

## AZOLOVÁ REZISTENCIA KVASINIEK RODU *CANDIDA*

ZUZANA MALINOVSKÁ, EVA ČONKOVÁ,  
PETER VÁCZI a MARTINA PROŠKOVCOVÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinár-  
skeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73,  
041 81 Košice, Slovenská republika  
zuzana.malinovska@uvlf.sk

Došlo 23.8.21, prijaté 2.6.22.

Kľúčové slová: *Candida*, antimykotická citlivosť,  
rezistencia, biofilm, gén

● <https://doi.org/10.54779/chl20220494>

### Obsah

1. Úvod
2. Azolové antimykotiká
3. Rezistencia
4. Biofilm
5. Záver

### 1. Úvod

Mykotické ochorenia v podobe invazívnych systémových ochorení a septikémií sa stávajú veľkým medicínskym problémom. Posledné štatistiky uvádzajú každý rok približne 1,6 milióna ľudských úmrtí v dôsledku systémových mykóz. Za 90 % všetkých týchto ochorení je zodpovedná oportúnna kvasinka rodu *Candida*, ktorá je zároveň štvrtou najčastejšou príčinou všetkých nozokomiálnych infekcií krvi<sup>1–3</sup>. Systémové kandidové infekcie vznikajú v prípadoch celkového oslabenia alebo imunodeficiencie organizmu: u imunokompromitovaných pacientov, u rizikových alebo predčasne narodených novorodencov, u pacientov po komplikovaných a závažných operáciách, najmä brušných, u pacientov vo vážnom stave po popáleninách a na jednotke intenzívnej starostlivosti, u pacientov po liečbe širokospektrálnymi antibiotikami a imunosupresívami, po liečbe chemoterapiou, po transplantácii orgánov, hemodialýze, pri dlhodobom zavedení katétrov, po podávaní parenterálnej výživy atď.<sup>4–11</sup>. Z hľadiska možnosti liečby a jej úspešnosti je prognóza týchto život ohrozujúcich ochorení nepriaznivá s mortalitou 45 %, pričom niektorí autori udávajú až 75% úmrtnosť<sup>12–14</sup>.

Kvasinky rodu *Candida* patria do kmeňa *Ascomycota*. Sú to jednobunkové eukaryotické organizmy oválneho,

elipsoidného alebo pretiahnutého tvaru s veľkosťou 1–8 × 1–6 μm (cit.<sup>15</sup>). Osídľujú kožu a sliznice ľudí a zvierat a môžu byť súčasťou prirodzenej mikroflóry. Po narušení lokálnej kožnej alebo slizničnej imunity sú častou príčinou povrchových mykóz u ľudí, ktoré ale na rozdiel od systémových infekcií nie sú život ohrozujúce a ich liečba je jednoduchšia a úspešnejšia. Na terapiu superficiálnych mykóz sa využíva veľká skupina lokálne pôsobiacich antimykotík<sup>1,13,16</sup>.

Do skupiny pôvodcov systémových infekcií patria okrem najznámejšieho druhu *C. albicans* aj ďalšie druhy rodu *Candida*, a to *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, a *C. krusei*<sup>16,17</sup>. Základným mechanizmom vzniku ochorení spôsobených týmito oportúnne patogénnymi kvasinkami je prelomenie hostiteľskej imunity a vytvorenie vhodných podmienok pre pomnoženie kvasinkových buniek. Princíp ich patogenity je zložitý. Patogenita sa pripisuje určitým faktorom virulencie, a to adhezencii, produkcii hydrolytických enzýmov poškodzujúcich tkanivá a tvorbe biofilmu<sup>18,19</sup>. Kvasinky rodu *Candida* sú schopné adherovať na rôzne povrchy v organizme (napr. epitel, endotel, trombocyty) alebo na umelé povrchy zdravotníckych pomôcok (katétre, endoprotézy atď.). Schopnosť adhezencie je okrem hýf zabezpečená glykoproteínmi – adhezínmi, ktoré sa nachádzajú na povrchu kandidových buniek a dokážu prepojiť kvasinkové bunky navzájom, s inertným povrchom alebo s hostiteľskými bunkami. Ďalším dôležitým virulentným znakom kandid je schopnosť deštrukcie hostiteľských bunkových membrán hydrolytickými enzýmami. K najvýznamnejším hydrolytickým enzýmom patria proteázy a fosfolipázy. Proteázy sú zastúpené skupinou sekretovaných aspartických proteáz a fosfolipázy enzýmami hydrolyzujúcimi esterové väzby v glycerolfosfolipidoch. Najväčším problémom pri liečbe kandidových systémových infekcií je vysoký stupeň rezistencie na antimykotiká a tvorba biofilmu. V prípade parenterálnej terapie systémových ochorení sú možnosti výberu vhodného antimykotika veľmi obmedzené<sup>13,14,19–21</sup>.

### 2. Azolové antimykotiká

Prvé antifungálne látky sa objavili už v prvej polovici 20. storočia a ich vývoj pokračuje aj v súčasnosti. Aj napriek pokroku v medicíne, počet systémových kandidóz z viacerých dôvodov narastá, a tým aj potreba vývoja nových a menej toxických liečiv. Do veľkej skupiny antifungálnych látok patria antimykotiká prírodného pôvodu (polyénové antibiotiká a grizeofulvín), syntetického pôvodu (azoly, alylamíny a flucytozín) a polosyntetického pôvodu (echinokandíny). V terapii systémových mykóz vo veľkej miere prevažujú azolové antimykotiká<sup>22</sup>.

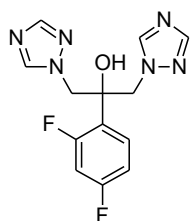
Azoly sú najpočetnejšou skupinou antimykotík. Azolové antimykotiká obsahujú päťčlenný heterocyklus a podľa počtu dusíkových atómov sa delia na dve skupiny, a to na imidazoly, ktoré obsahujú dva dusíkové atómy a na triazoly s obsahom 3 dusíkových atómov<sup>23</sup>. K najvýznamnejším imidazolom, ktoré sa využívajú len na lokálnu aplikáciu, patria: ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, bifonazol, oxikonazol, butokonazol, ekonazol a flutrimazol. Skupina triazolov je viac antifungálne špecifická, vyznačuje sa menším množstvom nežiaducich účinkov a je najčastejšie indikovaná pri liečbe systémových mykóz. Z triazolových antimykotík sa pri celkovej liečbe systémových kandidových infekcií využívajú najmä flukonazol, itraconazol, vorikonazol a posakonazol<sup>22–24</sup>.

Mechanizmus účinku azolov je založený na špecifickej inhibícii 14- $\alpha$ -sterol demetylázy, ktorá katalyzuje premenu lanosterolu na ergosterol. Enzým je závislý na pôsobení fungálneho cytochrómu P450. Azoly ovplyvňujú metabolizmus sterolov v bunkách kvasiniek a narúšajú syntézu membránových lipidov, a tým pôsobia fungistaticky<sup>25,26</sup>.

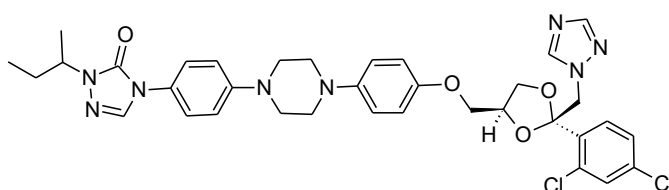
U kvasiniek je ergosterol (5,7-dién-oxysterol) najvýznamnejším štrukturálnym lipidom bunkových membrán, zabezpečuje ich permeabilitu a fluiditu. Štruktúrne je veľmi podobný cholesterolu. Líši sa len prítomnosťou metylovej skupiny viazanej na uhlík C-24 a dvomi dvojítmymi väzbami medzi uhlíkmi 7–8 a 22–23. Nedávne štúdie preukázali, že ergosterol je imunologicky aktívny lipid, ktorý indukuje pyroptózu, čo je forma nekrotickej a zápalovej programovanej bunkovej smrti indukovanej zápalovými kaspázami<sup>27–29</sup>. Ergosterol je syntetizovaný v endoplazmatickom retikule a biosyntéza je regulovaná prostredníctvom aktivity produktov 25 rôznych génov<sup>25</sup>. V súčasnosti dostupné antimykotiká interferujúce so syntézou ergosterolu ovplyvňujú produkty génu *ERG11* (azoly), génu *ERG1* (alylamíny) a génu *ERG2* (morfolíny). Potenciál

produktov ďalších génov ako antifungálnych cieľov je veľmi veľký. Cieľom účinku antimykotických liečiv môžu byť prakticky všetky kroky biosyntézy ergosterolu<sup>30</sup>, a to otvára ďalšie možnosti pri vývoji nových antimykotík.

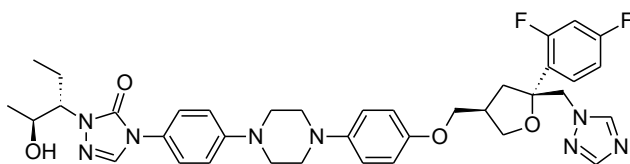
Jedným z najpoužívanejších azolov v klinickej praxi je flukonazol (obr. 1), ktorý sa vyznačuje širokým spektrom účinku. Jedná sa o fluórový triazolový derivát používaný hlavne pri systémových kandidózach a kryptokokovej meningitíde. Prírodzene rezistentná na flukonazol je *C. krusei* a rod *Aspergillus*, zatiaľ čo u niektorých druhov rodu *Candida*, napr. *C. glabrata*, sa môže rezistencia vyvinúť postupne. Skrižená rezistencia bola zaznamenaná pri niektorých kmeňoch *C. glabrata*, *C. krusei* a *C. lusitanae* (cit.<sup>31–34</sup>). Flukonazol je využívaný v profylaxii systémovej kandidózy u predčasne narodených detí<sup>35</sup>. Itraconazol je chlórovaný triazoldioxolanový derivát (obr. 2), ktorý sa využíva najmä pri liečbe aspergilózy, ale má široké spektrum účinku aj na kandidózy, histoplazmózy a blastomykózy<sup>36</sup>. Vorikonazol a posakonazol sú zástupcami druhej generácie triazolov a patria medzi pomerne nové antimykotiká. Používajú sa pri liečbe systémových aspergilových a kandidových infekcií<sup>37</sup>. Posakonazol (obr. 3) je štruktúrou blízky itraconazolu, v podstate sa jedná o jeho hydroxylovaný analóg, avšak s inými liečivami vykazuje menej interakcií<sup>38</sup>. Vorikonazol (obr. 4) sa štruktúrou, farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnosťami podobá flukonazolu, ale vyznačuje sa väčším množstvom nežiaducich účinkov. V jeho molekule je na rozdiel od flukonazolu jeden triazolový kruh nahradený fluoropyrimidínovým. Spektrum účinku vorikonazolu je podobné itraconazolu<sup>39</sup>. Farmakokinetické vlastnosti sú v rámci týchto štyroch azolových antimykotík rozdielne (tab. I). Itraconazol, vorikonazol a posakonazol majú afinitu k lipidom, ale flukonazol je hydrofilný a má odlišné farmakokinetické vlastnosti. Všetky sa môžu podávať orálne, ale intravenózne sa aplikujú len flukonazol, itraconazol



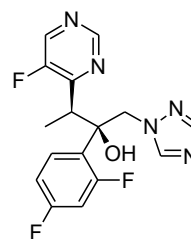
Obr. 1. Flukonazol



Obr. 2. Itraconazol



Obr. 3. Posakonazol



Obr. 4. Vorikonazol

## Tabuľka I

Farmakokinetické vlastnosti azolových antimykotík používaných na terapiu fungálnych systémových infekcií<sup>33,35–40</sup>

Antimykotikum	Spôsob podania	Biologická dostupnosť [%]	Maximálna koncentrácia [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	AUC <sup>a</sup> [ $\text{mg h l}^{-1}$ ]	Väzba na bielkoviny plazmy [%]	Eliminačný polčas [h]
Flukonazol	per os	> 90	0,7	400,0	10–12	27–31
Itrakonazol	per os	> 55	1,1	29,2	99,8	21–64
Posakonazol	per os	> 98	7,8	17,0	99,0	15–35
Vorikonazol	per os	> 96	4,6	20,3	60,0	6,0

<sup>a</sup> AUC (Area Under Curve) – plocha pod krivkou

a vorikonazol. Absorpcia po orálnej aplikácii je závislá od aktuálneho pH žalúdka, najväčšiu variabilitu vykazuje itrakonazol, je slabšie alkalický a vstrebáva sa najlepšie za prítomnosti žalúdočnej šťavy (v pevnej liekovej forme po jedle). Flukonazol a vorikonazol majú vysokú biologickú dostupnosť, po perorálnom podaní dosahuje flukonazol maximálnu koncentráciu za 30–90 minút, vorikonazol za 1–2 hodiny (itrakonazol a posakonazol za cca 4 hodiny). Všetky dobre prenikajú do telesných tekutín a tkanív, kde dosahujú výrazne vyššie koncentrácie ako v plazme. Terapeutické hladiny dosahujú aj v mozgovo-miechovom moku. V niektorých tkanivách pretrvávajú dlho po ukončení liečby, napr. v nechtovej platničke je možná detekcia flukonazolu a itrakonazolu až 6 mesiacov po liečbe. Flukonazol sa vylučuje močom v aktívnej nezmenenej forme, čo sa využíva pri liečbe urogenitálnych infekcií. Ostatné spomínané antimykotiká podliehajú biotransformácii v pečeni<sup>35,37–42</sup>.

Vedľajšími účinkami azolov je ovplyvnenie syntézy steroidných hormónov, a to hlavne androgénov a kortizolu a hepatotoxicita. Azolové antimykotiká sa vyznačujú veľkým počtom liekových interakcií, od stredne závažných až po veľmi závažné formy. Riziko vzniku nežiaducich účinkov sa zvyšuje s množstvom súčasne užívaných liečiv. Dochádza k nim najčastejšie pri kombináciách s liečivami zo skupín antihistaminík, steroidov, antineoplastík, antimikrobiálnych látok, antiretrovirálnych látok, opioidov, dlhodobo pôsobiacich barbiturátov, kardiovaskulárnych liečiv, psychotropných látok a orálnych kontraceptív<sup>33,37–42</sup>.

### 3. Rezistencia

Objasnenie mechanizmov rezistencie je zásadné pre dosiahnutie pokroku v porozumení a liečbe invazívnych infekcií vyvolaných kvasinkami rodu *Candida*. Patogénne kvasinky si vyvinuli množstvo mechanizmov umožňujúcich ich prežitie v prítomnosti antimykotických látok. Rezistencia na antimykotiká vzniká ako dôsledok:

a) zmien v bunkovej stene alebo plazmatickej membráne, ktoré vedú k narušeniu absorpcie liečiva,

b) zmien v afinite liečiva k 14- $\alpha$ -sterol demetyláze alebo v bunkovom obsahu 14- $\alpha$ -sterol demetylázy v dô-

sledku mutácie cieľového miesta alebo nadmernej expresie génu *ERG11*,

c) efluxu liečiva sprostredkovaného membránovými transportnými proteínmi (efluxnými pumpami) patriacimi do rodiny ATP-Binding Cassette (ABC) alebo do rodiny Major Facilitator Superfamily (MFS). Sú známe dva typy efluxných púmp, ktoré sú lokalizované v cytoplazmatickej membráne a transportujú z bunky antimykotické liečivá či iné toxické látky (xenobiotiká). Do prvej skupiny patria primárne transportéry využívajúce energiu zo štiepenia ATP, čo sú proteíny patriace do rodiny ABC. Druhú skupinu tvoria sekundárne transportéry čerpajúce energiu z koncentračného gradientu protónov typického pre biologické membrány. Túto kategóriu zastupujú proteíny MFS. V prípade kvasiniek sú produktami génov *CDR1* a *CDR2* proteíny ABC a produktami génu *MDR1* transportéry typu MFS (cit.<sup>43,44</sup>).

U klinických izolátov rodu *Candida* často dochádza ku kombináciám rôznych mechanizmov rezistencie, ktoré sú často spojené aj s tvorbou biofilmu. Najmä pri flukonazole, ktorý je najpoužívanejším azolovým antimykotikom, často dochádza ku kombináciám rôznych mechanizmov, ktoré vedú k postupnému vývoju rezistencie kandidá na flukonazol, ale aj na iné azolové antimykotiká<sup>45–47</sup>.

Dôležitým génom v genóme kvasiniek rodu *Candida* je *ERG11*, ktorý kóduje 14- $\alpha$ -sterol demetylázu. V *ERG11* môže dôjsť k vzniku bodových mutácií, a to môže viesť k nadmernej expresii génu a následne k nadprodukcii enzýmu, na ktorý je liek zameraný<sup>54</sup>. Mutácie v *ERG11* môžu mať za následok vznik skríženej rezistencie na rôzne azoly. Predpokladá sa, že k regulácii génovej expresie môže dochádzať aj metyláciou DNA. Metylácia môže zmeniť aktivitu segmentu DNA bez zmeny sekvencie<sup>48</sup>.

S biosyntézou ergosterolu u kandidá priamo súvisí Upc2 transkripčný regulátor génu *ERG11*. Upc2 je centrálnym regulátorom nielen *ERG11*, ale aj ďalších génov v dráhe biosyntézy ergosterolu. Upc2 sníma intracelulárne hladiny sterolov, čo vedie k aktivácii génov potrebných na absorpciu a biosyntézu sterolov<sup>49</sup>. Bolo zistené, že narušenie štruktúry Upc2 zvyšuje citlivosť týchto organizmov na azolové antimykotiká. Boli identifikované dva Upc2 homology, UPCA a UPGB. Bolo zistené, že UPCA ovplyvňuje citlivosť na azoly a je kľúčovým regulátorom biosyn-

tézy ergosterolu a je nevyhnutný pre rezistenciu na inhibítory biosyntézy sterolov v *C. glabrata*. Dráha UPC2A preto môže predstavovať potenciálny terapeutický cieľ na zvýšenie účinnosti azolu proti tomuto organizmu<sup>50</sup>.

Inhibícia 14 $\alpha$ -sterol demetylázy flukonazolom vedie nielen k deplícii ergosterolu, ale aj k akumulácii metylovaného sterolu 14 $\alpha$ -metylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolu, ktorý inhibuje bunkový rast. Zmeny v dráhe biosyntézy sterolov môžu spôsobiť rezistenciu na flukonazol. Inaktivácia  $\Delta$ 5,6 desaturázy (ERG3), enzýmu, ktorý v dráhe biosyntézy ergosterolu účinkuje v skoršom kroku ako 14- $\alpha$ -sterol demetyláza, má za následok zmenu zloženia sterolu v membráne (vysoký obsah fekosterolu) a rezistenciu na flukonazol, pravdepodobne akumuláciou 14 $\alpha$ -metylfekosterolu, ktorý umožňuje rast bunky<sup>51</sup>. Posledné štúdie ukázali, že delécia alebo mutácia génu ERG3 u *C. albicans* vedie k zníženej citlivosti mutantov na flukonazol, čo poskytuje priamy genetický dôkaz, že zmena dráhy biosyntézy sterolov môže spôsobiť rezistenciu na flukonazol<sup>51,52</sup>.

Fenoméni rezistencie na viac liečiv (MDR – Multi-Drug-Resistance) je známy aj u kandid. Kvasinky sa môžu stať rezistentnými aj na viac štruktúrne odlišné antimykotiká s rôznymi spôsobmi účinku. Aktívnym transportom antimykotika z bunky dochádza k zníženiu jeho koncentrácie, ktorá nie je postačujúca na ovplyvnenie cieľového miesta<sup>53</sup>. Gén *MDR1* môže byť nadmerne exprimovaný v mnohých klinických izolátoch *C. albicans* rezistentných na flukonazol, a to vedie k zníženej intracelulárnej akumulácii flukonazolu. Aktivácia génu v rezistentných izolátoch je spôsobená mutáciami doposiaľ neznámych transregulačných faktorov a výsledná konštitutívna vysoká úroveň expresie *MDR1* spôsobuje rezistenciu okrem flukonazolu aj na ďalšie antimykotické zlúčeniny. Narušenie obidvoch alel génu *MDR1* v rezistentných izolátoch *C. albicans* ruší ich rezistenciu na tieto liečivá, čo poskytuje genetické dôkazy o tom, že *MDR1* sprostredkúva rezistenciu *C. albicans* voči viacerým antimykotikám<sup>54,55</sup>.

Gén *CDR1* zo skupiny ABC transportérov je súčasťou genómu *C. albicans*. Jeho delécia mala za následok precitlivosť na flukonazol, itrakonazol a ketokonazol a na ďalšie metabolické inhibítory<sup>56</sup>. Vynútená nadmerná expresia *CDR1* spôsobila zvýšenú rezistenciu na antimykotiká, čo dokazuje, že u *C. albicans* môže *CDR1* spôsobiť rezistenciu na viac liečiv. Druhý ABC transportér u *C. albicans* je označený ako *CDR2* (cit.<sup>57</sup>). *CDR1* a *CDR2* sú vysoko homológne (84% aminokyselinová identita) a poskytujú rezistenciu voči podobnému, ale nie identickému spektru antimykotík<sup>57,58</sup>. Nútená nadmerná expresia *CDR2* u *C. albicans* viedla k zvýšenej rezistencii na antimykotiká. Gény *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* sprostredkujú okrem rezistencie na azoly rezistenciu aj na mnoho rôznych xenobiôtiká *CDR1* a *CDR2* tiež spôsobujú rezistenciu na lokálne fungicídy terbinafin a amorolfín. Tieto efluxné pumpy nespôsobujú rezistenciu na iné medicínsky dôležité lieky flucytozín, amfotericín B a echinokandíny, pretože rezistencia k nim vzniká inými mechanizmami<sup>59</sup>.

U *C. tropicalis* sú homológy *MDR1* a *CDR1* nadmerne exprimované po postupných pasážach kmeňa citlivého na liečivo v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií fluko-

nazolu, súčasne s vývojom rezistencie na azoly a terbinafin<sup>60</sup>. *C. glabrata* je druh, ktorý prirodzene vykazuje relatívne vysokú rezistenciu na flukonazol, ale jeho rezistencia sa môže počas liečby flukonazolom ďalej zvyšovať. Delécia *CDR1* v kmeni *C. glabrata* rezistentnom na azoly mala za následok zvýšenú intracelulárnu akumuláciu flukonazolu a precitlivosť na ďalšie azoly. Následkom expresie *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* u niektorých kmeňov *C. glabrata* vzniká multirezistencia<sup>61</sup>. *C. krusei* je prirodzene rezistentná na flukonazol kvôli nízkej afinite 14- $\alpha$ -sterol demetylázy k tomuto liečivu a môže získať rezistenciu na ďalšie azoly zníženou intracelulárnou akumuláciou liečiva. Zvýšená expresia efluxných púmp kódovaných *CDR1*, *CDR2* a *MDR1* je hlavným, klinicky relevantným mechanizmom azolovej rezistencie u *Candida* spp. a vedie k zvýšeniu rezistencie na iné xenobiôtiká<sup>31,62,63</sup>.

#### 4. Biofilm

S rastúcim používaním širokospektrálnych antibiotík narastá problém vzniku kvasinkového biofilmu u pacientov s rôznymi do tela zavedenými zdravotníckymi pomôckami (intravaskulárne katétre, močové katétre, kardioverterové defibrilátory, protetické srdcové chlopne, náhrady kĺbov a iné). Tvorba biofilmu je významným faktorom virulencie kvasiniek rodu *Candida* a je vážnym problémom pre budúcu antimykotickú terapiu. Kvasinky *Candida* spp. majú schopnosť adhérence a kolonizácie na povrchoch zdravotníckych pomôcok a tkanivách<sup>18</sup>. Biofilm svojím prostredím umožňuje množenie buniek, ochranu pred imunitným systémom hostiteľa a pred účinkami antifungálnych látok. Z toho dôvodu sa biofilm stáva nebezpečným rezervoárom kvasinkových buniek a infekcií, ktoré často nereagujú na antimykotickú liečbu. Z biofilmu sa môžu uvoľňovať bunky alebo mikrokolónie, ktoré sú príčinou opakujúcich sa recidív. Vznik biofilmu býva často jedným z dôvodov vysokej mortality u postihnutých pacientov. Kvasinky rodu *Candida* dokážu vytvoriť biofilm za 38–72 h. Je to zložitý proces, ktorý pozostáva z viacerých fáz. Počas prvej fázy dochádza k adhézii solitérnych buniek na vhodný povrch, k ich agregácii do mikrokolónií a k vzniku bazálnej monovrstvy. Ďalšia etapa vývoja biofilmu spočíva v bunkovej proliferácii a skorom štádiu filamentácie adherovaných buniek. Nasleduje dozrievanie biofilmu, ktorého výsledkom je komplexná sieť niekoľkých vrstiev polymorfných buniek vrátane hýfálnych buniek (reťazce buniek valcového tvaru), pseudohýfálnych buniek (elipsoidné bunky spojené od konca k sebe) a okrúhlych kvasinkových buniek obalených v extracelulárnej matici. To dáva biofilmu hustý a štruktúrovaný vzhľad a poskytuje ochranu. Posledný krok vývoja biofilmu sa nazýva disperzné štádium, keď sa niektoré okrúhle kvasinkové bunky dispergujú z biofilmu do prostredia<sup>17,18,64,65</sup>.

Tvorba biofilmu závisí od schopnosti kvasinky produkovať extracelulárne polymérne látky (EPS) (polysacharidy, glukóza, hexosamín, lipidy, proteíny, kyselina fosforečná, kyselina urónová), od vlastností extracelulárnej

matrice (ECM), od schopnosti vykazovať dimorfný rast, od substrátu biofilmu (napr. silikón, latex, elastomér), od dostupnosti, typu a množstva zdroja uhlíka (glukóza, sacharóza, galaktóza), od typu produkovaných adhezínov (napr. Als1-7, Als9, Hwp1, Hwp2, Rbt1, Eap1, Ywp1) a od ďalších faktorov. Transkripčná kontrola nad procesmi, ako je adhézia, tvorba biofilmu, produkcia EPS a ostatných fáz, je navyše zložitá a vykazuje značnú rozmanitosť, pričom celý proces je ovplyvňovaný množstvom génov (pri *C. albicans* sú to napr. *Efg1*, *Bcr1*, *Tec1*, *Ndt80*, *Rob1*, *Brg1*, *Cph1*, *Nrg1*, *Tup1*, *Ume6*, *Cup9*, *Slf1*, *Rfg1*, *Csr1*, *Gcn4*, *Tye7*, *Rca1*, *Ace2* atď.). V rámci druhov rodu *Candida* existujú veľké rozdiely vo vlastnostiach biofilmu. Biofilmy vytvorené *C. albicans* majú heterogénnu štruktúru, ktorú tvoria blastofóry a hýfy obklopené ECM z polysacharidového materiálu<sup>18,65,66</sup>. ECM poskytuje štruktúrnu sieť pre adhéziu medzi samotnými bunkami a pre spojenie buniek s rôznymi povrchmi a zároveň bariéru medzi bunkami v biofilme a susedným prostredím. V štruktúre týchto biofilmov sú obvykle mikrokolónie obklopené vodnými kanálmi<sup>67</sup>. V prípade *C. glabrata* je biofilm tvorený výlučne kvasinkami vo forme buniek ohraničených viacvrstvou štruktúrou alebo v zhlukoch<sup>68</sup>. Biofilm *C. tropicalis* má formu siete kvasiniek, pseudohýf a hýf s intenzívnym pučaním<sup>69</sup>. Biofilm *C. parapsilosis* je tvorený zhlukmi kvasinkových buniek priľnutých k povrchu s minimálnym podielom ECM (cit.<sup>70</sup>).

Bunky v biofilme môžu vykazovať zvýšenú rezistenciu voči antimykotikám, a to je príčinou zlyhávania antimykotickej terapie v praxi. Bolo zistené, že biofilmy po 48 hodinách kultivácie vykazujú v porovnaní s planktonickými bunkami *C. albicans* päť- až osemnásobne vyššiu rezistenciu voči amfotericínu B, flucytozínu, flukonazolu a itrakonazolu<sup>71</sup>. Zvýšenie odolnosti kandid vo forme biofilmu možno vysvetliť niekoľkými faktormi. Jedným z nich je zvýšená metabolická aktivita buniek vyskytujúca sa v ranom vývoji biofilmu, v čase vzniku adhenčnej vrstvy<sup>65</sup>. Ďalším dôvodom vzniku rezistentnejších biofilmov je skutočnosť, že EPS pôsobí ako bariéra pre difúziu liečiv. Bunky kvasiniek v biofilme s obsahom EPS odolávajú amfotericínu B o 20 % viac v porovnaní s rovnakými bunkami po odstránení EPS. Dôležitú úlohu pri rezistencii kvasiniek zohráva  $\beta$ -1,3-glukán, ktorý sa v matici biofilmu nachádza vo zvýšenom množstve. Extracelulárna  $\beta$ -1,3-glukánová matrica vycytáva amfotericín B, a tým zvyšuje antimykotickú odolnosť bunky. Neprítomnosť  $\beta$ -1,3-glukánu v matici zvyšuje citlivosť *C. albicans* na flukonazol a amfotericín<sup>72,73</sup>. Zmeny v génej expresii počas tvorby biofilmu *C. albicans* zahŕňajú zvýšenú aktivitu génov *CDR* a *MDR* kódujúcich rezistenciu na azoly. Táto regulácia sa javí ako dôležitá pre rozvoj antifungálnej rezistencie v počiatočnej fáze tvorby biofilmu, zatiaľ čo v procese dozrievania biofilmu sa javia ako podstatnejšie zmeny v zložení sterolov<sup>72,74</sup>. Prítomnosť perzistujúcich buniek v biofilme je ďalším dôvodom zníženej citlivosti voči antimykotikám. Perzistujúce bunky sú spiace, nedeľiace sa bunky, ktoré majú vysokú toleranciu k antimikrobiálnym liekom. Predpokladá sa, že táto tolerancia je mož-

ná vďaka pokojovej dobe bunky, ktorá umožňuje väzbu antimikrobiálnych liečiv na špecifický cieľ a zároveň zne- možňuje liečivu inhibovať funkciu cieľovej molekuly<sup>75</sup>. Ramage a spol. zistili, že bunky *C. albicans* v biofilme vykazujú rezistenciu voči flukonazolu, zatiaľ čo rovnaké bunky pestované v planktonickej forme sú na flukonazol citlivé. Zistili, že bunky perzistujúce v biofilme vykazujú aj zvýšenú expresiu génov *CDR* (cit.<sup>74</sup>). Rozdiely medzi jednotlivými druhmi *Candida* spp. zvyrazňujú zložitost' procesov, ktoré sú základom tvorby biofilmu a ťažkosti s hľadáním jedinečného spôsobu eradikácie biofilmov jednotlivých druhov rodu *Candida*.

Farmakologické stratégie pri terapii mykotických infekcií nereagujúcich na liečbu zahŕňajú použitie nových foriem antimykotík, ako je napr.  $\beta$ -cykloextrín itrakonazol, amfotericín B (lipidový komplex), amfotericín B (koloidná disperzia) alebo kombinácie viacerých antimykotík, napr. flukonazolu a flucytozínu, amfotericínu B a flukonazolu, kaspofungínu a flukonazolu<sup>42</sup>. Potenciálne alternatívna terapia zahŕňa použitie nových účinných látok získaných z rôznych všeobecných zdrojov, ako sú prírodné produkty, syntetické látky alebo polymérne materiály, u ktorých sa preukázalo, že sú aktívne *in vitro*. Rastliny sú zdrojom rôznych biologicky aktívnych molekúl, napr. silná antifungálna aktivita sa prejavila u zložiek éterických olejov<sup>75,76</sup>. Potvrdila sa antibiofilmová aktivita terpenov a mimoriadna účinnosť karvakrolu, geraniolu a tymolu pri liečbe kandidózy spojennej so zdravotníckymi pomôckami<sup>77,78</sup>. Vynikajúcu aktivitu proti kvasinkám *C. albicans* vykazujú terpenoidy, ktoré môžu byť použité aj v synergii s antimykotikom, napr. flukonazolom<sup>79</sup>. Ďalšími zlúčeniami s antimykotickou aktivitou získanými z rastlín sú saponíny, alkaloidy, peptidy a proteíny<sup>80</sup>. Stále sa však jedná o alternatívnu liečbu, ktorá nespĺňa podmienky pre použitie pri terapii systémových kvasinkových ochorení.

## 5. Záver

V posledných desaťročiach sa výskyt systémových mykotických ochorení dramaticky zvýšil z viacerých dôvodov, a to napr. v dôsledku nadmerného používania antibiotík, nárastu počtu pacientov so zníženou imunitou alebo chronickými ochoreniami, onkologických pacientov po chemoterapiách atď. Najčastejším patogénom sú oportúnne kvasinky z rodu *Candida*, ktoré u zdravých ľudí vystupujú ako komenzálne organizmy, ale v prípade systémovej kandidózy sú príčinou vysokej miery úmrtnosti. Dlhodobé používanie antimykotík pri liečbe infekcií spôsobených kvasinkami *Candida* spp. viedlo k vzniku rezistencie, ktorá spolu s tvorbou biofilmu vážne komplikuje terapiu týchto život ohrozujúcich mykóz.

### Zoznam skratiek

AUC	plocha pod krivkou
EPS	extracelulárne polymérne látky
ECM	extracelulárna matrica
ABC	ATP-Binding Cassette (ABC transportný proteín)

MFS Major Facilitator Superfamily  
MDR Multi-Drug-Resistance (rezistencia na viac liečiv)

## LITERATÚRA

- Nami S., Aghebati-Maleki A., Morovati H., Aghebati-Maleki L.: *Biomed. Pharmacother.* 110, 857 (2019).
- MacCallum D. M.: *Int. J. Microbiol.* 2012, 363764.
- Marak M. B., Dhanashree B.: *Int. J. Microbiol.* 2018, 7495218.
- Mikulska M., del Bono V., Ratto S., Viscoli C.: *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 755 (2012).
- Sydnor E. R. M., Perl T. M.: *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 141 (2011).
- Zaoutis T. E., Argon J., Chu J., Berlin J. A., Walsh T. J., Feudtner C.: *Clin. Infect. Dis.* 41, 1232 (2005).
- Pfaller M. A., Diekema D. J.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 4419 (2004).
- Kontoyiannis D. P., Mantidakis E., Samonis G.: *J. Hosp. Infect.* 53, 243 (2003).
- Chowdhary A., Becker K., Fegeler W., Gugnani H. C., Kapoor L., Randhawa V. S., Mehta G.: *Mycoses* 46, 269 (2003).
- Fotadar R., Banerjee U., Chaudhary A. R.: *J. Mycol. Med.* 110, 100 (2000).
- Viscoli C. a 11 spoluautorov: *Clin. Infect. Dis.* 28, 1071 (1999).
- Bamba Y., Moro H., Aoki N., Koizumi K., Ohshima Y., Watanabe S., Sakagami T., Koya T., Takada T., Kikuchi T.: *PLoS One* 13, e0206089 (2018).
- Brown G. D., Denning D. W., Gow N. A., Levitz S. M., Netea M. G., White T. C.: *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13 (2012).
- Cheng M. F. a 10 spoluautorov: *BMC Infect. Dis.* 5, 22 (2005).
- Kašparová P., Maňátková O., Čejková A.: *Chem. Listy* 113, 415 (2019).
- Walsh T. J., Groll A., Hiemenz J., Fleming R., Roilides E., Anaissie E.: *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 48 (2004).
- Chandra J., Mukherjee P.: *Microbiol. Spectr.* 3, 157 (2015).
- Silva S., Rodrigues C. F., Araújo D., Rodrigues M. E., Henriques M.: *J. Fungi (Basel)* 3, 8 (2017).
- Lagunes L., Rello J.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1221 (2016).
- Pilišiová R., Paulovičová E.: *Chem. Listy* 108, 457 (2014).
- d'Enfert C. a 31 spoluautorov: *FEMS Microbiol. Rev.* 45, fuaa060 (2021).
- Bellmann R., Smuszkiewicz P.: *Infection* 45, 737 (2017).
- Sádaba B., García-Quetglas E., Azanza J. R.: *Rev. Esp. Quimioter.* 17, 71 (2004).
- Azanza J. R., García-Quetglas E., Sádaba B.: *Rev. Iberoam. Micol.* 24, 223 (2007).
- Dhingra S., Cramer R. A.: *Front. Microbiol.* 8, 92 (2017).
- Espinel-Ingroff A. a 18 spoluautorov: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2006 (2014).
- Koselny K., Mutlu N., Minard A. Y., Kumar A., Krysan D. J., Wellington M.: *mBio* 9, e01204 (2018).
- Man S. M., Karki R., Kanneganti T. D.: *Immunol. Rev.* 277, 61 (2017).
- Wellington M., Koselny K., Sutterwala F. S., Krysan D. J.: *Eukaryot. Cell* 13, 329 (2014).
- Bhattacharya S., Esquivel B. D., White T. C.: *mBio* 9, e01291 (2018).
- Pfaller M. A., Messer S. A., Boyken L., Rice C., Tendolkar S., Hollis R. J., Diekema D. J.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 70 (2007).
- Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M. J., Monzon A., Rodriguez-Tudela J. L.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 917 (2006).
- Safdar A., van Rhee F., Henslee-Downey J. P., Singhal S., Mehta J.: *Bone Marrow Transplant.* 28, 873 (2001).
- Vazquez J. A., Peng G., Sobel J. O., Steele-Moore L., Schuman P., Holloway W., Neaton J. D.: *Clin. Infect. Dis.* 33, 1069 (2001).
- Kim Y. K., Lee J., Oh J., Rhee S. J., Shin S. H., Yoon S. H., Lee S., Kim H. S., Yu K. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01960-18 (2019).
- De Beule K., Van Gestel J.: *Drugs* 61, 27 (2001).
- Chen L., Krekels E. H. J., Verweij P. E., Buil J. B., Knibbe C. A. J., Brüggemann R. J. M.: *Drugs* 80, 671 (2020).
- Andes D., Marchillo K., Conklin R., Krishna G., Ezzet F., Cacciapuoti A., Loebenberg D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 137 (2004).
- Andes D., Marchillo K., Stamstad T., Conklin R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3165 (2003).
- Sienkiewicz B. M., Łapiński Ł., Wiela-Hojeńska A.: *Contemp. Oncol. (Pozn.)* 20, 365 (2016).
- Jin H., Wang T., Falcione B. A., Olsen K. M., Chen K., Tang H., Hui J., Zhai S.: *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1772 (2016).
- Spampinato C., Leonardi D.: *Biomed. Res. Int.* 2013, 204237.
- de Waard M. A., Andrade A. C., Hayashi K., Schoonbeek H. J., Stergiopoulos I., Zwiars L. H.: *Pest Manage. Sci.* 62, 195 (2006).
- Piddock L. J.: *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382 (2006).
- Sanglard D.: *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20, 462 (2002).
- Morio F., Pagniez F., Besse M., Gay-Andrieu F., Miegville M., Le Pape P.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 410 (2013).
- Morschhäuser J.: *Fungal Genet. Biol.* 47, 94 (2010).
- Mishra P. K., Baum M., Carbon J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11965 (2011).
- Silver P. M., Oliver B. G., White T. C.: *Eukaryot. Cell* 3, 1391 (2004).
- Whaley S. G., Caudle K. E., Vermitsky J. P., Chadwick S. G., Toner G., Barker K. S., Gygas S. E., Rogers P. D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4543 (2014).

51. Hirayama T. a 10 spoluautorov: *Pathogens* 10, e23 (2020).
52. Rybak J. M. a 16 spoluautorov: *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00651 (2017).
53. Anderson J. B.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 547 (2005).
54. Khosravi Rad K., Falahati M., Roudbary M., Farahyar S., Nami S.: *Curr. Med. Mycol.* 2, 24 (2016).
55. Hameed S., Fatima Z.: *Int. J. Microbiol.* 2013, 240209.
56. Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2300 (1996).
57. Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J.: *Microbiology (Reading)* 143, 405 (1997).
58. Gauthier C., Weber S., Alarco A. M., Alqawi O., Daoud R., Georges E., Raymond M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1543 (2003).
59. Schuetzer-Muehlbauer M., Willinger B., Egner R., Ecker G., Kuchler K.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 291 (2003).
60. Barchiesi F., Calabrese D., Sanglard D., Falconi Di Francesco L., Caselli F., Giannini D., Giacometti A., Gavaudan S., Scalise G.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1578 (2000).
61. Torelli R., Posteraro B., Ferrari S., La Sorda M., Fadda G., Sanglard D., Sanguinetti M.: *Mol. Microbiol.* 68, 186 (2008).
62. Prasad R., Nair R., Banerjee A.: *Fungal Genet. Biol.* 132, 103252 (2019).
63. Prasad R., Banerjee A., Khandelwal N. K., Dhamgaye S.: *Eukaryot. Cell* 14, 1154 (2015).
64. Douglas L. J.: *Rev. Iberoam. Micol.* 19, 139 (2002).
65. Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A.: *J. Bacteriol.* 183, 5385 (2001).
66. Cavalheiro M., Teixeira M. C.: *Front. Med. (Lausanne)* 5, 28 (2018).
67. Mitchell K. F., Zarnowski R., Andes D. R.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 931, 21 (2016).
68. Silva S., Henriques M., Martins A., Oliveira R., Williams D., Azeredo J.: *Med. Mycol.* 47, 681 (2009).
69. Bizerra F. C., Nakamura C. V., de Poersch C., Estivalet Svidzinski T. I., Borsato Quesada R. M., Goldenberg S., Krieger M. A., Yamada-Ogatta S. F.: *FEMS Yeast Res.* 8, 442 (2008).
70. Lattif A. A., Mukherjee P. K., Chandra J., Swindell K., Lockhart S. R., Diekema D. J., Pfaller M. A., Ghannoum M. A.: *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 265 (2010).
71. Hawser S. P., Douglas L. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2128 (1995).
72. Seneviratne C. J., Jin L., Samaranyake L. P.: *Oral Dis.* 14, 582 (2008).
73. Nett J., Lincoln L., Marchillo K., Massey R., Holoyda K., Hoff B., VanHandel M., Andes D.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 510 (2007).
74. Ramage G., Bachmann S., Patterson T. F., Wickes B. L., López-Ribot J. L.: *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 973 (2002).
75. Lewis K.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48 (2007).
76. Le N. T. a 13 spoluautorov: *Antibiotics (Basel)* 9, 207 (2020).
77. Dalleau S., Cateau E., Bergès T., Berjeaud J.-M., Imbert C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 572 (2008).
78. Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N. A., Echard B. W., Bagchi D., Preuss H. G.: *Mol. Cell. Biochem.* 228, 111 (2001).
79. Zore G. B., Thakre A. D., Jadhav S., Karuppayil S. M.: *Phytomedicine* 18, 1181 (2011).
80. Soliman S. S. M., Semreen M. H., El-Keblawy A. A., Abdullah A., Uppuluri P., Ibrahim A. S.: *BMC Complement Altern. Med.* 17, 257 (2017).

**Z. Malinovská, E. Čonková, P. Váczi, and M. Proškovcová** (*Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Košice, Slovakia*): **Azole Resistance in *Candida* Yeasts**

Systemic fungal diseases and antifungal resistance represent a serious problem in human medicine and contribute to increased patient mortality. The most common causes of these diseases are opportunistic yeasts of the genus *Candida*. *C. albicans* is considered to be the main pathogen, together with *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*. Azole antifungals predominate in the treatment of the systemic mycoses. For antifungal resistance in *Candida* spp. some genes and their mutations are responsible, the genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* being considered the most important. The main target of azole antifungals is the process of ergosterol synthesis. Due to ergosterol crucial functions and its unique structural properties, the synthesis of ergosterol and its individual steps represent the target of most clinically available antifungals. The biofilm appears to be a significant virulence factor of the yeast *Candida* spp. It allows hematogenous dissemination of cells, prevents the effect of antifungals on all cells during treatment and leads to a high level of antimicrobial resistance. The antifungal resistance in candidiasis often has a multifactorial origin, which must be considered in the treatment of systemic mycoses and in the development of new antifungals.

**Keywords:** *Candida*, antifungal susceptibility, resistance, biofilm, gene

- Malinovská Z., Čonková E., Váczi P., Proškovcová M.: *Chem. Listy* 116, 494–500 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220494>

*Acknowledgements*

*This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-15-0377.*