassezia* vyvolávají také lupovitost vlasové pokožky. K terapii (Tab. 3) keratomykóz se většinou volí celotělová lokální léčba ve formě šamponu [38,46,47].



Obr. 12 Keratomykóza [48].

Tabulka 3 Terapie při léčení keratomykóz.

Lék	Dávkování	Délka terapie
Flukonazol	150 mg/1 týdně	4 týdny
	300mg/1 týdně	2 týdny
	400 mg/den	po týdnů zopakovat
Itrakonazol	200 mg/denně	5-7 dní
Ketokonazol	200 mg/denně	5-7 dní
	400 mg/1 týdně	2 týdny
	2 % šampón/5-10 minut denně	2-6 týdnů
Terbinafin	1 % krém	

2.2.1.3. Povrchové a slizniční kandidózy

Onemocnění vyvolané kvasinkami u lidí s oslabenou imunitou, cukrovkou nebo u pacientů, kteří se dlouhodobě léčí širokospektrými antibiotiky, způsobuje infekční záněty kůže a sliznic. Nejčastěji je způsobena *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Tyto infekce většinou mají dlouhotrvající opakující se průběh. U kandidóz se často volí špatná terapie, proto před samotným zahájením léčby předchází velmi důležité stanovení diagnózy, založené na anamnéze, klinickém nález, nativní mikroskopii a kultivačním výsledku. Na základě této diagnózy se stanoví vhodná terapie. Nejčastěji se podávají azolová antimykotika (klotrimazol, mikonazol), triazolová antimykotika (flukonazol, vorikonazol). Níže si popíšeme vybrané povrchové kandidózy [43,49].

K nejzávažnější formě povrchových mykóz, patří chronická mukokutánní kandidóza, většinou způsobená *C. albicans*. Vzniká jako důsledek vrozené poruchy aktivace T-lymfocytů, tvorby faktorů důležitých pro aktivaci makrofágů nebo endokrinopatií. Projevuje se trvalými nebo stále se vracejícími infekcemi kůže, nehtů a sliznic [37].

Orofaryngeální kandidóza vyvolaná *C. albicans*, postihuje pacienty s poruchou imunitního systému a čím dál častěji se vyskytuje u předčasně narozených kojenců. Jde o oportunní infekci sliznice dutiny ústní a hltanu. K základním typům této infekce patří pseudomembranózní kandidóza, erytematózní kandidóza, hyperplastická kandidóza, protetická stomatitida a angulární kandidóza [49].

Pseudomembranózní kandidóza neboli moučnivka (soor) (Obr. 13) je charakterizována tvorbou bílého povlaku na jazyku, tvrdém a měkkém patře. Provází jí porucha chuti, pálení a zvýšená citlivost sliznice. U erytematózní kandidózy vznikají hladké červené skvrny, bez přítomnosti bílých plaků, na tvrdém nebo měkkém patře a na hřbetu jazyka. Tato forma je

obvykle důsledkem perorální léčby antibiotiky. Hyperplastická kandidóza se vyskytuje víceméně u kuřáků, projevuje se jako bílé, těžko odstranitelné plaky v oblasti jazyka a tváře. Protetická stomatitida neboli chronická atrofická kandidóza postihuje jedince s umělou zubní náhradou. Charakteristická pálivými, zarudlými, bolestivými místy v dutině ústní, kde dochází ke styku se zubní náhradou. U angulární kandidózy dochází k trhlinám koutků a následnému vniknutí bakteriální infekce. Bývá doprovázena zarudnutím a bolestivostí. Zasahuje sliznici, kde dochází ke styku s náhradou. K léčbě se používají polyenové nebo azolová antifungální léčiva např. amfotericin B, nystatin a klotrimazol (Tab. 4). Mimo jiné se k terapii méně závažných kandidóz používají lokální antimikrobiální léčiva [49].

Tabulka 4 Terapie při léčení orofaryngeální kandidózy.

Lék	Indikace	Léková forma	Dávkování	Délka léčby
Nystatin	angulární kandidóza (kan.)	mast	2x denně	2-3 týdny
	orofaryngeální kan.	orální suspenze, gel	0,5-1 ml 4-6 × denně	5-10 dní
Mikonazol	všechny typy orofaryngeální kan.	orální gel 2 %	4× denně děti 1,25 ml, dospělý 2,5 ml	
	orofaryngeální kan.	tobolka	50-150 mg/den	7-14 dní
Itrakonazol	orofaryngeální kandidóza	tobolka	100 mg/den po jídle	15 dní
		perorální roztok	200 mg/den na lačno	1 týden
Posakonazol	orofaryngeální kan.	perorální suspenze	800 mg/den	3 týdny



Obr. 13 Moučnivka (neboli soor) u dítěte [50].

Vulvovaginální kandidóza (VVK) je nejčastější mykotické onemocnění, způsobující infekci vagíny a vulvy. Předpokládá se, že 75 % žen v reprodukčním věku, prodělá alespoň jednou VVK. Asi v 85-90 % případů je infekce způsobena druhem *C. albicans*, 15 % tvoří ostatní kvasinky non-*albicans* (*C. glabrata*, *C. krusei*). Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách asymptomatické a symptomatické. U asymptomatické formy se kvasinky přenášejí z perianálního prostoru na vaginální sliznici, kde přilnou a spotřebovávají zde přítomný glykogen. Symptomatická forma se projevuje svěděním, pálením, popřípadě i otokem vulvy, může být přítomen i výtok. Pro stanovení správné léčby rozlišujeme podle frekvence opakování, zda se jedná o sporadickou či rekurentní formu onemocnění, dále podle závažnosti dělíme na komplikovanou či nekomplikovanou [37,51,52].

K významným predispozičním faktorům VVK patří léčba antibiotiky, kortikosteroidy či imunosupresivní léčiva, neléčený diabetes mellitus, kolísání hladiny pohlavních hormonů, zejména estrogenu. Zvýšená hladina estrogenu, vede k vyššímu obsahu glykogenu, který vytváří lepší prostředí pro candidy. Dále se jedná o zvýšenou sexuální aktivitu nebo nošení syntetického prádla. [37,51,52].

U nekomplikované VVK se používají spíše azolová antimykotika pro lokální nebo systémovou terapii (Tab. 5) Při perorální léčbě se podávají flukonazol, popřípadě itrakonazol. Avšak u této léčby je velmi důležité počítat s toxicitou či interakcí léčiv. K lokální terapii se užívají azolová nebo polyenová léčiva např. klotrimazol, mikonazol či nystatin, jejichž terapeutická účinnost se pohybuje okolo 80-90 %. U gravidních pacientek je z hlediska bezpečnosti vhodnější lokální terapie [44,51,52,53].

Tabulka 5 Terapie při léčbě vulvovaginální kandidózy.

Lék	Léková forma	Dávkování (mg/den)	Délka léčby
Klotrimazol	tabletky	200	3-12 dní
		500	jednorázově
		100	6 dní
Ekonazol	10 % krém	0,05	6 dní
		50	15 dní
		150	3 dny
Itrakonazol	globule + 1 % krém	150	3 dny
		200	1 den
Nystatin	perorální kapsula	0,04	14 dní
Flukonazol	krém	150	3 dávky po 72 hodinách

2.2.2. Systémové mykózy

Mezi nejznámější systémové infekce patří kandidóza, aspergilóza, kryptokokóza a mukormykóza. Na konci 20. století byl zaznamenán větší nárůst těchto onemocnění, právě z důvodu přibývání imunosuprimovaných osob, v důsledku léčby cytostatiky, širokospektrými antibiotiky či pacienti infikovaní virem lidské imunodeficiencie (HIV). Imunosuprimovaní lidé právě tvoří nejohroženější skupinu těchto infekcí. K léčbě se používají systémová antimykotika [54]. Některé systémové infekce si níže podrobněji popíšeme.

2.2.2.1. Systémové kandidózy

Systémové kandidózy jsou charakterizované invazí vláknitých elementů s poškozením orgánů. Rozlišujeme orgánové (kandidóza plic, jater, ledvin, oka a CNS) a diseminované kandidózy, kdy dochází k postižení více orgánů nebo jednoho orgánu společně s výskytem kandidémie. Kandidémie je jedna z nejhorších forem kandidózy a v případě spojení s orgánovou manifestací její mortalita dosahuje 50 a více %. Jde o závažné onemocnění, kdy dochází k invazi kvasinek do krve. Zdrojem infekce může být žilní katétr nebo také GIT poškozený protinádorovou léčbou. Plicní kandidóza vzniká jako sekundární infekce diseminací, kdy dojde většinou k postižení obou plicních křídel. Zejména postihuje osoby se sníženým počtem bílých krvinek (neutropenické pacienty). Diagnóza plicní kandidózy je velice obtížná, neboť nemá specifické klinické projevy, proto se opírá hlavně o mikroskopické a kulturační vyšetření [54,56]. Tab. 6 nabízí přehled léčiv a jejich indikaci při léčbě kandidóz.

Tabulka 6 Terapie léčby systémových kandidóz.

Lék	Dávka	Délka léčby
Itrakonazol	100-200 mg/den	3 týdny – 7 měsíců
Flukonazol	400-800 mg/den	14 dní nebo do vymizení klinických příznaků infekce
Amfotericin B	5 mg/kg intravenózně/den	minimálně 14 dní

2.2.2.2. Aspergilóza

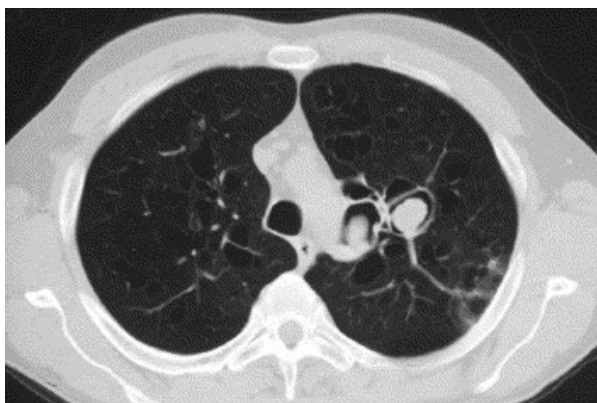
Druhé nejčastější onemocnění způsobené vláknitou houbou rodu *Aspergillus*. Jde o exogenní infekci. Nejrozšířenější patogen způsobující toto onemocnění je *A. fumigatus*, napadá lidi s oslabenou imunitou (příjemce transplantátů, pacienty s leukémií či s jinými nádorovými nemocí) a způsobuje u nich invazivní plicní aspergilózu. Mezi plicní formy aspergilové infekce se řadí alergická bronchopulmonální aspergilóza, chronická nekrotizující aspergilóza, aspergilom a invazivní plicní aspergilóza. Ve 20-30 % dochází k poškození jiných systémů, mozku, GIT, játra a ledviny. K léčbě se volí triazolové antimykotikum vorikonazol, popřípadě i amfotericin [1,57,58], jak je uvedeno v Tab. 7.

Tabulka 7 Terapie léčby Aspergilózy.

Lék	Dávkování	Délka léčby
Itrakonazol	200 mg/den	2-5 měsíců
Vorikonazol	400 mg každých 12 hodin během prvních 24 hodin (nasyčovací dávka) 200 mg/2× denně (udržovací dávka)	Do odeznění klinických a mikrobiologických známek infekce

Bronchopulmonální aspergilóza je oportunní infekce, projevující se u astmatiků nebo u pacientů s cystickou fibrózou. Při této infekci nedochází k invazi do organismu, avšak je velmi důležité včas tuto infekci diagnostikovat a správně léčit. Ke klinickým příznakům patří dušnost, kašel a teplota. Aspergilom (Obr. 14) je kulatý, ohraničený útvar, vytváří se v již existujících dutinách. Dutiny mohou vzniknout při tuberkulóze, cystické fibróze nebo při nějakém nekrotizujícím procesu. Léčba se řeší chirurgicky. Velice vzácnou formu aspergilózy představuje chronická plicní aspergilóza, způsobená druhem *A. fumigatus*. Projevuje se u starších pacientů s chronickým plicním onemocněním, jako lokální invaze hyf bez diseminace do jiných orgánů [1,57,58].

Invazivní plicní aspergilóza patří k nejzávažnější formě způsobující úmrtí. Může probíhat jako tracheobronchitida nebo až nekrotizující pneumonie. Důležitá je včasná diagnostika, která v posledních letech zaznamenala veliký pokrok. K diagnostice se používají radiodiagnostické, serologické a molekulárně biologické metody. K velkému trendu patří monitorování pacientů a při prvních příznacích zahájení včasné antimykotické léčby [1,57,58].



Obr. 14 HRCT plic s aspergilomy (kavity obsahující plíseň) [59].

2.2.2.3. Kryptokokóza

Exogenní systémové infekční onemocnění způsobené houbou *Cryptococcus neoformans*. Primárním ložiskem jsou plíce, kde dochází k inhalaci buněk, infekce hematogenně diseminuje do CNS nebo na jiné orgány, včetně jater, kůže, prostaty, očí, kloubů a kostí. V závažných případech dojde ke zvýšení intrakraniálního tlaku, což způsobí hlubokou ztrátu zraku nebo sluchu, maligní hypertenzi, a dokonce může dojít ke smrti, zejména u osob s oslabenou imunitou. Nejčastěji se infekce vyskytuje sporadicky u pacientů s poruchou funkce T-lymfocytů, především u pacientů s AIDS, kde akutní mortalita představuje 10-20 %. *C. neoformans* diagnostikujeme mikroskopicky jako pučící kvasinky z preparátu ze sputa či mozkomíšního moku. K terapii kryptokokózy se užívá kombinace amfotericinu B s 5-flucytosinem (Tab.8). V případě této léčby může dojít k nežádoucím účinkům např. dyspeptické obtíže, kožní projevy (anémie a trombocytopenie) [27,56,60].

Tabulka 8 Terapie při léčbě kryptokokózy.

Lék	Dávkování	Délka terapie
Amfotericin B + Flucytosin	0,7-1 mg/kg/den + 100-150 mg/kg/den (rozděleno do 4 dávek)	po dobu 2 týdnů
Flukonazol	400 mg/den	po dobu 10 týdnů jako udržovací léčba

2.2.2.4. Mukormykóza

Původcem této akutní, oportunní infekce je houba z řádu *Mucorales*. K nejčastěji izolovaným druhům způsobující tyto infekce patří *R. microsporum* a *R. oryzae*. U imunokompromitovaných pacientů, především pacientů s leukémií či diabetes mellitus, představují vysoké riziko úmrtí. Vznik infekce začíná inhalací sporangiospór. Rozlišujeme dva typy mukormykóz, rhinocerebrální, vyskytující se obvykle u diabetiků a pulmonální, ke které jsou náchylnější pacienti s leukémií nebo lymfomem [7]. Léčba je popsána v Tab. 9.

Tabulka 9 Terapie používaná při léčbě mukormykóz.

Lék	Dávkování	Délka léčby
Liposomový amfotericin B	5 mg/kg/den	do odeznění klinických
Posakonazol	300 mg/2× denně	známek infekce

3. Léčba mykotických onemocnění

Léčba mykotických onemocnění spočívá v prevenci, která snižuje riziko vzniku mykotického onemocnění. Velmi významné je užívání doplňků stravy, jenž obsahují účinné látky z bylin či mikrobiální lyzáty, které posilují imunitní systém. Pokud ani toto nepomůže a dojde ke vzniku mykóz, tak se k léčbě volí vhodná antimykotika, ať už přírodní či synteticky připravená. Jednotlivé kroky vedoucí k zabránění vzniku mykotických onemocnění, včetně jejich následné léčby, jsou detailněji popsány v následujících podkapitolách [61,62].

3.1. Prevence mykotických onemocnění

Pro snížení rizika vzniku a návratnosti mykotických infekcí je dobré dodržovat tyto preventivní opatření. Pro prevenci před vaginálními mykózami se především doporučuje vyvarovat parfémovaným mýdlům, nošením mokrého či vlhkého spodního prádla. Pro ženy trpící touto infekcí se doporučuje nosit prodyšné a bavlněné spodní prádlo, kdy se musí dbát na správnou intimní hygienu. Ženy by se měly vyhýbat koupeli v chlorovaném bazénu, a to z důvodu narušení přirozené vaginální mikroflóry [61,63].

Aby nedocházelo ke kožním mykózám a plísním nehtů, doporučuje se po každé koupeli kůži velmi dobře osušit, hlavně v prostoru mezi prsty a záhybech kůže. Do společných šaten, umývár a veřejných bazénů by pacienti měli používat vlastní omyvatelnou obuv. Důležité je předejít zvýšené potivosti nohou používáním bavlněných ponožek a prodyšné obuvi, zejména v létě. Při prevenci kvasinkové infekce, je důležité změnit i stravu, a to především vyřadit cukr, a zdroje cukru (škrob), kofein, i alkohol. Lékaři doporučují zvýšit pitný režim (nealkoholických

nápojů) a konzumovat větší množství potravin potlačující růst infekce (např. česnek, grep, aloe vera, etc.) [63].

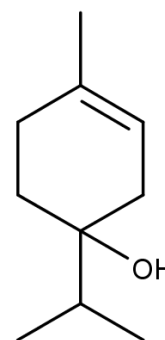
3.1.1. Přírodní antimykotika

Vzhledem k omezenosti dostupných antimykotik a pomalému vývoji těchto nových léčiv, se hledají alternativní léky s nízkou rezistencí a menším výskytem vedlejších účinků. Přírodní antimykotika jsou látky nesyntetické povahy, většinou produkované rostlinami. Bezpočet studií ukazují na skutečnost, že léčivé byliny mohou představovat alternativní zdroj antifungálních sloučenin, mezi které patří alkaloidy, terpeny, flavonoidy, etc. Nejčastější léčivou formou bývají extrakty silic, jež jsou produkovány imunitním systémem rostlin, a které přirozeně chrání před škůdci (hmyzem, plísněmi, etc.) [62,64].

Mechanismus inhibice růstu mikromycet spočívá v narušení jejich buněčné stěny. Přírodní antimykotika nemají tendenci vést k rezistenci. Tyto látky můžeme využít jako doplňky stravy nebo jako přírodní antifungální léčiva. Mezi rostliny mající antifungální účinek patří aloe vera, tea tree, skořice, tymián, hřebíček, kokosový olej, česnek a zázvor. Níže jsou popsána některá vybraná přírodní antimykotika [62,64].

3.1.1.1. Silice z *Melaleuca alternifolia*

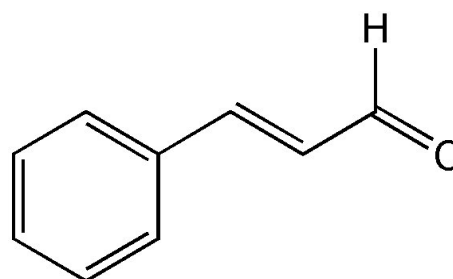
Kajeput střídavolistý (*Melaleuca alternifolia*) též známý jako tea tree (Obr. 15) je strom menšího vzrůstu původem ze severovýchodního pobřeží Nového Jižního Walesu v Austrálii. Esenciální olej získaný z tohoto stromu obsahuje hlavně mono a seskviterpeny. Hlavní účinná složka zodpovědná za antiseptické vlastnosti je terpinen-4-ol. V lékařství se používá jako prevence vůči vnějším infekcím, pomáhá při vaginálních infekcích a mykóz nohou. Čistý tea tree olej dokáže hubit dokonce i některé kmeny bakterií, a to likvidací stavebních proteinů plísňových buněk, kdy narušuje stavbu kvasinek, má tzv. antimykotický efekt [65,66].



Obr. 15 Květ *Melaleuca alternifolia* (vlevo) a molekula terpinen-4-olu (vpravo) [67,68].

3.1.1.2. Silice z *Cinnamomum verum*

Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*) pochází z jihovýchodní Asie (Obr. 16). Hlavní složkou je cinnamaldehyd, dále linalool, eugenol a karyofylen. Silice se získávají extrakcí z listů a kůry. Vysoký obsah cinnamaldehydu se nachází v kůře, naopak v listech se nejvíce vyskytuje eugenol. Olej získaný z této rostliny vykazuje protiplísňové, antivirové a antibakteriální účinky. Zejména přítomný cinnamaldehyd účinkuje jako inhibitor kvasinek (*C. albicans*), bakterií a plísní [69,70,71,72].



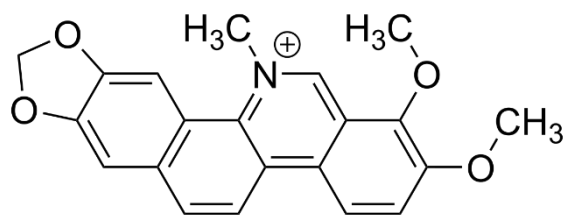
Obr. 16 Kůra z *Cinnamomum verum* (vlevo) a molekula cinnamaldehydu (vpravo) [73,74].

3.1.1.3. Silice z *Thymus vulgaris*

U rostlinných výtažku z tymiánu byl prokázán baktericidní a antifungální účinek na mikroorganismy patogenní pro člověka. Tyto účinky vykazují zejména složky jako thymol, karvakrol a také linalool. Jedná se o terpeny, jenž se naváží na aminové a hydroxylaminové skupiny proteinů membrány, což vede ke změně její permeability a ke smrti buňky. Různé studie prokázaly působení tymiánové silice proti patogenním houbám *C. albicans* a proti toxigennímu *A. flavus*, u kterého inhibovala i produkci aflatoxinů [75,76].

3.1.1.4. Alkaloid z *Chelidonium majus*

Vlaštovičnick větší (*Chelidonium majus*) pochází z Evropy a Asie (Obr. 17). Hlavními izolovanými farmakologickými složkami jsou isocholinové alkaloidy chelerythrin, berberin, chelidonin, koptisin a sanguinarin, které vykazují antifungální účinek. Deriváty těchto alkaloidů se vyznačují cytostatickými účinky. Při lokální aplikaci má dráždivé účinky, při perorálním podání způsobuje zvracení a průjem, při vyšších dávkách dochází k centrální paralýze a ke smrti [77,78,79,80].



Obr. 17 Listy a květ *Chelidonium majus* (vlevo) a chemická struktura chelerythrinu (vpravo) [81,82].

3.1.1.5. *Cocos nucifera*

Palma, neboli kokosovník obecný, pochází z Indonésie, v současnosti se pěstuje ve všech tropických oblastech světa. Nejdůležitější částí této rostliny je kokosový ořech (plod), potřebný pro výrobu kokosového oleje. Tento olej má antimikrobiální, antifungální a antibakteriální účinky, a to především díky přítomnosti velmi významných složek, jako je kyselina kaprylová, kyselina kaprinová a kyselina laurová [83].

Byla provedena studie antifungální aktivity extrahovaného kokosového oleje ze skořápek, proti růstu některých mikroorganismů jako jsou *E. floccosum*, *A. niger*, *Penicillium*, *M. canis*, *C. albicans* a *A. flavus*. Extrakce kokosových skořápek byla provedena různými druhy rozpouštědel (acetone, ethanolem, chloroformem, petroletherem a vodným roztokem). Tyto extrakty byly porovnány s ketokonazolem. Při zvýšení koncentrace extrahovaného produktu docházelo ke zvětšení zóny inhibice. Největší inhibiční aktivitu vykazoval petroletherový a ethanolový extrakt proti *E. floccosum* a *C. albicans* [84].

3.1.1.6. Flavonoidy z propolisu

Propolis je přírodní pryskyřičný produkt produkovaný včelami (*Apis mellifera*). Včely ho používají pro jeho významné antimikrobiální a antifungální účinky na ochranu úlu před chorobami. Propolis obsahuje převážně fenolické sloučeniny, flavonoidy a terpeny, například hydrochinony, kyselinu kávovou a kvercetin. Některé studie naznačují, že přítomnost významných složek jako pinocembrin, pinobanksin, chrysin a estery kyseliny ferulové zodpovídají za antifungální aktivitu [70,85].

3.1.2. Doplnky stravy

Doplňky stravy představují skvělý zdroj protiplísňových sloučenin. Využívají se jako podpůrné produkty při léčbě plísňových onemocnění. Obsahují přírodní látky s antifungálním účinkem, řadu probiotických kultur obnovujících přírodní mikroflóru či lyzáty (neškodné části získané z mikroorganismů z nejčastějších původců mykóz). Dokážou obnovit rovnováhu narušenou užíváním antibiotik, perorální antikoncepcí a alkoholem. Například přípravek FemiVaxinum Neo se skládá z mikrobiálního lyzátu, který podporuje vaginální mikroflóru a vytváří zdravější poševní prostředí [86,87,88]. Jeho složení je zobrazeno v Tab. 10.

Tabulka 10 Složení mikrobiálního lyzátu v jedné tobolce

Složky lyzátu	Množství v jedné tobolce (mg)
<i>C. albicans lysatum</i>	1,5
<i>C. glabrata lysatum</i>	0,8
<i>C. tropicalis lysatum</i>	0,2
<i>C. krusei lysatum</i>	0,2
<i>Gardnerella vaginalis lysatum</i>	0,2
<i>Propionibacterium acnes lysatum</i>	2,1

Přípravek Candix obsahuje v jedné kapsli velké množství kyseliny kaprylové (200 mg), dále *Lactobacillus acidophilus* (2×10^9 CFU) a kyselinu askorbovou (80 mg), kdy vitamin C zvyšuje obranyschopnost a pomáhá chránit buňky před oxidativním stresem. Dále Candida Support je složen z extraktů řady významných bylin s antifungální aktivitou (Ořešák černý, oreganový olej, biotin a kyselinu kaprylovou). Podporuje zdravou rovnováhu střevní mikroflóry. Tab. 11. uvádí množství jednotlivých antifungálních složek. V poslední řadě doplněk stravy Candistop obsahuje 7 probiotických kultur obnovujících přirozenou mikroflóru (*Lactobacillus (L.) casei*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium (B.) breve*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *L. bulgaricus*), dále extrakt z grapefruitových semínek a z česneku s inhibičním účinkem proti růstu mikromycet [89,90,91].

Tabulka 11 Složení přípravku Candida Support.

Významné antifungální složky	Množství v jedné dávce (mg)
Biotin	15
Kyselina kaprylová	500
Oreganový olej	200
Ořešák černý	300

3.2. Antimykotika

Antimykotika lze definovat za léky obsažené v různých lékových formách (Tab.12), používané k léčbě mykóz. K velkému rozvoji těchto léčiv došlo v 60. letech 20. století. Vyskytují se jako přírodní (polyenová antibiotika a griseofulvin), syntetické (azolové deriváty, allylaminové deriváty a flucytosin), ale i polysyntetické sloučeniny (echinokandiny). Většina antifungálních látek inhibuje syntézu ergosterolu v buněčné membráně houby [92,93].

Existuje mnoho kritérií, podle kterých se antimykotika dělí, kdy nejběžnější bývá dělení podle chemické struktury (Tab. 13). Dále se mohou dělit podle účinku, a to na fungicidní nebo fungistatický. V poslední řadě literatura uvádí klasifikaci antimykotik dle aplikace: lokální a systémová. Níže jsou jednotlivé druhy antimykotik podrobněji popsány [92,93].

Tabulka 12 Přehled vybraných antimykotik a jejich léková forma

Antimykotika		Léková forma		Obchodní název
		Lokální	Systémová	
polyeny	Natamycin	krém, vaginální (vag.) globule, mast	—	Pimafucin
	Nystatin	mast, vag. mast globule/tobolky	—	Fungicid
	Amfotericinu B	—	infuzní roztok (i. r.)	Amphocil
azoly	Bifonazol	krém, mast, roztok	—	Mycospor, Canespor
	Ketokonazol	krém, šampón	tablety	Nizoral
	Klotrimazol	krém, sprej, pasta, roztok, vag. tablety a krém	—	Canesten, Aknecolor, Candimax
	Mikonazol	vaginální tablety	—	Klion D
	Flukonazol	prášek, sirup	kapsule, i. r.	Diflucan
	Itrakonazol	perorální roztok	i. r.	Sporanox
	allylaminy	Terbinafin	krém, sprej, gel	tablety
Naftifin		krém, roztok	-	Exoderil

Tabulka 13 Dělení antimykotik podle chemické struktury

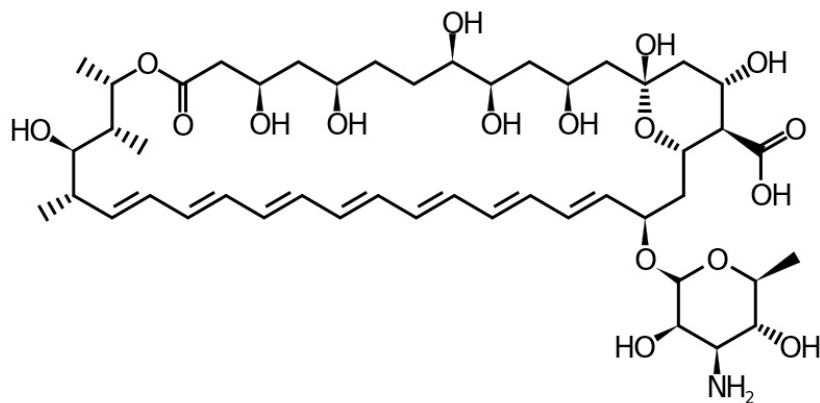
Antimykotikum	Mechanismus účinku	Zástupci
Polyenová antimykotika	vazba na ergosterol buněčné stěny mikromycet	amfotericin B, nystatin, natamycin
Azolová antimykotika	inhibice cytochromu P450	mikonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol
Echinokandiny	inhibice syntézy 1,3- β -D-glukanu	kaspofungin
Antimetaboly	inhibice syntézy nukleových kyselin	flucytosin
Allylaminy	inhibice skvalenperoxidázi	terbinafin, naftifinen

3.2.1. Polyenová antimykotika

Polyeny se řadí k nejstarším a nejdéle používaným systémovým antimykotikům. Jejich mechanismus účinku spočívá v navázání molekuly antimykotika na ergosterol, základní složku buněčné stěny mikroskopických hub. Po navázání dojde k poškození permeability membrány, následnému vzniku pórů a ke ztrátě iontů a nízkomolekulárních látek, tímto nastane buněčná smrt. Léčiva jsou podávána lokálně, ve formě: mastí, krémů, vaginálních globulí a kapslí (nystatin a natamycin) nebo v případě amfotericinu B intravenózně jako systémová antimykotika [94].

3.2.1.1. Amfotericin B

Dosud nejúčinnější systémové polyenové antimykotikum (Obr. 18) s fungicidním účinkem, produkované bakterií *Streptomyces nodosus*, jenž bylo poprvé izolováno v roce 1956. Amfotericin B vykazuje široké spektrum účinku, v koncentraci 0,1-0,8 $\mu\text{g/ml}$ inhibuje *in vitro* *C. albicans* i některé druhy non-*albicans*, *Cryptococcus neoformans* a rod *Aspergillus*. Dokonce se používá jako jediné antimykotikum působící proti zygomycetám a protozoím. Amfotericin B se primárně volí u aspergilové infekce a mukormykózy. Nicméně po dlouhodobé léčbě se zjistilo, že kmeny *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* vykazují rezistenci proti amfotericinu B. [95,96,97].



Obr. 18 Struktura amfotericinu B [98].

Amfotericin B se podává intravenózně, jelikož při perorálním podání není schopen se vstřebat. Při užívání mohou nastat akutní nebo chronické účinky. K akutním nežádoucím účinkům, které se mohou projevit již během infuze, patří horečka, třesavka, bolesti hlavy, svalstva a kloubů, nauzea a alergické reakce. Z chronických projevů se může jednat zejména o nefrotoxicitu s následnou elektrolytovou dysbalancí, vazokonstrikce kapilár glomerulu a tepen, neurotoxita a normocytární normochromní anémie, která vzniká v důsledku blokování tvorby erythropoetinu. Dočasným snížením dávky nebo podáváním kyseliny acetylosalicylové či antihistaminik, můžeme předejít těmto nežádoucím účinkům nebo je zmírnit. Aby se zamezilo zejména nefrotoxicitě, používá se amfotericin B vázaný na lipidovém nosiči: liposomální amfotericin B, lipidový komplex nebo koloidní disperze. Tyto lipidové typy představují řadu výhod oproti normálnímu amfotericinu B [54,93,94,99].

3.2.1.2. Nystatin a natamycin

Nystatin i natamycin jsou lokální polyenová antimykotika produkovaná kmenem *Streptomyces*. Nystatin se připravuje fermentací z kmene *Streptomyces noursei*. Používá se především proti infekcím vyvolaných rodem *Candida*. Velmi dobře působí i na rod *Aspergillus*. Nevstřebává se z kůže, sliznic ani GIT, proto se především indikuje u povrchových mykóz způsobených kvasinkami (anální a interdigitální kandidózy), a jako doplněk léčby tabletami při vaginální kandidóze. Má vzhled světle žlutého až žlutého krystalického prášku. Je mírně hygroskopický a citlivý na světlo. Kvůli vysokým nežádoucím účinkům, byly stejně jako u amfotericinu vyvinuty liposomální lékové formy s výrazně nižšími nežádoucími účinky [94,97,100,101].

Natamycin má vzhled bílého až krémového prášku. Jedná se o lokální polyenové antimykotikum, získané z aktinomycety *Streptomyces natalensis*. Aktivně působí při velmi nízkých koncentracích. K inhibici růstů u plísní dochází při koncentraci 0,5-6 $\mu\text{m/ml}$, u

kvasinek 1-5 $\mu\text{m/ml}$. Působí proti kvasinkám, plísním i dermatofytům. Používá se k terapii kandidózy ústních koutků, kandidové vulvitidy a u onychomýkóz [97,102,103,104].

3.2.2. Azolová antimykotika

Azolová léčiva se užívají již od 70. let 20. století k léčbě lokálních a systémových mykóz, především u kandidových infekcí. Jsou to syntetické, fungistatické až fungicidní látky. Mechanismus účinku je pro systémové i lokální azoly shodný, dochází k inhibici fungálního enzymu cytochromu P450, na kterém závisí katalytická aktivita enzymu C-14- α -demetylasy. V důsledku této inhibice nedojde k přeměně lanosterolu na ergosterol, membrána ztrácí svoji funkci a zvýší se její permeabilita. Léčbu systémových mykóz komplikuje řada interakcí azolových antimykotik s jinými látkami, z důvodu metabolismu v játrech v mikrosomálním systému s cytochromem P450 subtypu 3A4 [47,92,97,105]. Azoly dělíme na:

- Deriváty imidazolu-mikonazol, ketokonazol a klotrimazol
- Deriváty triazolu-flukonazol, vorikonazol a itrakonazol

3.2.2.1. Mikonazol

Jedná se o nejstarší azolové antimykotikum, používané více jak 30 let k povrchovým infekcím. Kvůli jeho nežádoucím účinkům, jako jsou GIT potíže či alergické reakce, vyskytující se již během aplikace, docházelo k postupnému nahrazování modernějšími léčivy (například flukonazol a itrakonazol). Mikonazol má poměrně široké spektrum účinku, působí na candidy, kryptokoky a na některé aspergily. Dříve se především indikoval při systémové kandidóze, kryptokokóze, dermatomykóze a vaginální kandidóze. Vykazuje vysokou vazbu na bílkoviny (váže se z více jak 90 %), snadno proniká do zánětlivých ložisek, ale neproniká do mozkomíšního moku. K jeho metabolismu dochází v játrech, kdy 80-85 % léčiva se vylučuje v neúčinné formě stolicí a kolem 15-20 % metabolitů močí [47,101,102].

Syntéza mikonazolu (Schéma 1) vychází z 2,4-dichloracetofenonu (1), který se reakcí s bromem převede na fenacylbromid (2). Bromidem se (2) alkyluje na fenacylimidazol (3) a ten se redukcí s tetrahydridoboritanem sodným zredukuje na alkohol (4). Pomocí Wilkinsovi syntézy se alkohol převede reakcí s alkylhalogenidem (5) na mikonazol [106].

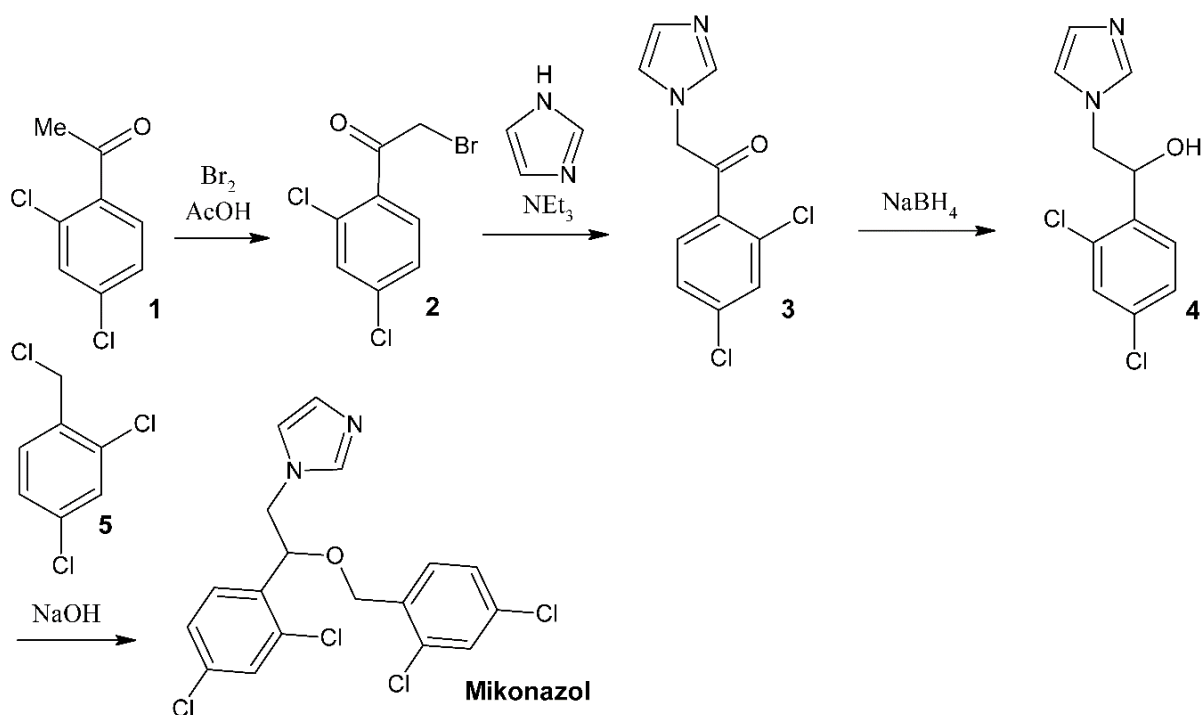


Schéma 1 Syntéza mikonazolu [106].

3.2.2.2. Ketokonazol

Jedná se o systémové, širokospektré syntetické antifungální léčivo, podobající se svým fungistatickým účinkem mikonazolu. Stejně jako mikonazol, bývá kvůli svým nežádoucím účinkům nahrazován novějšími léčivy (flukonazol a itrakonazol). Nežádoucí účinky ketokonazolu (KTZ) závisí zejména na dávce. K nejčastějším patří poruchy GIT - dyspepsie, nauzea a bolest břicha. Při perorálním podávání vysokých dávek (400 mg/den) vykazuje hepatotoxický účinek, a proto od roku 2013 má tato forma pozastavenou registraci v celé Evropské unii [54,96,97,107].

Ve formě šamponu, mastí či krému se indikuje k lokální terapii infekce kůže, vlasů a nehtů vyvolané dermatofyty nebo kvasinkami (pityriasis versicolor, chronická mukokutánní kandidóza a onychomykóza). Toto léčivo nelze použít k léčbě mykotické meningitidy, protože neprostupuje do mozkomíšního moku. KTZ lze považovat za slabou bázi, která se dobře rozpouští v kyselém pH, a proto se nejlépe vstřebává v žaludeční sliznici. Z 98 % se váže na bílkoviny, méně jak 5 % se vyloučí do moči. K jeho inaktivaci dochází v játrech [94,96,97].

Syntéza KTZ (Schéma 2) spočívá v reakci 2,4-dichloracetofenonu (6) s glycerolem za katalýzy *p*-toluensulfonovou kyselinou, dále dochází se směsí 1-butanolu s benzenem k azeotropickému odstraňování vody a vzniku ketalu (7). Ten se bromací a benzoylací hydroxymethylové skupiny převede na bromderivát, který reakcí s imidazolem a následnou bazickou hydrolyzou benzoátu poskytne primární alkohol (8). Dále po převedení primárního

alkoholu (8) na methansulfonát reaguje v přítomnosti báze s 1-acetyl-4-(4-hydroxyfenyl)piperazinem za vzniku ketokonazolu [106].

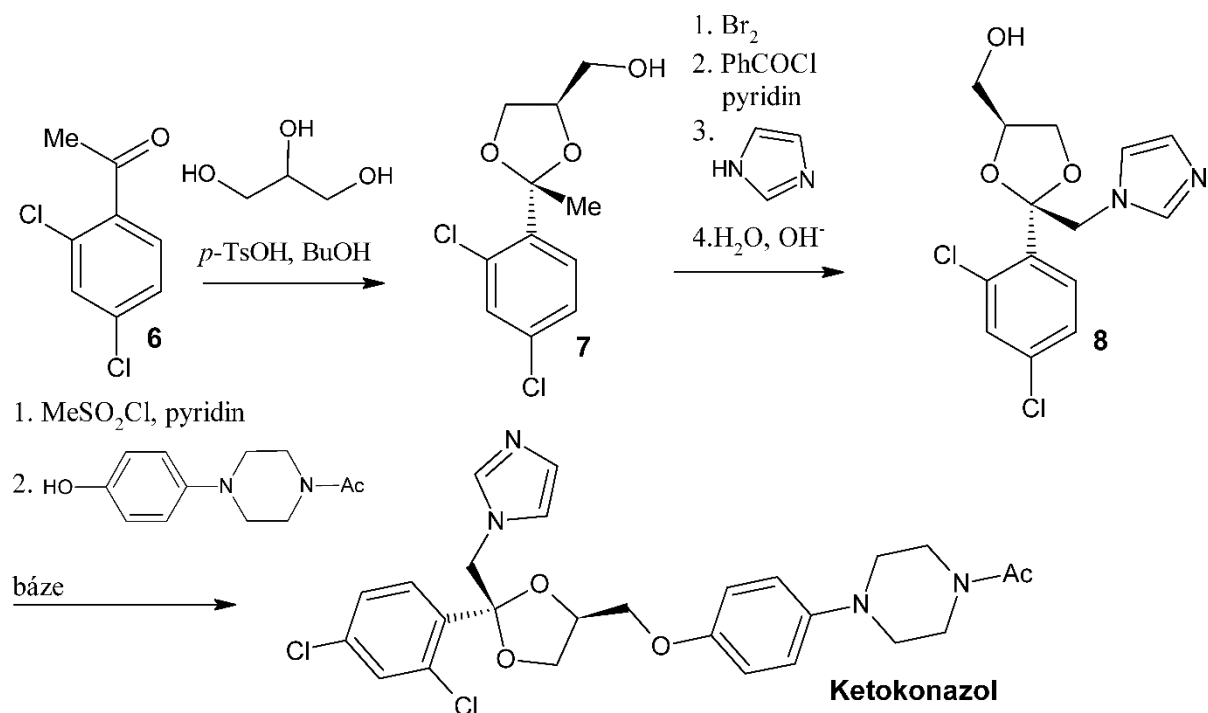


Schéma 2 Syntéza ketokonazolu [106].

3.2.2.3. Flukonazol

Jedná se o systémové triazolové antifungální léčivo, které je dobře rozpustné ve vodě. Může se podávat jak perorálně, tak i parenterálně. Jeho spektrum antifungálního účinku zahrnuje rod *Candida*, *Cryptococcus*, dermatofyta (rody *Trichophyton* a *Microsporum*). Jako rezistentní patogeny vůči flukonazolu (FLU) se ukázaly kmeny *C. krusei* a *C. glabrata*. Po podávání způsobuje bolest hlavy, zvracení průjem a vyrážku. U lidí s AIDS se mnohem častěji vyskytují kožní problémy, může se objevovat i Stevensův-Johnsonův syndrom. FLU v dávce 200-400 mg/den se většinou indikuje k léčbě orofaryngeální kandidózy, kryptokokové meningitidy, mukokutánní kandidózy. Z 11 % se váže na bílkoviny, dobře proniká do všech tkání a tělesných tekutin, včetně mozkomíšního moku. Z 80 % se vylučuje v aktivní formě močí [54,94,96,97].

Při syntéze FLU (Schéma 3) dochází k reakci 1,3-difluorbenzenu (9) s butyllithiem za vzniku 2,4-difluorfenyllithia a jeho adicí na 1,3-dichloroaceton poskytne 1,3-dichloro-2-(2,4-

difluorfenyl)-2-propanol (10). Tento substituovaný propanol reaguje v přítomnosti báze se dvěma molekulami 1H-1,2,4-triazolu za vzniku flukonazolu [106].

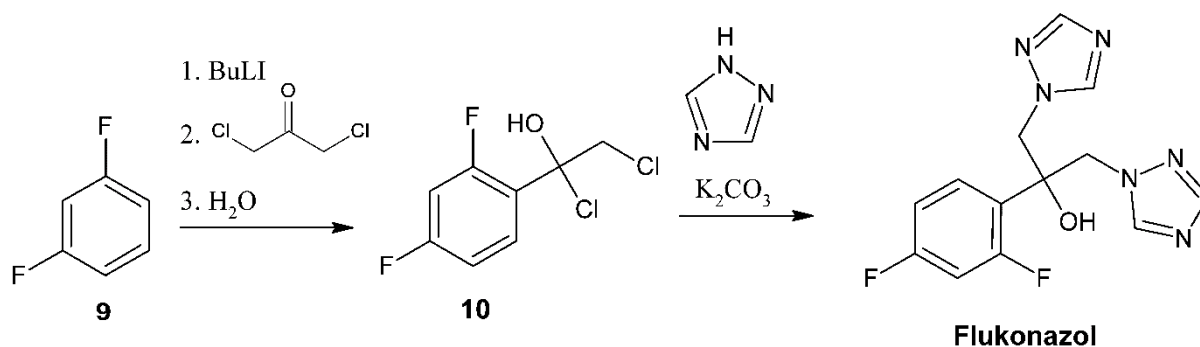
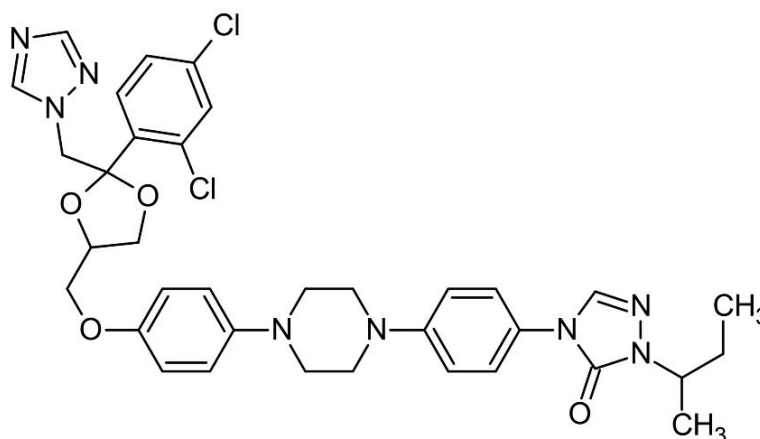


Schéma 3 Syntéza flukonazolu [106].

3.2.2.4. Itrakonazol

Triazolové antimykotikum (Obr. 19) používané perorálně nebo parenterálně u systémových infekcí vykazuje fungicidní účinek proti rodu *Aspergillus*, *Candida* včetně *C. crusei*, *C. albicans*. Za velmi citlivé kmeny lze považovat *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, atd. Naopak rezistentní jsou plísně *Zygomycetes* a *Mucor*. Indikuje se při dermatomykóze, onychomykóze a aspergilóze. Pro absorpci perorální formy je velmi důležitá přítomnost žaludeční šťávy v žaludku, a proto se musí užívat po jídle. Tuto nevýhodu odstraňuje nová intravenózní léková forma, která využívá β -cyklodextrin jako molekulu pro zvýšení rozpustnosti. Oproti tomu itrakonazol v suspenzi se užívá nalačno [54,94].



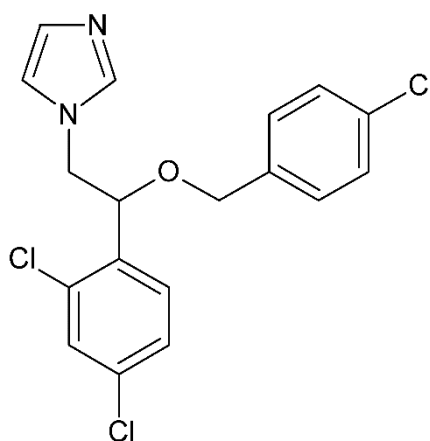
Obr. 19 Struktura itrakonazolu [108].

3.2.2.5. Vorikonazol

Vorikonazol se označuje za nejnovější systémové triazolové antifungální léčivo 2. generace. Podává se ve formě tablet, tekuté suspenze nebo intravenózně. Má široké spektrum účinku proti rodu *Candida* včetně *C. krusei* a *C. glabrata*, které vykazují rezistenci vůči flukonazolu, dále působí proti *Cryptococcus neoformans*, rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Používá se k léčbě invazivní aspergilózy, orofaryngeální kandidózy. Vorikonazol proniká do tělesných tekutin a tkání včetně plicní tkáně. K hlavním nežádoucím účinkům patří poruchy zraku, dále kožní reakce, zvracení a zvýšení jaterních enzymů. Při dlouhodobém užívání docházelo ke vzniku alopecie, kožní malignity u pacientů s transplantací plic a neuropatie [54,109,110,111].

3.2.2.6. Ekonazol

Ekonazol je azolové antifungální léčivo (Obr.20). Tato aktivní látka působí na proliferující houby, kvasinky a plísně, ale není účinná proti sporám. Používá se k léčbě povrchových mykotických nemocí, dále jako doplňková léčba při perorální antimykotické terapii onychomykóz a paronychie. Při lokální léčbě tímto antimykotikem je velmi důležitý prostup terapeutické dávky k cílové vrstvě kůže. Kvůli špatné rozpustnosti ekonazolu ve vodě, která omezuje jeho antifungální účinek, byly pro lokální léčbu oční plísňové keratitidy vytvořeny hydrogely solubilizací dusičnanů tohoto léčiva cyklodextrinem (CD). Při lokální aplikaci 1 % ekonazolového krému, zůstává 90 % aplikované dávky na povrchu kůže po dobu 0,5-18 hodin. Více jak 98 % léčiva se váže na bílkoviny a metabolizuje se na více než 20 metabolitů. Méně než 1 % lokální dávky se vylučuje stolicí nebo močí [112,113,114,115].



Obr. 20 Chemická struktura ekonazolu [106].

3.2.2.7. Posakonazol

Posakonazol lze zařadit také mezi systémové lipofilní triazolové antimykotikum 2. generace s vysokým spektrem účinku proti kvasinkám, plísním a dimorfním houbám (*Histoplasma spp.*, *Blastomyces spp.*). Indikuje se k léčbě invazivní aspergilózy, fuzariózy a kokcidiomykózy u dospělých lidí, kteří jsou rezistentní vůči jiným antimykotikům. Z více jak 95 % se posakonazol váže na bílkoviny. Méně jak 30 % látky se metabolizuje v játrech glukuronidací nebo oxidativními metabolity a zhruba 75 % se vylučuje stolicí. K nežádoucím účinkům patří bolest břicha a hlavy, průjem, nevolnost, zvracení, nespavost, vyrážka, hypertenze a neutropenie [116,117,118].

3.2.2.8. Klotrimazol

Klotrimazol se používá jako lokální širokospektré antimykotikum k léčbě dermatologických (keratomykóza a dermatofytóza) a gynekologických infekcí. Účinkuje proti *M. furfur* a *T. vaginalis*. Klotrimazol způsobuje vysokou toxicitu indukci jaterních enzymů, a proto se pro systémovou léčbu nepoužívá. Špatně se rozpouští ve vodě a tím snižuje klinické použití i antifungální účinek. Pro zvýšení rozpustnosti ve vodě se používají dendrimery. Při léčbě klotrimazol prostupuje do nejnižších vrstev pokožky v dostatečně účinné dávce. Po resorpci se metabolizuje v játrech na inaktivní hydroxyderiváty. K vylučování dochází ze 2-15 % močí a z více jak 60 % stolicí [46,97,119,120].

Syntéza klotrimazolu (Schéma 4) spočívá v převedení *o*-chlortoluenu (11) radikálovou chlorací na 2-chlor-1-(trichlormethyl)benzen (12). Ten dvojnásobnou Friedel-Craftsovou alkylací s benzenem v přítomnosti bezvodého chloridu hlinitého poskytne derivát tritylchloridu (13), který se v přítomnosti triethylaminu alkyluje na imidazol za vzniku klotrimazolu [106].

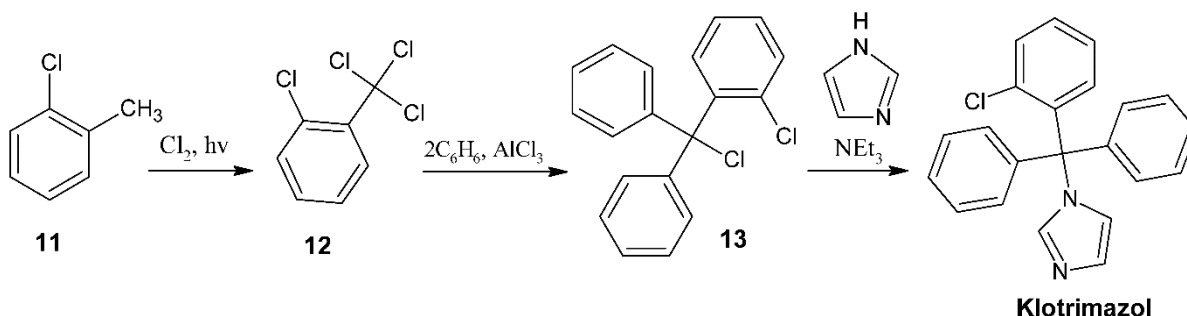


Schéma 4 Syntéza klotrimazolu [106].

3.2.3. Antimetabolity

Jako jediným zástupcem této skupiny je flucytosin. Jedná se o systémové, perorální, úzkospektré, antifungální léčivo. Z chemického hlediska jde o fluorovanou pyrimidinovou bázi, poprvé syntetizovanou v roce 1975 jako cytostatikum. Samotný flucytosin (5-FC) nemá antifungální aktivitu. Tuto aktivitu získá po absorpci buňkami hub, kde je přeměněn na aktivní metabolit 5-fluorouracil (5-FU), který je vestavěn do ribozomální a transferové ribonukleové kyseliny, tím dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin. Houby, které neobsahují cytosindeaminázu, nejsou citlivé na 5-FC, protože nedojde k přeměně 5-FC na 5-FU [94,97,121,122].

Hlavním problémem je vznik rezistence, proto se flucytosin používá v kombinaci s jinými antifungálními látkami, např. s amfotericinem B k léčení systémových mykóz (kryptokoková meningitida). Své samostatné uplatnění nachází jen výjimečně, a to při chromomykóze a ke krátkodobé léčbě mykóz močových cest. Působí na infekce způsobené kandidami, kryptokoky a v kombinaci působí i proti aspergilům. 5-FC je hydrofilní, méně než 10 % se váže na proteiny, dobře se vstřebává do všech tkání a tělesných tekutin včetně likvoru. Ze 75-95 % se vylučuje do moči. Biologický poločas rozpadu se pohybuje okolo 4 hodin, při poruše funkce ledvin je poločas rozpadu prodloužen. Nežádoucí účinky závisí na koncentraci 5-FC a je možné se jim vyhnout např. vysazením léků nebo snížením dávky. K závažným nežádoucím účinkům patří hepatotoxicita a granulocytopenie [97,121,122].

3.2.4. Echinokandiny

Echinokandiny se řadí mezi nejnovější skupinu antimykotik, která byla počátkem 21. století uvedena na trh. Mechanismus účinku spočívá v inhibici β -(1,3)-glukan syntézy, enzymu potřebného pro syntézu β -D-(1,3)-glukanu v buněčné stěně plísní. Tím dochází k osmotické nestabilitě a lýze buňky. Echinokandiny jsou systémová léčiva s poměrně širokým spektrem účinku. Používají se k léčbě systémových mykóz, způsobených především kandidami *non-albicans*. Jsou účinné i na cysty *P. jiroveci*. Na kandidy v terapeutické dávce působí fungicidně [37,92,122].

3.2.4.1. Kaspofungin

Kaspofungin je známo jako širokospektré intravenózní antimykotikum působící proti kandidám a aspergilům. Jedná se o velice dobře snášené léčivo s minimálními nežádoucími účinky jako jsou horečka, podráždění v místě infuze, bolest hlavy nebo nevolnost. V denní dávce 50-70 mg se používá k léčbě invazivních kandidóz a aspergilóz. Metabolismus probíhá

v játrech, avšak mimo cytochromový systém P450. Není vylučován močí. Z 96,5 % se váže na bílkoviny [123,124,125].

4. Analýza léčiv

V dnešní době je kladen velký důraz na kvalitu a účinnost léků. Hlavním cílem je chránit zdraví spotřebitele, tedy člověka. Analýza léčiv představuje tedy důležitý nástroj pro kontrolu kvality léčiv. K analýze existuje bezpočet metod, a dále se nové vyvíjí tím, jak je kladen velký důraz na bezpečnost nových léčiv. Zákonem dané postupy přípravy farmaceutických vzorků k analýze a jejich vlastní kvantifikace, je popsána přehledně v lékopise, což je základní farmaceutické dílo normativního charakteru, které přispívá k zajištění bezpečnosti, účinnosti a jakosti léčiv [126].

Výběr analytické metody se odvíjí od povahy léku (formy) a fyzikálně-chemických vlastností léčiva a aktivní látky (droga). Dále je nutné si uvědomit, že lék většinou obsahuje řadu podpůrných látek (pojiva, plnidla, vlhčiva a kluzné látky), jenž je třeba před vlastní analýzou oddělit od analytu. Z tohoto důvodu dominují ve farmaceutické analýze chromatografické metody (plynová chromatografie nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie; HPLC). Pokud stanovovaná složka obsahuje nečistoty, lze použít jednoduché metody k jejich odstranění (extrakce, adsorpce, destilace, a krystalizace) [126].

V analýze léčiv se většinou uplatňují zkoušky totožnosti (kvalita), které zjišťují, zda se vůbec jedná o tu danou léčivou látku, a také stanovení jejího množství (kvantita), popřípadě množství více účinných složek (simultánní stanovení). Velmi důležitým faktorem je technologické zpracování léku, od kterého se odvíjí jeho stabilita a čistota. Vzniklá forma ovlivňuje rychlost uvolňování (intenzitu vstřebávání), jenž má zásadní vliv na rychlost nástupu účinku léčivého přípravku. Dalším parametrem při hodnocení léčiv je zkouška stability léku či účinné látky, jenž nám podává informace o působení fyzikálně-chemických vlivů (teplota, světlo a vlhkost), na kvalitu a účinnost léčiva [126].

4.1. Příprava léčiv k analýze

Léčiva jsou různými technologickými procesy zpracována do určitých lékových forem (krémy, tablety, šampony, kapky, injekce, atd). Pro každou tuto formu existuje charakteristický postup pro její přípravu k analýze. Některá léčiva se mohou stanovovat přímo, u jiných je naopak potřeba postupnými kroky získat vhodný (reprezentativní) vzorek k analýze [126].

U antimykotik ve formě tablet, je důležité nejprve léčivo rozmělnit na prášek a následně oddělit od matrice na základě různé rozpustnosti (polarity) pomocí vytřepání (extrakce) do vhodného rozpouštědla (HCl, voda, methanol, dimethylformamid (DMF) a acetonitril). Některá

antimykotika se rozpouští ve vodě (flukonazol), jiná ke svému rozpuštění potřebují kyselější (itraconazol) či zásaditější pH. Po vytřepání se oddělené pomocné látky odstraní filtrací. Takto připravený vzorek se může podrobit analýze [127].

Zpracování krému spočívá opět v rozpuštění léčiva ve vhodném rozpouštědle. Následně se tento roztok podrobí působení ultrazvuku (sonizaci), aby došlo k jeho homogenizaci a v poslední fázi se roztok zfiltruje na konečný čirý filtrát, jenž se může analyzovat. Jako pracovní média se pro stanovení antimykotik používají pufrы (fosfátový, acetátový, amonný a Britton-Robinsonův pufr; BRB), jejichž složení je popsáno v Tab. 14. Jedná se o směsi slabých kyselin a jejich konjugovaných zásad nebo směsi slabých zásad a jejich konjugovaných kyselin), které po přidání kyseliny nebo zásady udržují stabilní pH [128,129].

Tabulka 14 Složení jednotlivých pufrů

Pufr	Kyselina	Zásada
Fosfátový	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4
Acetátový	CH_3COOH	CH_3COONa
Amonný pufr	NH_4Cl	NaNH_4
Citrátový pufr	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Britton-Robinsonův pufr	$\text{CH}_3\text{COOH}, \text{H}_3\text{PO}_4, \text{H}_3\text{BO}_3$	NaOH

Léčiva mohou být stanovována i z biologických tekutin (sérum, moč). Proto abychom mohli léčiva z těchto tekutin stanovit, přidává se ke vzorkům ethanol a ZnSO_4 . Následně se nechají centrifugovat při vhodných otáčkách (13 000 ot. po dobu asi 15 min), kdy dojde k oddělení čiré tekutiny, ke které se přidá vhodný pufr (většinou BRB pufr) a takto připravený vzorek se může analyzovat [128].

4.2. Elektroanalytické metody v analýze antimykotik

Elektroanalytické metody lze chápat jako souhrn analytických protokolů sloužící k identifikaci (kvalita) a stanovení množství analytu (kvantifikaci), jenž využívá interakce stanovované látky na rozhraní kapalina (elektrolyt) a pevná látka (elektroda). Elektrochemické techniky využívané v elektroanalýze lze rozdělit na bezproudové (potenciometrie, konduktometrie) a za průchodu elektrického proudu (polarografie, voltametrie, amperometrie, coulometrie). Z těchto všech zmíněných metod našla voltametrie své nejširší uplatnění v analýze antimykotik, jenž využívá anodické oxidace či katodické redukce látek s antimykotickými účinky. Jelikož většina léčiv obsahuje často pouze jednu aktivní látku ve

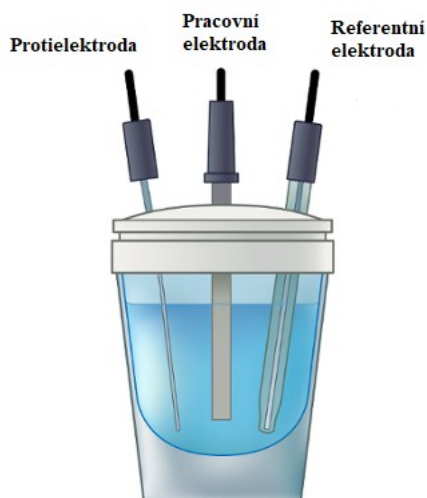
vysokém obsahu, nachází své uplatnění také průtokové metody s amperometrickou detekcí [130,131].

4.2.1. Voltametrie a polarografie v analýze antimykotik

V roce 1922 Jaroslav Heyrovský publikoval první záznam o polarografii s názvem „*Elektrolýza se rtuťovou kapkovou katodou*” a za objev této analytické polarografické metody v roce 1959 získal Nobelovu cenu. Polarografie a od ní odvozená voltametrie představují elektrochemické metody založené na měření proudu, který prochází elektrochemickým článkem v závislosti na vloženém napětí, jenž se mění s časem. U amperometrické detekce probíhají elektrodové reakce za konstantního napětí. Zdrojem napětí, jenž rovněž zaznamenává příjem nebo ztrátu (spotřebu) elektronů (elektrického proudu) během elektrodové reakce je potenciostat/galvanostat [131].

Odpovídající měření se uskutečňují ve skleněné cele obsahující minimálně dvojici elektrod, jenž tvoří elektrolytický článek. V praxi se mnohem častěji používá tříelektrodové uspořádání (Obr. 21). Tento článek tvoří hlavní elektroda, tzv. pracovní (polarizovaná), referentní elektroda, jenž má konstantní potenciál po celou dobu měření nezávisle na složení pracovního média a pomocná elektroda neboli (protielektroda), tvořená ze skelného uhlíku nebo platinového plíšku či spirály. Ve srovnání s pracovní elektrodou má tato protielektroda výrazně větší povrch a není polarizovaná během experimentů [131].

Níže uvedené podkapitoly popisují přehled voltametrických metod, které byly doposud vyvinuty pro analýzu antimykotik. Důraz je především kladen na volbu pracovní elektrody, složení pracovního média (rozpouštědlo + elektrolyt), volby elektrochemické techniky a pracovní podmínky zvolené techniky. Výsledné analytické parametry voltametrických metod (lineární rozsah, limity detekce a kvantifikace, přesnost a správnost) vyvinutých pro jednotlivé aktivní látky, jsou taktéž zahrnuty [130].



Obr. 21 Schematické znázornění klasického tříelektrodového článku [132].

4.2.1.1. Pracovní elektrody

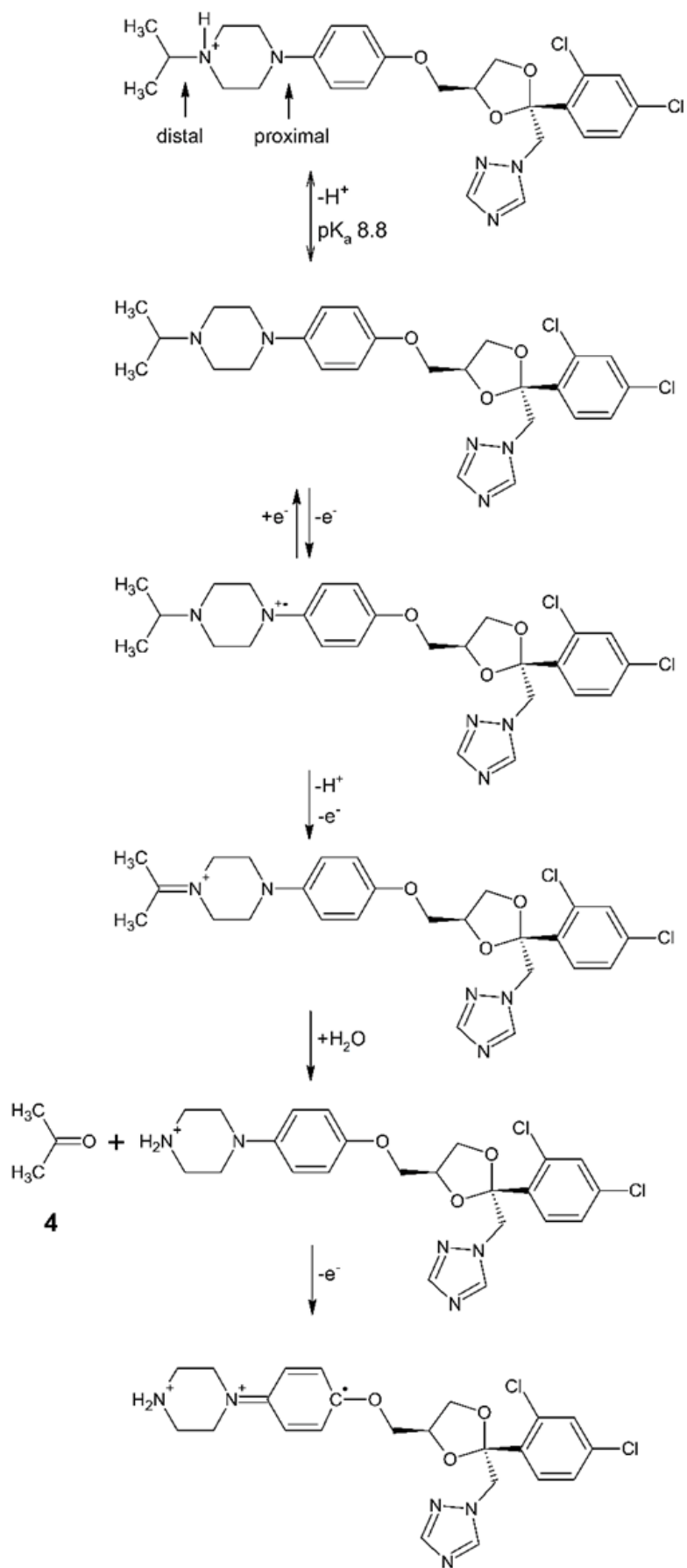
Jak lze spatřit v Tab. 15, antimykotika mohou podléhat jak katodické (záporně nabitá) redukci, tak i anodické (kladně nabitá pracovní elektroda) oxidaci. Na základě tohoto zjištění lze domyslet, jaké elektrodové materiály nacházejí své uplatnění při konstrukci pracovních elektrod. Z důvodu vysokého přepětí rtuti vůči vodíku, je možné antimykotika na bázi azolu redukovat na kapající rtuťové elektrodě (DME) či na méně toxické stříbrné amalgámové elektrodě. Na rozdíl tomu, uhlíkové materiály (skelný uhlík, grafit, uhlíková pasta, borem-dopovaný diamant a uhlíkové nanomateriály), našly své široké uplatnění v anodické oblasti z důvodu vysokého přepětí vůči kyslíku. Některá antimykotika, jak lze vydedukovat s předchozí kapitoly 4.2., vykazují nízkou rozpustnost ve vodě, a tudíž se rády adsorbují na nepolární povrchy. Tohoto jevu se využívá při vývoji velmi citlivých voltametrických metod, kdy se analyt zakoncentrovává (akumuluje) na povrchu (adsorpce) či do těla (extrakce) pracovní elektrody a následně elektrochemicky přemění (stripping) na více polární produkty, jež se uvolní do roztoku. Existence četných studií zabývajících se využitím borem-dopované diamantové elektrody (BDDE), jež přitahuje velký zájem díky svým jedinečným vlastnostem, a to minimální pasivitě povrchu elektrody, širokému potenciálovému oknu a nízké toxicitě [130,133].

4.2.1.2. Složení pracovního média

Většina antimykotik jsou ve vodě rozpustné (polární) organické sloučeniny, jež podléhají protonačním a deprotonačním reakcím. Z toho vyplývá, že výška píku (citlivost voltametrické metody) závisí na volbě pH pracovního média. Aby byly zaručeny konstantní pracovní podmínky během analýzy, tak se používají různé pufrы (viz. Tab. 15). Antimykotika, jež nejsou ve vodě rozpustná (nepolární) se analyzují v čistě organických rozpouštědlech či jejich směsí s vodou v přítomnosti surfaktantu (SDS a CTAB). Tyto surfaktanty vedou ke zvýšení solubilizace. Jako elektrolyty pro tyto specifické analýzy se uplatňuje chloristan lithný, tetrabutylamonium-hexafluorofosfát, etc [130,133].

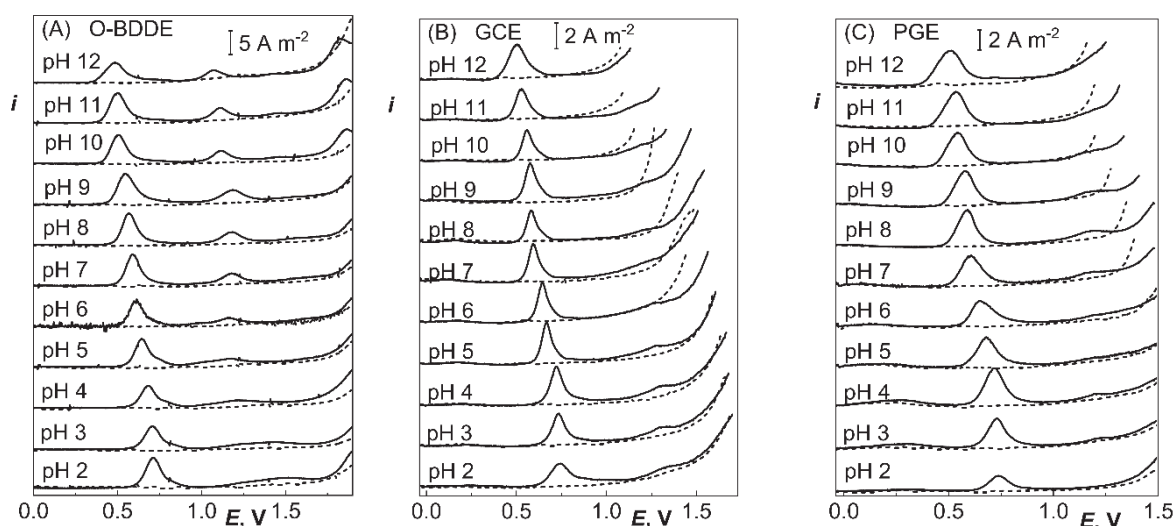
4.2.1.3. Elektrochemické techniky

K nejvyužívanějším voltametrickým technikám pro studium elektrodových reakcí antimykotik se řadí cyklická voltametrie (CV). Touto technikou je navíc možné studovat i následné reakce, kterých podléhají oxidační či redukční produkty. V poslední řadě lze využít CV pro studium kinetiky těchto elektrodových reakcí a určit počet elektronů a protonů, jak je zřejmé z Obr. 22 [130].



Obr. 22 Pravděpodobný mechanismus elektrodové reakce terkonazolu [130].

Z důvodu nízké citlivosti výše zmíněné CV se pulzní techniky spíše používají k samotnému kvantitativnímu stanovení aktivních látek v léčivech. Vkládání pulzů na napěťovou rampu totiž snižuje negativní efekt kapacitního proudu (I_c) potřebného na nabití pracovní elektrody. Mezi nejčastěji používané pulzní techniky v elektroanalýze antimykotik patří diferenčně pulzní voltametrie (DPV) a square-wave voltametrie (SWV). Obr. 23 znázorňuje voltametrické záznamy (voltamogramy) terkonazolu obdržené pro DPV na třech různých uhlíkových elektrodách (O-terminované BDDE, diskové elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) a tužkové uhlíkové elektrodě; PGE) v celé škále pH. Z použití těchto technik je možné dosáhnout citlivosti až na stopové množství aktivní látky v nemetabolizované formě (desítky nmol/l). Z tohoto důvodu lze předpokládat, že DPV nebo SWV (jejich stripping varianty) mohou být použitelné i v klinické analýze [127,130].



Obr. 23 Záznamy z DPV 1×10^{-4} mol/l terkonazolu na O-BDDE (a), GCE (b) a PGE (c) v BRB puřech o řůzném pH [130].

4.2.1.4. Příklady vyvinutých voltametrických metod v analýze antimykotik

Kromě standartních chromatografických metod byla vyvinuta celá řada elektroanalytických metod pro stanovení obsahu některých antimykotik v léčivech. Tyto postupy se vyznačují méně nákladnou instrumentací, nízkými náklady a kratší dobou analýzy. V praxi se nejvíce osvědčily pulzní voltametrické techniky v kombinaci s nemodifikovanou BDDE. V Tab. 15 lze postřehnout vývoj voltametrických metod vyvinutých pro azolová antimykotika, kdy nejprve dominovala katodická redukce na DME, a nyní se upřednostňuje anodická oxidace na uhlíkových elektrodách. Níže jsou popsány některé vybrané příklady stanovení antimykotik v řůzných formách léčiv [130].

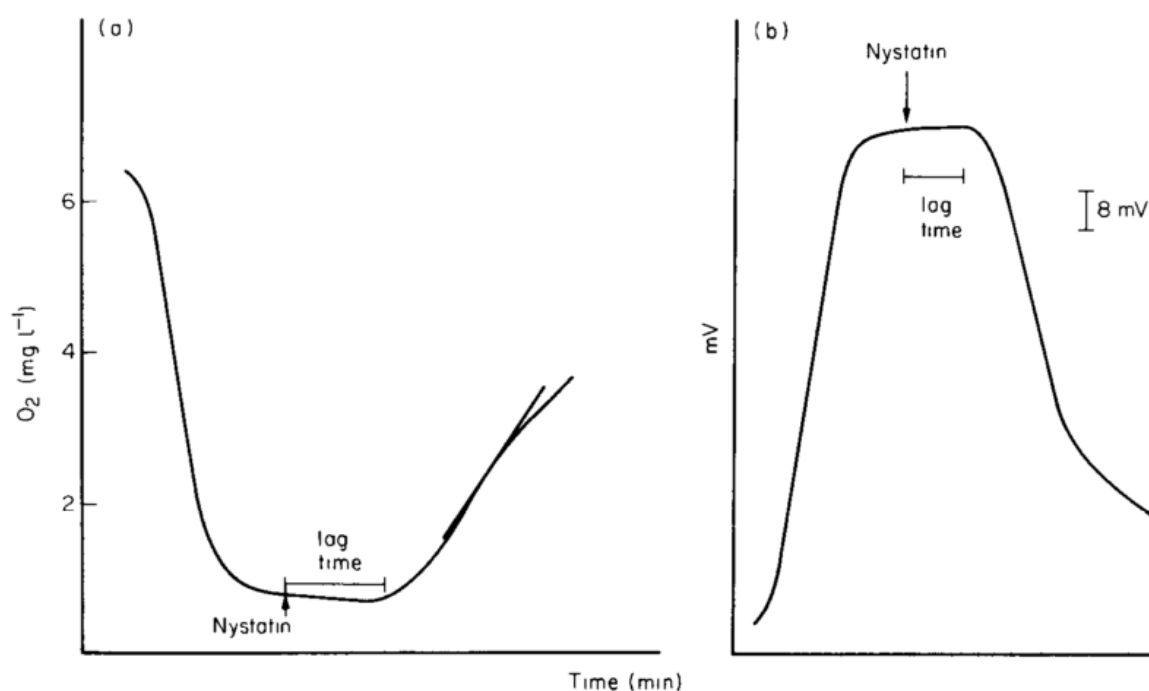
Tabulka 15 Přehled metod používaných ke stanovení antimykotik.

Aktivní látka	Senzor	E_p [V]	Technika	Pracovní medium	LOD [$\mu\text{mol/l}$]	Ref.
Itrakonazol	DME	-1,48	DPP	BRP, pH 7	0,1	[134]
Ketokonazol	DME	-1,56	DPP	BRP, pH 7	0,50	[134]
Ketokonazol	p-AgSAE	-1,46	SWV	BRP, pH 12	0,12	[135]
Ketokonazol	GCE	+0,54	CV, AdS-DPV	NH ₃ -NH ₄ Cl, pH 9	0,00004	[136]
Ketokonazol	GCE	+0,5	CV	PB, pH 3, 5, 7	—	[137]
Itrakonazol	GCE	+0,5	CV	PB, pH 3, 5, 7	—	[137]
Posakonazol	GCE	+0,5	CV	PB, pH 3, 5, 7	—	[137]
Ketokonazol	GCE	+0,6	CV, SWV	NH ₃ -NH ₄ Cl, pH 9	0,075	[138]
Ketokonazol	GCE/MWCNTs	+0,6	CV, LSV, DPV	PB, pH 7	0,44	[139]
Ketokonazol	CPE	+0,55	AdS-DPV	PB, pH 12	0,024	[140]
Itrakonazol	CPE	+0,66	CV, AdS-DPV, AdS-SWV	BRP, pH 2	0,012	[141]
Itrakonazol	UTGE	+0,75	CV, AdS-DPV, AdS-SWV	BRP, pH 2	0,015	[141]
Itrakonazol	PCE	+0,63	CV, AdS-DPV, AdS-SWV	BRP, pH 2	0,013	[141]
Ketokonazol	BDDE	+0,59	SWV	NH ₃ -NH ₄ Cl, pH 9	0,083	[142]
Terconazol	O-BDDE, GCE, PGE	+0,50	CV, DPV	PB, pH 7,2	0,4; 0,5; 1,24	[130]

CPE – uhlíková pastová elektroda, GCE – elektroda ze skelného uhlíku, MWCNTs – vícečetné uhlíkové nanotrubičky, PCE – tužková grafitová elektroda, p-AgSAE – leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda, UTGE – ultrastopová grafitová elektroda, BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda, AdS – adsorpční anodické stripování, DPV – diferenční pulzní voltametrie, SWV – square-wave (čtvercová) voltametrie, CV – cyklická voltametrie, BRB – Britton–Robinsonův pufr, PB – fosfátový pufr

4.2.1.4.1. Stanovení nystatinu v tabletě a masti

Kromě přímých voltametrických přístupů lze v literatuře dohledat i biosenzory, jež využívají inhibici kvasinek či plísní imobilizovaných na plynových sondách pomocí propustných membrán (potenciometrických čidlech). Typickým příkladem je biosenzor na stanovení nystatinu v mastích a tabletách obsahující *Saccharomyces cerevisiae* v membráně (Obr. 24). Po přidání určitého množství nystatinu dojde k narušení permeability buněčné membrány přítomné kvasinky a následně k její buněčné smrti, což se projeví nárustem signálu kyslíkové sondy. Pro tyto senzory je důležité, aby se měření prováděla za podmínek, které vyhovují přítomným kvasinkám, to znamená, že pracovním médiem bývá lehce kyselý pufr (pH 4,5), který musí mít konstantní teplotu (termostatovaný článek) a obsahovat živiny (glukózu) [143].

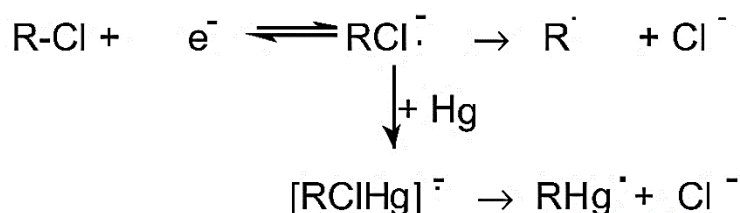


Obr. 24 Odezva biosenzorů (na bázi kyslíku a oxidu uhličitého) na koncentraci nystatinu
Podmínky: 2 g/l glukózy, 0,5 ml imobilizovaných buněk, 50 U/ml nystatinu [143].

4.2.1.4.2. Stanovení klotrimazolu v krému

Ke stanovení klotrimazolu v krému byla vyvinuta diferenciální pulzní polarografie a katodická stripping voltametrie. Princip této elektrochemické metody je založen na elektrochemické redukci klotrimazolu (jedno-elektronová reakce klotrimazolu pro odtržení vazby uhlík-halogen) (Obr. 25). K analýze se použil systém tří elektrod, složený z pracovní visící

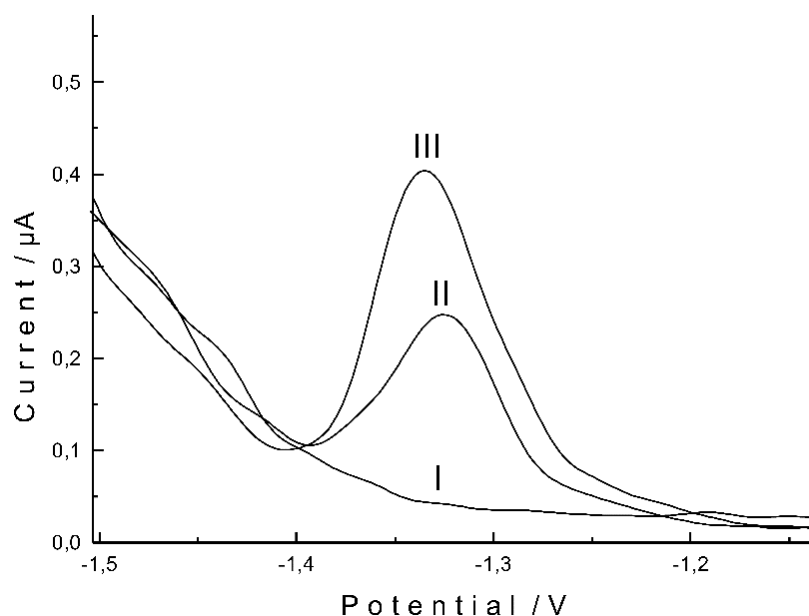
rtuťové elektrody, referentní Ag/AgCl s 3 mol/l KCl solným můstkem a pomocné elektrody ze skelného uhlíku. Fosfátový pufr o koncentraci 0,2 mol/l a BRB se ukázaly jako vhodná pracovní média [129].



Obr. 25 Elektrochemická redukce klotrimazolu [129].

Roztoky standardu klotrimazolu v čistém metanolu (1×10^{-2} mol/l a 1×10^{-4} mol/l) se pipetovaly do 20 ml fosfátového pufru obsaženého ve voltametrické cele. K měření byl použit diferenciální pulzní režim s pulzní amplitudou 50 mV a dobou poklesu 0,8 s. Katodické voltamogramy získané akumulací při $-0,2$ V po dobu míchání 30 s jsou znázorněny na Obr. 26 [129].

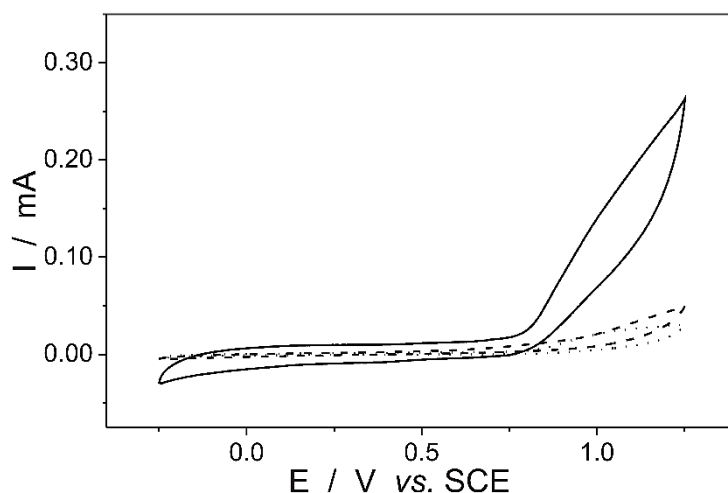
Touto metodou bylo možné analyzovat vzorky Canestenu a Dermobene, kdy se adekvátní množství masti rozpustilo v čistém metanolu. Navíc lze usoudit, že tato metoda nalezne své uplatnění i v analýze pevných léčiv (tablety, zásypy a pudry). Výraznému zlepšení citlivosti je možné dosáhnout zařazením akumulčního kroku na kapce rtuti [129].



Obr. 26 Katodické stripovací voltamogramy 0,345 µg/ml klotrimazolu ve fosfátovém pufru (pH 7,0) po dobu akumulace 30 s (křivka II) a 90 s (křivka III). $E_{ac} = -0,2$ V; $v = 100$ mV/s. Křivka I=slepý roztok (blank) [129].

4.2.1.4.3. Stanovení flukonazolu v kapsli

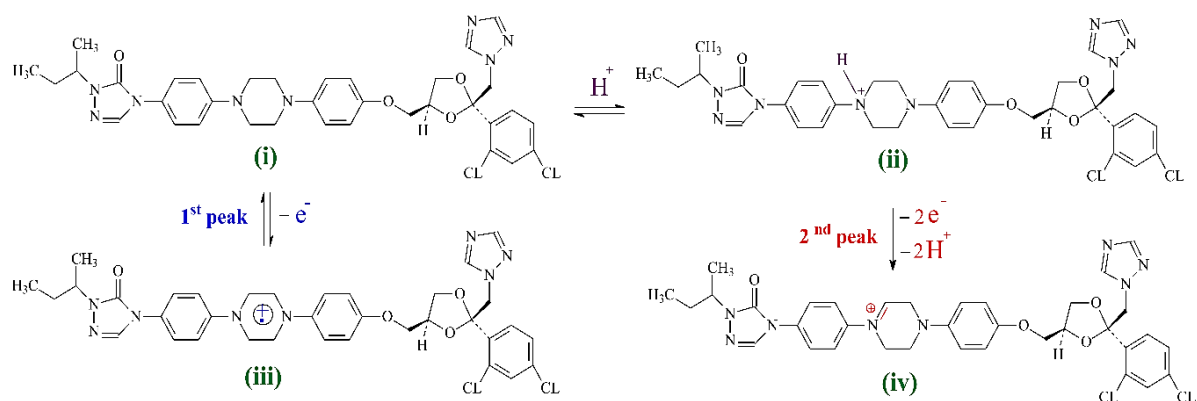
Díky přítomnosti elektroaktivních skupin (triazoly), je možno tuto léčivou látku stanovit pomocí elektroanalytických metod. Elektrochemická redukce FLU byla zkoumána na platinových a uhlíkových elektrodách pomocí CV a DPV (Obr. 27). Standardně za použití tříelektrodového systému, který se skládal z GCE, sycené kalomelové elektrody (SCE) a platinového drátku, je možné dosáhnout požadovaných výsledků. Kromě toho se ukázalo, že i uhlíková pastová elektroda (CPE) může zcela nahradit komerční elektrody. Navíc použití modifikované CPE zlepšilo přesnost analýz, protože povrch CPE byl po každé analýze obnovován otřením o vlhký filtrační papír. Tato elektroanalytická metoda se ukázala jako možná alternativní metoda pro stanovení tohoto léčiva, protože byl pozorován nízký detekční limit (odhadem 6,3 $\mu\text{g/ml}$), dobrá linearita ($R^2 = 0,9989$) v rozsahu od 48,0 do 250,0 $\mu\text{g/ml}$ a relativní směrodatná odchylka (RSD) 3,1 %. Stanovení FLU se provádělo ve farmaceutických kapslích s výtěžností 98 % (RSD 5,8 %) [144].



Obr. 27 Cyklické voltamogramy získané v roztoku fosfátového pufru (pH 8,0) obsahujícím $5,0 \times 10^{-4}$ % flukonazolu na PCE (—), Pt (.....) a GCE (---). Experimentální podmínky: $-0,25 \text{ V} \leq E_{\text{appl}} \leq 1,25 \text{ V}$ při $v = 100 \text{ mV/s}$ [144].

4.2.1.4.4. Stanovení itraconazolu v kapslích, séru a moči

Metoda voltametrického stanovení ITZ ve farmacii a biologických tekutinách spočívá v jeho oxidaci na uhlíkových elektrodách, kdy dochází k odtržení elektronu z atomu dusíku v piperazinovém kruhu s navázaným fenylem, jak je zřejmé z Obr. 28. Pro zlepšení analytických parametrů se využila CPE povrchově modifikovaná tenzidy, jejichž přítomnost zvyšovala proudovou odezvu [128].



Obr. 28 Návrh mechanismu elektrodové reakce itraconazolu [145].

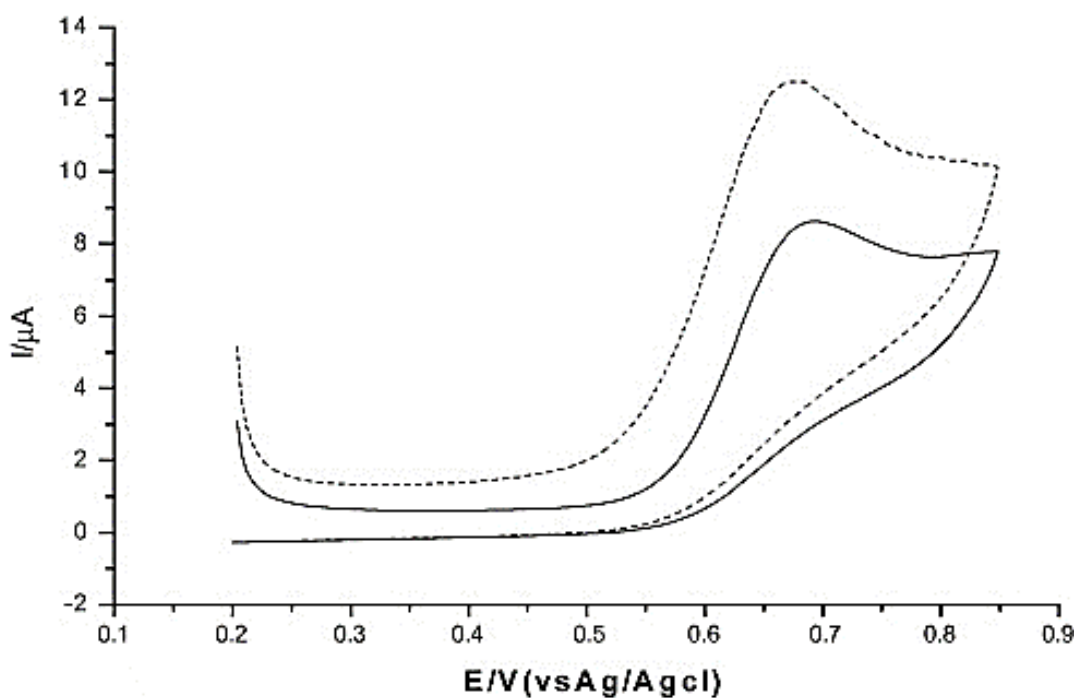
Povrchy pracovních elektrod byly obnovovány dle instrukcí dodavatele, kdy GCE a PGE se leštily pomocí suspenze z Al₂O₃. CPE se obnovovala otřením a následným leštěním o vlhký filtrační papír. Modifikace CPE tenzidem (SDS) se prováděla jejím ponořením do roztoku tenzidu po určitou dobu. Zásobní roztok ITZ o koncentraci 1,0 mg/ml, se získal rozpuštěním ITZ v methanolu a následně byl skladován při teplotě 4 °C. Jako pracovní medium byl použit 0,04 mol/l BRB o pH 11 [128,145].

Pracovní podmínky pro stripping DPV byly následující: amplituda pulzu 0,05 V, doba pulzu 0,04 s, rychlost rozmítání 0,01 V/s, potenciálový krok 0,0065 V a jeho čas 0,65 s. Naproti tomu podmínky pro anodickou stripping SWV byly zjištěny jako optimální: amplituda 0,02 V, frekvence 1 Hz, potenciálový krok 0,0065 V a rychlost skenování 0,0065 V/s [128].

Kapsle obsahující ITZ se rozdrtily v třecí misce a převedly do odměrné baňky, jenž byla poté doplněna po rysku čistým metanolem. Po rozpuštění a filtraci byl vzniklý filtrát pipetován do 10 ml do BRB a analyzován. Příprava obohaceného séra pro analýzu spočívala ve smíchání 0,5 ml ethanolu s 0,3 ml 5 % ZnSO₄ a přidáním k 0,3 ml séra. Poté se směs musela centrifugovat po dobu 15 min při 13 000 ot/min. Vzorek (1 ml) čirého roztoku byl přidán ke směsi 9 ml BRB pufru. Po dobu 5 minut se nechal roztok odvzdušnit a následně se obohatil o přítomnost ITZ. K analýze ITZ v moči se vzorek připravil smícháním 0,5 ml moči s 0,5 ml ethanolu a 0,5 ml 5 % ZnSO₄. Pomocí 0,1 ml 1 mol/l NaOH se pH upravilo na hodnotu 11. Směs se opět podrobila centrifugaci po dobu 15 min při 13 000 ot/min. Vzorek byl dále upravován jako v předchozím případě [128].

4.2.1.4.5. Stanovení ketokonazolu v šampónu

Pro stanovení ketokonazolu ve farmaceutických nebo kosmetických přípravcích se používají metody jako spektrofotometrie, chromatografie a kapilární elektroforéza. Avšak přítomnost elektroaktivních skupin umožňuje stanovení pomocí elektrochemických metod. Pro voltametrické stanovení tohoto antimykotika, jenž spočívá v jeho oxidaci, byla vyvinuta GCE modifikovaná β -cyklodextriny (CDMGC), které představují cyklické sacharidy vázající molekuly ketokonazolu. Pomocí analýzy reálného šampónu (Nizarex) s obsahem 20 mg/g ketokonazolu byla ověřena použitelnost (správnost). Vzorek šamponu (10 ml) kvantitativně přenesen do 100 ml odměrné baňky a doplněn BRB o pH 9. Z důvodu statisticky nevýznamného úseku pro kalibrační závislost lze použít metodu standartního přídávku, jenž výrazně zkracuje dobu analýzy a snižuje náklady na chemikálie. Na Obr. 29 lze vidět cyklický voltamogram, který zobrazuje rozdíl stanovení KTC na GCE a CDMGCE [146].



Obr. 29 Cyklické voltamogramy získané pro (–) KCZ na GCE a (– – –) KCZ na modifikované CDMGCE [146].

Závěr

Vzhledem k častějším výskytům mykotických onemocnění, a čím dál větším problémům se vznikem rezistence na tyto vyvinutá antimykotika, se klade velký tlak na vývoj nových analytických metod, pro kontrolu kvality antimykotických léčiv. Vyvinuté elektrochemické metody mohou konkurovat již používaným chromatografickým a elektroforetickým metodám, a to hlavně z důvodu nižších nákladů, jednoduchosti instrumentace, srovnatelné citlivosti, dostačující selektivitě v závislosti na použité pracovní elektrodě (modifikaci a volbě pracovních podmínek), krátké doby analýzy či dokonce používání méně toxických reagensů.

Nejrůznější uhlíkové materiály, včetně borem-dopovaného diamantu, jenž jsou oproti rtuťovým elektrodám více ekologické, dominují v dnešní době v elektroanalýze antimykotik. Zařazení akumulčního kroku při vývoji stripping metod dovoluje zvýšit citlivost až na stopovou úroveň, kdy odpovídající metody mohou být využity i v monitorování reziduí antimykotik v tělních tekutinách., a tudíž nalézt své uplatnění i v klinické analýze.

Seznam literatury

- [1] VOTAVA, M. a kol., *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [2] OSTRÝ, V. *Vláknité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-7071-102-7.
- [3] HURYCH, J., ŠTÍCHA, R. *Lékařská mikrobiologie Repetitorium*. Praha: Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
- [4] DAINTITH, J. a E. MARTIN. *Dictionary of Science (6th Edition)* [online]. Oxford University Press, 2010 [cit. 2022-06-09]. ISBN 978-0-19-956146-9.
- [5] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996.
- [6] VOTAVA, M. a kol., *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN: 80-902896-6-5.
- [7] BLACBURN, C. de W. *Food Spoilage Microorganisms* [online]. Woodhead Publishing, 2006 [cit. 2022-06-10]. ISBN 978-1-85573-966-6.
- [8] WAREING, P., F. STUART a R. FERNANDES. *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists (7th Edition)* [online]. Royal Society of Chemistry (RSM), 2010 [cit. 2022-06-10]. ISBN 978-1-905224-84-5.
- [9] Obrázek sporangioforu *M. plumbeus*. Dostupné z:
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/perokresby/Mucor%20plumbeus%20nakres.jpg> [cit. 2022-05-10].
- [10] WOOLEY, D. P. a K. B. BYERS. *Biological Safety - Principles and Practices (5th Edition)* [online]. American Society for Microbiology (ASM), 2017 [cit. 2022-06-10]. ISBN 978-1-55-581620-9.
- [11] Obrázek konidioforu *Aspergillus flavu*. Dostupné z:
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/perokresby/Mucor%20plumbeus%20nakres.jpg> [cit. 2022-05-12].
- [12] ROBINSON, R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3* [online]. Elsevier, 2000 [cit. 2022-06-11]. ISBN 978-0-12-227070-3.
- [13] MOTARJEMI, Y., G. MOY a E. TODD. *Encyclopedia of Food Safety* [online]. Elsevier, 2014 [cit. 2022-06-10]. ISBN 978-0-12-378612-8.

- [14] WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Wastewater Biology - The Microlife (3rd Edition)* [online]. Water Environment Federation. 2017 [cit. 2022-06-11]. ISBN 978-1-57278-337-9.
- [15] GUPTA, V. K. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering - microbial cellulase system properties and applications* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2022-06-11]. ISBN 978-0-444-63507-5.
- [16] Obrázek kolonií *A. flavus*. Dostupné z: http://2.bp.blogspot.com/-u8k_26sX9iE/Ty2IMCCGU9I/AAAAAAAAAG1M/hMi3HmpYE50/s400/Aspergillus%2Bflavus%2BSAB_72hr.JPG [cit. 2022-06-11].
- [17] Obrázek mikroskopie *A. fumigatus*. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482464/bin/800px-Aspergillus_fumigatus_01.jpg [cit. 2022-06-11].
- [18] VISAGIE, C. M., J. HOUBRAKEN, J. C. FRISVAD, S. B. HONG, C. H. W. KLAASSEN, G. PERRONE, K. A. SEIFERT, J. VARGA, T. YAGUCHI a R. A. SAMSON. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. [online]. *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*, 2014, **78**(1), 343-371 s. [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- [19] MATTHEWS, K., K. E. KNIEL a T. J. MONTVILLE. *Food microbiology - an introduction (4th edition)* [online]. American Society for Microbiology (ASM). 2017, [cit. 2022-06-11]. ISBN 978-1-55-581938-5.
- [20] ČELAKOVSKÁ, J. Choroby kůže vyvolané vláknitými houbami a kvasinkami. *Medicína pro praxi* [online]. 2017, **14**(5), 258–262 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2017/05/09.pdf>
- [21] DELMA, S.T., L. C. PATRICIA a K. DAVID. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *ASM Journals* [online]. 2011, **9**(10) [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/EC.05085-11>
- [22] SÓNIA, S., MELYSSA, N., MARIANA H., ROSÁRIO, O., DAVID, W. W., JOANA, A. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2012, **36**(2), 288-305 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- [23] SUDBERY, E.P. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews microbiology* [online]. 2011, **9**, 737-748 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2636>

- [24] SARDI, J. C. O., L. SCORZONI, L., T. BERNARDI, A. M. FUSCO-ALMEIDA a M. J. S. MENDES GIANNINI. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2013, **62**(1) [cit. 2022-06-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- [25] POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2013, **41**(2), 208-217 s. [cit. 2022-06-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813904>
- [26] Obrázek kolonie *Candida albicans*. Dostupné z: http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/graphics/caal_m.jpg [cit. 2022-06-15].
- [27] SHU, S. L. a H. M. CHRISTOPHER. *Cryptococcus*. *proceedings of the american thoracic society* [online]. 2009, **7**(3), 186-196 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1513/pats.200907-063AL>
- [28] Obrázek kolonie *C. neoformans*. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/profile/Swati-Jain-37/publication/340668344/figure/fig2/AS:880956231655425@1587047741126/Colonies-of-Cryptococcus-on-Sabourauds-dextrose-agar.png> [cit. 2022-06-16].
- [29] Obrázek *P. jirovecii* v plicní tkáni. Dostupné z: <https://cdn.lecturio.com/assets/Photomicrograph-Pneumocystis-jirovecii-Pneumonia.jpg> [cit. 2022-06-16].
- [30] ABD-ELSALAM, K. A., RAI, M. Chapter 1 - An introduction to nanomycotoxicology. *Nanomycotoxicology* [online]. 2020, 1-7 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817998-7.00001-X>
- [31] MURRAY, P. R., K. S. ROSENTHAL a M. A. PFALLER. Chapter 58 - Pathogenesis of fungal disease. *Medical Microbiology* [online]. Elsevier, 2021, **9**, 578-586 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323673228000580>
- [32] MCQUEEN, CH. A., J. BOND, K. RAMOS, J. LAMB a kol. *Comprehensive Toxicology, Volumes 1-14 (2nd Edition)* [online]. Elsevier, 2010 [cit. 2022-06-18]. ISBN 978-0-08-046868-6.
- [33] JHA, S. N. *Rapid detection of food adulterants and contaminants - theory and practice* [online]. Elsevier. 2016 [cit. 2022-06-18]. ISBN 978-0-12-420084-5.

- [34] BRANDENBERGER, H. a R. A. A. MAES. *Analytical toxicology for clinical, forensic and pharmaceutical chemists* [online]. De Gruyter. 1997 [cit. 2022-06-18]. ISBN 978-3-11-010731-9.
- [35] ADAMS, M. R. a M. O. MOSS. *Food microbiology (3rd Edition)* [online]. Royal Society of Chemistry (RSC). 2008 [cit. 2022-06-20]. ISBN 978-0-85404-284-5.
- [36] FUJIMOTO, H. Yeasts and molds: mycotoxins: classification, occurrence and determination. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* [online]. 2011, 792-800 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00368-X>
- [37] HAMAL, P., SVOBODOVÁ, L. Mykózy a antimykotika. *Interní medicína* [online]. 2011, **13**(11), 445-449 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/11/07.pdf>
- [38] JAREŠOVÁ, R. L. Povrchové kožní mykózy a péče o pokožku postiženou plísní. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2016, **10**(1), 20-23 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/der-201601-0005_povrchove_kozni_mykozy_a_pece_o_pokozku_postizenou_plisni.php
- [39] OBROVSKÁ, M. Léčba dermatofytózy kůže nohou volně prodejnými přípravky. *Praktické lékarenství* [online]. 2019, **15**(2), 101-102 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2019/02/10.pdf>
- [40] KULÍKOVÁ, Z. Onychomykózy (tinea unguium). *Praktické lékarenství* [online]. 2010, **6**(2), 80-83 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2010/02/05.pdf>
- [41] Obrázek forem onychomykózy. Dostupné z: <https://cz.fungalor-premium-plus.site/images/%C4%8Dl%C3%A1nky/1766/typy%20houbov%C3%BDch%20onemocn%C4%9Bn%C3%AD%20neht%C5%AF.jpg> [cit. 2022-06-11].
- [42] LANGEROVÁ, E., KORANDOVÁ, H. Plísňová onemocnění nehtů. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2015, **9**(1), 40-42 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2015/01/09.pdf>
- [43] PÁNKOVÁ, R. Povrchové kandidózy a možnosti léčby. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2013, **7**(4), 166-169 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2013/04/05.pdf>
- [44] SKOŘEPOVÁ, M. Mykózy u dětí, diagnostika a léčba. *Pediatric pro praxi* [online]. 2013, **14**(3), 170-172 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/ped/2013/03/06.pdf>

- [45] Obrázek *Tinea capitis* u mladého chlapce. Dostupné z:
https://basicmedicalkey.com/wp-content/uploads/2016/06/m_usat2_c137f002.png [cit. 2022-06-15].
- [46] HENDRYCHOVÁ, T., MALÝ, J. Volně prodejná antimykotika. *Praktické lékárenství* [online]. 2011, 7(3), 132-137 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z:
<https://www.solen.cz/pdfs/lek/2011/03/09.pdf>
- [47] BUCHTA, V., SLEZÁK, R., ŠPAČEK, J., KOŠŤÁLOVÁ, M., VEJSOVÁ, M., DOLEŽAL, M. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, 22(2), 72-80 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z:
<https://www.solen.cz/pdfs/far/2008/02/06.pdf>
- [48] Obrázek keratomykózy. Dostupné z: https://assets.nhs.uk/nhsuk-cms/images/C0531899-Pityriasis_versicolor_copy.width-1534.png [cit. 2022-06-15].
- [49] HAŠEK, J. Orofaryngeální kandidóza. *Praktické lékárenství* [online]. 2015, 11(1), 8-12 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2015/01/03.pdf>
- [50] Obrázek moučnivky u dítěte. Dostupné z:
<https://www.mom4moms.cz/image/catalog/moucnivka-01-wikicommons.jpg> [cit. 2022-06-15].
- [51] HORÁK, P. Vulvovaginální kandidóza, farmakoterapie a prevence. *Praktické lékárenství* [online]. 2011, 7(2), 80-84 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z:
<https://www.solen.cz/pdfs/lek/2011/02/08.pdf>
- [52] KOŠŤÁLOVÁ, M. Vulvovaginální kandidóza. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2012, 6(2), 81-84 s. [cit. 2022-06-18]. Dostupné z:
<https://www.solen.cz/pdfs/der/2012/02/07.pdf>
- [53] UNZEITIG, V., KLIMENT, M., ŠPAČEK, J., DVOŘÁK, V., BOROVSÝ, M. Všeobecné zásady diagnostiky a léčby vulvovaginální kandidózy. *Medicina pro praxi* [online]. 2011, 8(5), 233-236 s. [cit. 2022-06-17]. Dostupné z:
<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/05/08.pdf>
- [54] ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. *Klinická Farmakologie a farmacie* [online]. 2008, 22(1), 40-44 s. [cit. 2022-06-16]. Dostupné z:
<https://www.solen.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf>
- [55] ZAZULA, R., SCHINDLER, I., SPÁLENÝ, A., VAŠÁKOVÁ, M., DUTKA, J. Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, 7(7), 349-353 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z:
<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/07/07.pdf>

- [56] RÁČIL, Z., KOČMANOVÁ, I., WEINBERGEROVÁ, B., BOHATÁ, Š., WINTEROVÁ, J., MAYER, J. Terapie invazivních mykóz. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, **10**(4), 167-171 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2008/04/05.pdf>
- [57] BARTÁKOVÁ, H., P. CETKOVSKÝ, L. DRGOŇA, J. HABER, P. HAMAL, I. KOČMANOVÁ, M. KOUBA, D. KOUKALOVÁ, M. LENGEROVÁ, N. MALLÁTOVÁ, J. MAYER, K. MENCL, Z. RÁČIL a M. TESAŘOVÁ. *Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky*. The Czech Leukemia Study Group for Life, 2007, **53**. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/incpdfs/inf-990000-2100_10_001.pdf
- [58] GAŠPAR, M. Pľúcna aspergilóza. *Newsrab* [online]. 2016, **7**(2), 74-77 s. [cit. 2022-06-30] Dostupné z: https://static.medirex.sk/storage/app/media/uploaded-files/Newsrab_2_2016_final.pdf#page=6
- [59] GERMAUD, P. *Aspergillus* and the respiratory systém. *EMC – Médecine* [online]. 2005, **2**(6), 585-595 s. [cit. 2022-06-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.emcmed.2005.06.001>
- [60] SLOVÁČEK, L., L. JEBAVÝ, O. ŠIROKÝ, J. CERMAN, P. ŽÁK, P. BENEŠOVÁ, P. BUCHTA, M. BLAŽEK, B. SLOVÁČKOVÁ a J. M. HORÁČEK. Kryptokokóza u nemocného s progredující chronickou B-lymfatickou leukémií. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2006, **3**, 135-137 s. [cit. 2022-06-15]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2006/03/10.pdf>
- [61] KOLIBA, P. Vaginální kandidóza – současné možnosti diagnostiky a léčby. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2014, **8**(2), 68-70 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2014/02/08.pdf>
- [62] NEGRI, M., T. P. SALCI, C. S. SHINOBU-MESQUITA, I. R. G. CAPOCI, T. I. E. SVIDZINSKI a E. S. KIOSHIMA. Early state research on antifungal natural products. *Molecules* [online]. 2014, **19**(3), 2925-2956 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules19032925>
- [63] KUKLOVÁ, I. Mykózy kůže a nehtů, *Medicina pro praxi* [online]. 2006, **3**, 129-131 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2006/03/06.pdf>
- [64] ARIF, T., J. D. BHOSALE, N. KUMAR, T. K. MANDAL, R. S. BENDRE, G. S. LAVEKAR a R. DABUR. Natural products - antifungal agents derived from plants [online]. *Journal of Asian Natural Products Research* [online]. 2009, **11**(7), 621-638 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10286020902942350>

- [65] SALVADOR, A. a A. CHISVERT. *Analysis of Cosmetic Products* [online]. Elsevier, 2007 [cit. 2022-06-30]. ISBN 978-0-444-52260-3
- [66] Tea Tree - *Melaleuca alternifolia* [online]. 2022 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-tea-tree-melaleuca-alternifolia-c-736_927.html
- [67] Obrázek květu *Melaleuca alternifolia* Dostupné z: https://usercontent.one/wp/antropocene.it/wp-content/uploads/2021/08/Melaleuca_alternifolia-800x445.jpg?media=1655914063 [cit. 2022-06-30].
- [68] Obrázek molekuly terpinen-4-olu. Dostupné z: <https://static.cymitquimica.com/products/11/thumb-webp/5261.webp> [cit. 2022-06-30].
- [69] KUMAR, S., R. KUMARI a S. MISHRA. Pharmacological properties and their medicinal uses of cinnamomum: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2019, **71**(12), 1735-1761 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jphp.13173>
- [70] International Food Information Service *Dictionary of food science and technology (2nd Edition)* [online]. International Food Information Service (IFIS Publishing), 2009 [cit. 2022-06-30]. ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [71] KONTOMINAS, M. *Bioactive food packaging - strategies, quality, safety* [online]. Destech Publications, 2016 [cit. 2022-06-20]. ISBN 978-1-60595-117-1.
- [72] GRULICH, V. CINNAMOMUM VERUM J. Presl – skořicovník pravý / škoricovník [online]. 2016 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cinnamomum-verum/>
- [73] Obrázek kůry z *Cinnamomum verum*. Dostupné z: https://cdn.myshoptet.com/usr/www.madeinindia.cz/user/shop/big/93-1_skorice-cela.png?5fbf86b7 [cit. 2022-06-20].
- [74] Obrázek molekuly cinnamaldehydu Dostupné z: <https://www.chemservice.com/media/product/structures/n-11468.jpg> [cit. 2022-06-20].
- [75] OPARA, E. I. a CH. MAGALI. *Culinary herbs and spices - a global guide* [online]. Royal Society of Chemistry (RSC), 2021 [cit. 2022-06-29]. ISBN 978-1-83916-156-8.
- [76] PETER, K. V. *Handbook of herbs and spices* [online]. Woodhead Publishing, 2004, **2** [cit. 2022-06-20]. ISBN 978-1-85573-721-1.
- [77] STEGLICH, W., B. FUGMANN a S. LANG-FUGMANN. *RÖMPP Encyclopedia natural products* [online]. Thieme Medical Publishers Inc., 2000 [cit. 2022-06-29]. ISBN 978-3-13-117711-7.

- [78] HOSKOVEC, L. CHELIDONIUM MAJUS L. – vlašovičník větší / lastovičník větší. [online]. 2007 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/chelidonium-majus/>
- [79] ZIELINSKA, S., A. JEZIEŃSKA-DOMARADZKA, M. WÓJCIAK-KOSIOR, I. SOWA, A. JUNKKA a A. M. MATKOWSKI. Greater celandine's ups and downs-21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's pharmacology. *Frontiers In Pharmacology*. [online]. 2018, **9** [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00299>
- [80] ARORA, D. a A. SHARMA. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus *Chelidonium*. *Pharmacognosy Journal* [online]. 2013, **5**(4), 184-190 s. [cit. 2022-06-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2013.07.006>
- [81] Obrázek listu a květu *Chelidonium majus*. Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d6/Flower_October_2008-1.jpg/245px-Flower_October_2008-1.jpg [cit. 2022-06-29].
- [82] Obrázek chemické struktury chelerythrinu. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/265859619/figure/fig3/AS:667179049566218@1536079289955/Chemical-structure-of-Chelerythrine-Figure-composed-using-Chem-Draw-70.png> [cit. 2022-06-29].
- [83] SANDERS, T. A. B. *Functional Dietary Lipids - Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2022-06-29]. ISBN 978-1-78242-247-1
- [84] PRITHA, S. D. S. J. a S. KARPAGRAM. Antimicrobial activity of coconut shell oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2018, **9**(4), 1628-1631 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(4\).1628-31](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1628-31)
- [85] JONGEN, W. *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*. [online]. Woodhead Publishing, 2005 [cit. 2022-06-29]. ISBN 978-1-85573-956-7
- [86] Složení Favea FemiVaxinum Neo 30 tobolek. [online]. [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/femivaxinum-neo-tob-30>
- [87] ZABKA, M. a R. PAVELA. Effectiveness of environmentally safe food additives and food supplements in an in vitro growth inhibition of significant *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Plant Protection Science* [online]. 2018, **54**(3), 163-173 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/86/2017-PPS>

- [88] KAZEMI, A. natural therapies for fungal infections. [online]. 2014 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://www.igliving.com/magazine/articles/IGL_2014-12_AR_Natural-Therapies-for-Fungal-Infections.pdf
- [89] Candix 60 kapslí [online]. [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://candix.nutraceutics.cz/?gclid=EAIaIQobChMIkoqT0IK1-AIVSrvVCh2VIQB2EAQYASABEgL1G_D_BwE
- [90] NOW CANDIDA SUPPORT, 90 ROSTLINNÝCH KAPSLÍ [online]. [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://www.nutraday.cz/candida-support-90-rostlinnych-kapsli/?gclid=EAIaIQobChMItu3dqI2_-AIVyYTVCh1GUQ34EAQYASABEgISQ_D_BwE
- [91] TOPNATUR Candistop 60 tablet [online]. [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: https://www.lekarna.cz/candi-stop-cps-60/?gclid=EAIaIQobChMIjO3m9Mjm-AIVPwwGAB21NwwREAYYBSABEgJoj_D_BwE
- [92] HORÁK, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Praktické lékárenství* [online]. 2010, 6(4), 182-186 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2010/04/06.pdf>
- [93] DOLEŽAL, M. a V. BUCHTA. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékárenství* [online]. 2006, 1, 10-14 s. [cit. 2022-06-30]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2006/01/02.pdf>
- [94] MEHTA, S. C. a A. KAR. *Pharmaceutical pharmacology* [online]. New Academic Science, 2014 [cit. 2022-06-30]. ISBN 978-1-781830-68-0.
- [95] *Pharmaceutical manufacturing encyclopedia (3rd edition)* [online]. William Andrew Publishing, 2007 [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-0-8155-1526-5.
- [96] KATZUNG, H., B. Antifungální látky (antimykotika). In: *Základní a klinická farmakologie*. Praha: Lange Medical Publications, 1982, 701-707 s.
- [97] LINCOVÁ, D. a H. FARGHALI. Skupiny farmak orientované podle systémů a onemocnění. In: *Základní a aplikovaná farmakologie, 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2007, 506-514 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [98] DEREK, L. Nasty drug molecules: Amphotericin B. [online]. 2012 [cit. 2022-06-20]. Dostupné z: <https://www.science.org/content/blog-post/nasty-drug-molecules-amphotericin-b>
- [99] FARMACEUTICKÁ FAKULTA HRADEC KRÁLOVÉ, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE a UNIVERZITA PARDUBICE. *Nosiče léčiv na bázi modifikovaných poly(ethylenglykolu) a jejich pH-senzitivní konjugáty*. SEDLÁK, M., L. KUBICOVÁ, K.

- VENTURA, M. PRAVDA, F. ŠTAUD a V. BUCHTA. Česká republika. Patentový spis, CZ 298676 B6. 2007-12-19.
- [100] CAMMACK, R., T. K. ATTWOOD, P. M. CAMPBELL, J. H. PARISH, A. D. SMITH, J. L. STIRLING a F. VELLA. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology (2nd Edition)* [online]. Oxford University Press, 2006, 25 s. [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-0-19-852917-0.
- [101] ARMAREGO, W. a CH. CHAI. *Purification of laboratory chemicals (7th Edition)* [online]. Elsevier, 2013 [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-0-12-382161-4.
- [102] BAINES, D. a R. SEAL. *Natural food additives, ingredients and flavourings* [online]. Woodhead Publishing, 2012, 23 s. [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-1-84569-811-9.
- [103] GRUMEZESCU, A. M. a M. A. HOLBAN. *Food safety and preservation - modern biological approaches to improving consumer health* [online]. Elsevier, 2018, 9 s. [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-0-12-814956-0.
- [104] The United States Pharmacopeial Convention. *Food chemicals codex (11th Edition)* [online]. The U. S. Pharmacopeia (USP), 2018, 821-822 s. [cit. 2022-06-17]. ISBN 978-1-936424-77-1.
- [105] KRAUSOVÁ, L. J. GRIM a P. PÁVEK. Azolová antimykotika: mechanismy lékových interakcí. *Klinická Farmakologie a Farmacie* [online]. 2009, **23**(2), 86-89 s. [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/far/2009/02/09.pdf>
- [106] HAMPL, F., S. RÁDL a J. PALEČEK. Antimykotika (antifungální látky), *Farmakochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011, 343-348 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [107] LÜLLMANN, H., K. MOHR a L. HEIN. *Barevný atlas farmakologie*, Překlad 5. anglického vydání. Germany: Grada Publishing, 2018, 282 s. ISBN 978-80-271-2271-4.
- [108] Obrázek molekulové struktury itraconazolu. Dostupné z: <https://www.abcam.com/ps/products/120/ab120816/Images/ab120816-2-ab120816-Itraconazole-Structure-CAS-84625616.jpg> [cit. 2022-06-24]
- [109] THOMSON, G. R. a T. F. PATTERSON. Chapter *Aspergillus Species* v *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* [online]. Elsevier - Health Sciences Division, 2019, 3103-3116 s. [cit. 2022-06-24]. ISBN 0323482554
- [110] ARONSON, J. K. Voriconazole v *The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions* [online]. Elsevier - Health Sciences Division, 2016, 504-521 s. [cit. 2022-06-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01643-7>

- [111] QUERESHI, S., P. PARALIKAR, R. PANDIT, M. RAZZAGHI-ABYANEH, K. KON a M. RAI. Chapter 12 - Pulmonary aspergillosis: diagnosis and treatment. *The Microbiology of Respiratory System Infections* [online]. 2016, **1**, 167-183 s. [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804543-5.00012-9>
- [112] CHEN, Y. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. [online]. Elsevier, 2020, [cit. 2022-06-27]. ISBN 978-0-1281-6421-1.
- [113] FIROOZ, A., S. NAFISI a H. I. MAIBACH. Novel drug delivery strategies for improving econazole antifungal action. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **495**(1), 599-607 s. [cit. 2022-06-23]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.015>
- [114] DIAZ-TOME, V., A. LUACES-RODRIGUEZ, J. SILVA-RODRIGUEZ, S. BLANCO-DORADO, L. GARCIA- QUINTANILLA, J. LLOVO-TABOADA, J. BLANCO.MENDEZ, X. GARCIA-OTERO, R. VARELA-FERNANDEZ, M. HERRANZ, M. GIL-MARTINEZ, M. J. LAMAS, M. GONZALEZ-BARCIA, F. J. OTERO-ESPINAR a A. FERNANDEZ-FERRERIO. Ophthalmic econazole hydrogels for the treatment of fungal keratitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, **107**(5), 1342-1351 s. [cit. 2022-06-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.12.028>
- [115] CHRISTINE, D. W. Econazole. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [online]. 2007, 1-4 s. [cit. 2022-06-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61667-8>
- [116] PAUGAM, A. The latest data on posaconazole. *Medecine et Maladies Infectieuses* [online]. 2007, **37**(2), 71-76 s. [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.11.002>
- [117] PADOIN, C., P. NICOLAS a O. PETITJEAN. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of azole antifungal drugs: the example of posaconazole. *Journal de Mycologie Medicale* [online]. 2006, **16**, S9-S18. [cit. 2022-07-01]. ISSN 1156-5233.
- [118] POSACONAZOLE ACCORD. SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha, 2010 [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238578&tab=texts>
- [119] ARONSON, J. K. Chapter *Antifungal azoles and other antifungal drugs for topical use*. v *Meyler's Side Effects of Drugs* [online]. Elsevier - Health Sciences Division, 2016, 602-605 s. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780444537171003127>

- [120] ANURAG, K. S., K.S. ASHOK, K. ILIYAS, G. AVINASH, G. LOKESH a G. UMESH. Chapter 9 - Oral drug delivery potential of dendrimers. *Nanostructures for Oral Medicine* [online]. 2017, 231-261 s. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00010-9>
- [121] ROZSYPAL, H. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2008, **22**(1), 40-44 s. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/far/2008/01/09.pdf>
- [122] VARDANYAN R. a V. HRUBY. *Synthesis of best-seller drugs* [online]. Elsevier, 2016, 6-9 s. [cit. 2022-07-01]. ISBN 978-0-12-411492-0
- [123] PACETTI, S. A. a S. P. GELONE. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Annals of Pharmacotherapy* [online]. 2003, **37**(1), 90-98 s. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: DOI: 10.1345/aph.1C114
- [124] LETSCHER-BRU, V. a R. HERBRECHT. Caspofungin, a new weapon against invasive aspergillosis. *Journal de Mycologie Medicale* [online]. 2002, **12**(3), 121-125 s. [cit. 2022-07-01]. ISSN 1156-5233.
- [125] DUPONT, B. Caspofungin: new echinocandin antifungal agent. *Journal de Mycologie Medicale* [online]. 2002, **12**, S20-S24. [cit. 2022-07-01]. ISSN 1156-5233.
- [126] BEZÁKOVÁ, Ž. *Analýza chemických liečiv, Stanovení obsahu liečiv podľa slovenského liekopisu I*. Nitra: Va Print Nitra, 2000. ISBN 80-968256-0-7.
- [127] TEARE, F. W., R. N. YADAV a M. SPINO. Determination of flucytosine in tablets by differential pulse polarography [online]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1978, **67**(11), 1641-1642 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.2600671140>
- [128] ABDALLA, S., S. H. HASSAN, A. M. H. HASSAN a A. M. IBRAHIM. Electrochemical oxidation behavior of itraconazole at different electrodes and its anodic stripping determination in pharmaceuticals and biological fluids [online]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, **763**, 51-62 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.047>
- [129] PEREIRA, F. C., N. R. STRADIOTTO a M. V. B. ZANONI. Electrochemical reduction and cathodic stripping voltammetric determination of clotrimazole. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2001, **12**(2) [cit. 2022-06-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000200013>
- [130] FISCHER, J., J. GONZÁLEZ-MARTÍN, P. LOCHYNSKI, H. DEJMKOVÁ, K. SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ a M. VEGA. Voltammetric study of triazole antifungal

- agent terconazole on sp³ and sp² [online]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, **863** [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114054>
- [131] DOUGLAS, A. S., M. W. DONALD, F. J. HOLLER a R. C. STANLEY. Analytická chemie. Praha: VŠCHT Praha, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0
- [132] Obrázek schematického znázornění klasického tří-elektrodového článku. Dostupné z: https://cloudfront.jove.com/files/ftp_upload/5502/5502fig1.jpg [cit. 2022-06-29].
- [133] HOSHYAR, S. A., A. H. B. HEMN, Y. YAVUZ a S. ZÜHRE. First electrochemical study of a potent antifungal drug caspofungin: application to its enhanced voltammetric sensing based on the performance of boron-doped diamond electrode in CTAB-mediated measurements. *Diamond and Related Materials* [online]. 2022, **125** [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2022.109031>
- [134] KNOTH, H., T. PETRY a P. GARTNER. Differential pulse polarographic investigation of the antifungal drugs itraconazole, ketoconazole, fluconazole and voriconazole using a dropping mercury electrode. *Pharmazie* [online]. (2012, **67**, 987–990 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1691/ph.2012.2004>
- [135] DANTAS, A.N.D., D. DE SOUZA, J.E.S. DE LIMA, P. DE LIMA-NETO a A.N. CORREIA. Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode. *Electrochimica Acta* [online]. 2010, **55**, 9083–9089 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.08.026>
- [136] PENG, T. Z., Q. CHENG a C. F. YANG. Adsorptive behavior and electrochemical determination of the anti-fungal agent ketoconazole. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* [online]. 2001, **370**, 1082–1086 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002160100773>
- [137] KNOTH, H., G. K. E. SCRIBA a B. BUETTNER. Electrochemical behavior of the antifungal agents itraconazole, posaconazole and ketoconazole at a glassy carbon electrode. *Pharmazie* [online]. 2015, **70**, 374–378 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1691/ph.2015.4174.177>
- [138] MIELECH-LUKASIEWICZ, K., H. PUZANOWSKA-TARASIEWICZ a A. NIEDTIELKO. Electrooxidation of some antifungal agents and their square-wave voltammetric determination in cosmetics and pharmaceuticals. *Analytical Letters* [online]. 2011, **44**, 955–967 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.506934>
- [139] BOROWIEC, J., L. L. WEI, L. H. ZHU a J. D. ZHANG. Multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for sensitive determination of ketoconazole.

- Analytical Methods journal* [online]. 2012, **4**, 444–448 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C2AY05615A>.
- [140] SHAMSIPUR, M. a K. FARHADI. Adsorptive stripping voltammetric determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations and urine using carbon paste electrodes. *The Analyst* [online]. 2000, **125**, 1639–1643 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/B001452O>.
- [141] SHALABY, A., W. S. HASSAN, H. A. M. HENDAWY a A.M. IBRAHIM. Electrochemical oxidation behavior of itraconazole at different electrodes and its anodic stripping determination in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2016, **763**, 51–62 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.12.047>.
- [142] MIELECH-LUKASIEWICZ, K. a K. ROGINSKA, Voltammetric determination of antifungal agents in pharmaceuticals and cosmetics using boron-doped diamond electrodes. *Analytical Methods* [online]. 2014, **6**, 7912–7922 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C4AY01421A>.
- [143] MASCINI, M., A. MEMOLI a O. FEDERICO. Electrochemical biosensors for determination of nystatin activity. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1987, **200**, 237–244 s. [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83772-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83772-1)
- [144] GIL, É. DE S. D. D. CORDEIRO, A. E. B. MATIAS a S. H. P. SERRANO. Electrochemical behavior and determination of fluconazole. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2011, **22**(4) Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000400021>
- [145] EL-DESOKY, H. S. a A. E. KHATTAB. A simple approach for trace voltammetrical determination of itraconazole an inhibitor of the cytochrome P-450 14 α -demethylase enzyme in formulation and human plasma utilizing graphene-carbon paste electrode *in situ* modified with an anionic surfactant. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2020, **167**, 14. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abdd5>
- [146] EL RIES, M.A., M. F. ABDEL GHANY, L. A. HUSSIN, F. M. EL-ANWAR a A. M. MOHAMED. Voltammetric behavior of ketoconazole and its determination in cosmetic preparation using a β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* [online]. 2013, **51**(1), 49–55 s. [cit. 2022-07-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2011.09.001>