Antifungalna aktivnost mikafungina uz primjenu niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Zubović, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:347490

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Ema Zubović
0058219578

ANTIFUNGALNA AKTIVNOST MIKAFUNGINA UZ PRIMJENU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČNIH OTAPALA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Antifungalna aktivnost mikafungina uz primjenu niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Ema Zubović, 0058219578

Sažetak:

Mikafungin zbog širokog spektra djelovanja prema različitim vrstama mikroorganizama trenutno je najčešće upotrebljavani antimikotik, a zbog svojeg potencijala i predmet brojnih istraživanja. U sklopu ovog rada ispitana je i uspoređena antifungalna aktivnost čistog mikafungina i mikafungina otopljenog u izabranim eutektičkim otapalima (DES) prilikom čega su dobivena terapeutska niskotemperaturna eutektična otapala s aktivnom tvari (THEDES). Također je određena minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) navedenih kombinacija prema izabranim test mikroorganzmima. Dobiveni rezultati su pokazali da su čisti mikafungin kao i THEDES-i uspješno inhibirali plijesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus* kao i kvasce - *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida lypolitica* te *Candida famata*. Otapanjem mikafungina u DES-ovima došlo je do smanjenja minimalne inhibitorne koncentracije kod plijesni *A. niger* i *A. flavus* te kod kvasaca *C. famata* dok kod preostalih ispitanih kvasaca nije zabilježen pozitivan efekt na MIK.

Ključne riječi: mikafungin, antifungalna aktivnost, eutektična otapala

Rad sadrži: 29 stranica, 10 slika, 2 tablice, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Datum obrane: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Antifungal activity of micafungin with the use of therapeutic deep eutectic solvents

Ema Zubović, 0058219578

Abstract:

Micafungin, due to its broad spectrum of activity against various types of microorganisms, is currently the most commonly used antifungal agent and it is also the subject of numerous studies because of its potential. In this study, the antifungal activity of pure micafungin and micafungin dissolved in selected eutectic solvents (DES) was tested and compared, which resulted and gave therapeutic low-temperature eutectic solvents with an active ingredient (THEDES). The minimal inhibitory concentration (MIC) of these combinations against selected test microorganisms was also determined. The obtained results showed that both pure micafungin and THEDES successfully inhibited molds *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, as well as yeasts *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida lypolitica*, and *Candida famata.* Dissolved micafungin in DES resulted reduction of the minimal inhibitory concentration for molds *A. niger* and *A. flavus*, and for yeast *C. famata*, while no positive effect on MIC was observed for the remaining tested yeasts.

Keywords: micafungin, antifungal activity, deep eutectic solvents

Thesis contains: 29 pages, 10 figures, 2 tables, 40 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Thesis defended: June 17, 2024

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. GLJIVE 2
2.2 MIKOZE 3
2.2.1. ASPERGILOZA 3
2.2.2. KANDIDIJAZA 5
2.2.3. BOLESTI UZROKOVANE BAZIDIOMICETAMA 6
2.3. MIKOTOKSIKOZE 7
2.4. ANTIMIKOTICI 7
2.4.1. AMFOTERICIN B 8
2.4.2. AZOLI 8
2.4.3. EHINOKANDINI 9
2.4.3.1. MIKAFUNGIN 9
2.4.3.1.1. PRIMJENA MIKAFUNGINA U LIJEČENJU 10
2.5. PRIMJENA THEDESA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. MATERIJALI 13
3.1.1. MIKROORGANIZMI 13
3.1.2. MIKAFUNGIN 13
3.1.3. HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ KVASACA I PLIJESNI 14
3.1.4. PRIBOR I OPREMA 14
3.2. METODE 15
3.2.1. ČUVANJE MIKROORGANIZAMA 15
3.2.2. UZGOJ MIKROORGANIZAMA 15
3.2.3. NEIZRAVNO ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA BROJANJEM PORASLIH KOLONIJA NA ČVRSTOJ HRANJIVOJ PODLOZI U PETRIJEVOJ ZDJELICI (BROJ ŽIVIH MIKROORGANIZAMA) 15
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIFUNGALNE AKTIVNOSTI DISK DIFUZIJSKOM METODOM 15
3.2.4. ODREĐIVANJE MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIC) 16

4. REZULTATI I RASPRAVA 18

5. ZAKLJUČCI 24

6. POPIS LITERATURE 25

1. UVOD

Mikafungin je danas sve češće upotrebljavani antimikotik koji zajedno s kaspofunginom i anidualfunginom pripada skupini ehinokandina, najnovijih antimikotika koji se koriste u liječenju različitih gljivičnih infekcija. Princip djelovanja ovih agenasa je inhibicija stanične stijenke koja patogenima daju čvrstoću i oblik. Prema svim glavnim vrstama *Candida*, *Aspergillus*, te manje uobičajenih patogenim vrstama poput *Paecilomyces* i *Penicillium* mikafungin ima snažno *in vivo* i *in vitro* djelovanje (Enoch i sur. 2014).

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES) karakterizira niska hlapljivost i zapaljivost te vrlo dobra kemijska i termička stabilnost što ih čini zanimljivima za stvaranje poboljšanih verzija otapala. Dizajniranjem DES-a s određenim komponentama moguće je dobiti eutektičke smjese s niskom toksičnošću i visokom biorazgradivošću. Dodatkom, odnosno otapanjem aktivne tvari u DES-ovima dobivena su terapeutska niskotemperaturna eutektična otapala s aktivnom tvari (THEDES). THEDES se definira kao mješavina dviju komponenti koje pri određenom molarnom sastavu postaju tekuće pri sobnoj temperaturi i u kojima je jedna od njih aktivni farmaceutski sastojak (API) (Mannu i sur., 2021).

Stoga je cilj ovog rada bio odrediti antifungalnu aktivnost čistog mikafungina prema izabranim test mikroorganizmima te mikafungina otopljenog u eutektičnim otapalima. Također je određena minimalna inhibitorna koncentracija navedenih kombinacija kako bi se vidjelo da li otapanjem mikafungina u eutektičnim otapalima dolazi do boljeg djelovanja navedene aktivne tvari, tj.postiže li se sinergijski učinak navedenih komponenti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GLJIVE

Gljive (fungi) su eukariotski, heterotrofni, nefotosintetski organizmi od kojih su najveći broj saprofiti (žive na mrtvoj organskoj tvari koja im je izvor hrane). Većina su višestanični oblici, a kvasci spadaju u jednostanične. Karakteriziraju se kao aerobi ili fakultativni anaerobi. Stanice su obavijene staničnom stijenkom (hitinom) a razmnožavaju se sporama koje mogu biti spolne i nespolne. U gljive ubrajamo plijesni, kvasce, mesnate gljive, rđe, snijeti, gube, puhare, simbionte te parazite. Gljive klasificiramo u pet taksonomskih skupina na osnovi tipa spora, morfologije hifa, spolnog ciklusa; *Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes, Oomycetes*. Osim njihove važnosti u razgradnji mrtve organske tvari u ekosustavima, njihova uloga neizostavna je u mnogim biotehnološkim procesima poput proizvodnje lijekova i hrane (Stepheson, 2022; Markov, 2022).

Jedna od zanimljivosti jest i njihova ključna uloga u globalnom ciklusu ugljika jer spadaju među glavne razlagače biomase, a posebice se to odnosi na razgradnju lignina u prirodi . Mnoga istraživanja pokazala su njihovu značajnu ulogu u kruženju ugljika i energije. Ipak sama količina oslobođenog ugljika varira i ovisi o vrsti, karakteristikama i funkcijama različitih gljiva (Gall i sur.,2022).
Gljive mogu imati i negativan učinak i biti uzročnici različitih bolesti odnosno fungalnih infekcija koje nazivamo mikozama, koje se mogu klasificirati kao: sustavne, potkožne, kožne, površinske i oportunističke. Mikotoksikoze bolesti su uzrokovane aktivnošću sekundarnih produkata metabolizma patogenih plijesni- mikotoksinima.

2.2 MIKOZE

Gljive mogu uzrokovati različite mikoze koje mogu zahvatiti različite dijelove tijela kod ljudi poput kože, noktiju, sluznice i kose. Patogene gljive uzrokuju bolesti kod ljudi zbog njihove sposobnosti prijanjanja u ljudskom organizmu, izlučivanja različitih toksina i enzima te mijenjanja svog oblika, što omogućuje njihov ulazak u organizam, razmnožavanje i oštećenje tkiva, rezultirajući različitim infekcijama. Prijanjanje na površinu ljudskih stanica, koje je prvi korak prema nastanku određenih bolesti, postiže se uslijed hidrofobne površine gljiva i djelovanja Van der Waalsovih sila. Gljive mogu prouzročiti tri osnovne vrste mikoza kod ljudi: tropske mikoze, dermatomikoze i sistemske mikoze (Stepheson, 2022). Dermatomikoze su oboljenja kože i njezinih dodataka poput vlasišta i noktiju koja su uzrokovana gljivicama. Dermatomikoze se mogu klasificirati u: a) dermatomikoze prouzročene dermatofitima ili dermatofitozama, b) dermato-mikoze uzrokovane kvascima, te c) dermatomikoze izazvane plijesnima (Skerlev, 2007). Skupinama dermatomikoza pripadaju rodovi gljiva *Trichophyton, Microsporum i Epidermophyton*. Tropske mikoze izazivaju egzogene infekcije te su ove gljivice opće prisutne i najčešće se javljaju u tropskim područjima. Primjeri ovih gljiva uključuju: *Spirotrix schenckii, Rhinosporidium seeberi, Fonsecaea pedrosci, Fonsecaea compacta, Phialophora verrucosa, Egzophilia jeanselmei* i dr. Gljive koje uzrokuju sistemske mikoze mogu preživljavati kao endosaprofiti u ljudskoj koži ili kao egzosaprofiti u tlu i na biljkama. Ove infekcije često se pojavljuju kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom, kao što su pacijenti oboljeli od AIDS-a (Živanović i sur., 2009). Prevenirati mikoze moguće je uz pravilno i redovno održavanje higijene, nošenje čiste odjeće te izbjegavanje dijeljenja osobnih predmeta kao što su ručnici, odjeća i obuća.

2.2.1. Aspergiloza

Aspergillus spp. su filamentozne gljivice koje uzrokuju širok spektar infekcija kod ljudi, uključujući reakcije preosjetljivosti, kronične plućne infekcije te akutne i po život opasne infekcije, pri čemu se najčešće javljaju kod imunokompromitiranih osoba. Poznato je preko 250 vrsta *Aspergillus,* a za njih manje od 40 utvrđeno je da uzrokuju infekcije kod ljudi. Među njima se pak najviše ističe *Aspergillus fumigatus* kao najčešći uzročnik ozbiljnih invazivnih bolesti. Globalne procjene iz 2017. godine ukazuju na više od 3.000,00 slučajeva kronične plućne aspergiloze (CPA) i oko 250.000 slučajeva invazivne aspergiloze (IA) godišnje. Kronična plućna aspergiloza napreduje sporije od invazivne aspergiloze i pogađa pacijente s već postojećom plućnom patologijom, kao što su aktivna ili prethodna tuberkuloza i ne-

tuberkulozne mikobakterijske infekcije, prethodne operacije za rak pluća, kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) ili sarkoidoza (Jenks i Hoengil, 2018).

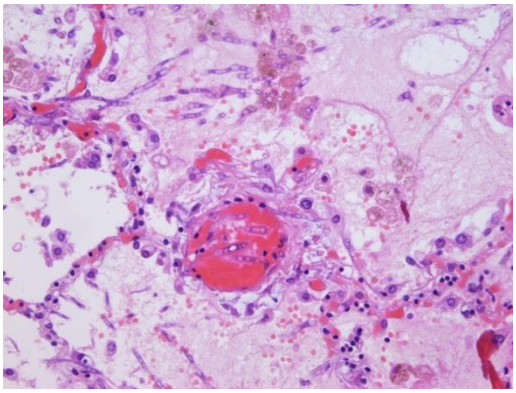
Postoje dvije vrste aspergiloze-invazivna i neinvazivna aspergiloza te ih se često teško razlikuje.

Invazivna aspergiloza se najčešće javlja kod bolesnika s teškim oblikom imunosupresije i karakterizirana je infekcijom nalik pneumoniji koja često brzo napreduje i u kojoj gljivica napada plućni parenhim, a posebice ima tendenciju invazije na krvne žile, uzrokujući tako infarkt pluća. Invazivna aspergiloza glavni je uzrok i smrtnosti kod imunokompromitiranih pacijenata. Faktori rizika se i dalje razvijaju i uključuju novije biološke agense koji ciljaju imunološki sustav te postinfekcije nakon gripe. Novija istraživanja zabilježila su pojavu i prisutnost aspergiloze nakon infekcije COVIDOM-19 (Cadena i sur., 2021).

S obzirom da je uvelike povezana s oslabljenim imunološkim sustavom, ovakav oblik naziva se još i sekundarna invazivna aspergiloza.

Neinvazivna aspergiloza je najčešći oblik i javlja se u obliku kroničnog sinusitisa (kuglice plijesni *Aspergillus* prisutne su u sinusu) koji ne reagira na klasično medicinsko liječenje. Zabilježni su također i slučajevi prelaska neinvazivne aspergiloze u invazivni oblik (Ota i sur., 2010).

Od primarne važnosti kod liječenja protiv invazivnih aspergiloza je upravo rano otkrivanje i antifungalna terapija, dok kirurgija igra važnu ulogu uglavnom u rjeđim manifestacijama bolesti, uključujući sinusitis i osteomijelitis. Upotreba antifungalnih agensa kao lijeka u primjerima ove vrste bolesti uključuje triazol, amfotericina B i ekinokandine (Jenks i Hoenigl, 2018).



Slika 1. Prikaz stanica pluća zaraženih vrstom *Aspergillus* sp. (anonymus 1)

2.2.2. Kandidijaza

Do danas je zabilježeno da više od 17 različitih vrsta roda *Candida* uzrokuje invazivnu kandidijazu kod ljudi, a vrsta *Candida albicans* je najčešća vrsta u svijetu. Invazivna kandidijaza (također poznata kao sistemska kandidijaza ili hematogeno diseminirana kandidijaza) uključuje infekciju i širenje ovog kvasca putem krvotoka u mozak, bubrege, srce, pluća i jetra. Imunokompromitirane i imunodeficijentne osobe, odnosno osobe s dijabetesom, neutropenijom, opeklinama, pacijenti s intravaskularnim kateterima, na hemodijalizi, pacijenti koji su podvrgnuti abdominalnim operacijama ili oni na potpunoj parenteralnoj prehrani, te osobe na produljenoj terapiji antibioticima širokog spektra ili kortikosteroidima posebno su osjetljivi na *C. albicans*. (Lim i sur., 2012). Antifungalna rezistencija je danas sve veća prijetnja, što rezultira poteškoćama u liječenju i uklanjanju ovakvih vrsta infekcija.

Virulencija kao sposobnost mikroorganizma da uzrokuje određenu bolest opisuje stupanj patogenosti te je određena različitim čimbenicima, a neki sojevi mogu biti više ili manje virulentni od drugih. Jedna od važnijih karakteristika *C. albicans* je njena prilagodljivost u preživljavanju na različitim djelovima tijela što je posljedica prisutnosti nekoliko faktora virulencije uključujući prijanjanje na stanice domaćina, lučenje degradativnih enzima i promjenu morfologije (Lim i sur., 2012).

Candida glabrata drugi je najčešći uzročnik infekcija krvotoka nakon *C. albicans*. Učestalost pak raste zbog sve veće populacije imunokompromitiranih osoba i široke primjene antimikotika. Ova vrsta također je jedan od najčešćih uzročnika u slučajevima oralnih infekcija i vaginitisa (Cooper, 2011).

Najčešće izolirana od pacijenata koji boluju od neutropenije, *Candida krusei* identificirala se kao patogen u nekih pacijenata koji su primali profilaktičku terapiju flukonazolom. Ova vrsta kvasca spada također u jedne od uzročnika vaginitisa (Cooper, 2011).

Candida spp. kao oportunistički patogen, iskorištava oslabljeni imuno sustav domaćina s ciljem uzrokovanja bolesti u bilo kojem dijelu tijela. Posljednjih nekoliko desetljeća kandidijaze uzrokovane ovom vrstom, sve su češći slučaj. Jedan od razloga je primjena imunosupresivnih terapija za druge bolesti, a neka izvješća pokazuju da glavno mjesto zaraze mogu biti upravo zdravstvene ustanove. *Candida spp*. je tako četvrti najčešći uzročnik bolničkih infekcija u Sjevernoj Americi (Cooper, 2011).
Rezistencija na antimikotike postojeći je problem kod svih gljivičnih bolesti pa tako i kandidijaze, vrste *Candida spp.* pokazale su otpornost na lijekove najčešće prvog izbora poput ehinokandina i flukonazola (Pappas i sur., 2018).

2.2.3. Bolesti uzrokovane bazidiomicetama

Glavni patogeni rodovi ove skupine su *Cryptococcus* i *Malassezia* te se pokazalo da pogađaju značajno više osoba za razliku od rodova kao što su *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* i *Ustilago*. Rod *Cryptococcus* obuhvaća najmanje 70 vrsta koje su izolirane iz različitih staništa i životinja na svim kontinentima. Vrste *Cryptococcus laurentii, Cryptococcus curvatus* i *Cryptococcus albidus* uzrokuju povremene infekcije koje se nazivaju kriptokokoze, dok se samo dvije vrste *Cryptococcus neoformans* i *Cryptococcus. gattii* klasificiraju kao patogeni za ljude (Cooper, 2011).
Malessezia spp. se smatra normalnim pripadnikom mikrobioma kože, iako može uzrokovati određene kliničke probleme. U određenim uvjetima izaziva površinske infekcije kože koje se javljaju na dijelovima tijela na kojima se luči sebum kao što su lice, čelo, tjeme i leđa. Klinička stanja poput seboreičnog dermatitisa i peruti pripisuju se infekciji uzrokovanoj s *Malassezia* sp.. Neke vrste ovog roda uzročnici su i drugih dermatoza kao što su atopijski ekcem/dermatitis, otitis, folikulitis i psorijaza (Cooper, 2011).

Manje poznati rodovi skupine bazidiomiceta su *Richosporon spp., Rhodotorula spp.i Sporobolomyces spp.* Ove vrste ne uzrokuju velik broj infekcija ali ih je vrlo teško liječiti zbog individulanog stanja bolesnika i izbora prikladnih antifugalnih režima (Cooper, 2011).

2.3. MIKOTOKSIKOZE

Bolesti uzrokovane mikotoksinima kao sekunadrnim produktima metabolizma plijesni nazivamo mikotoksikozama, a najčešće je mikotoksine moguće pronaći u hrani i krmivu gdje uzrokuju velike probleme. Mikotoksini kod ljudi i životinja mogu biti karcinogeni, genotoksični i mutageni. Identificirano je više od 400 kemijski i strukturalno različitih vrsta mikotoksina štetnih za ljude i životinje. Ptice tako mogu oboljeti od mikotoksikoza ako se hrane kontaminiranom hranom koja sadrži visoke koncentracije mikotoksina. Posljedično se upravo ti toksini nakupljaju u jetri, bubrezima i mišićnom tkivu, a ljudi koji konzumiraju takvo kontaminirano meso odnosno hranu skloni su trovanju. Kuhanje mesa navodi se kao metoda dekontaminacije, ali to nažalost nije jedan od načina prevencije jer inaktivacija mikotoksina nastaje daleko iznad granica temperatura pečenja (Khatoon i Abidin, 2018). U zemljama u kojima prevladavaju povoljniji uvjeti za rast plijesni i sintezu, kao što je tropska klima, prevladavaju oblici akutne mikotoksikoze koje nastaju pri izloženosti životinja i ljudi velikoj koncentraciji mikotoksina. (Peraica i sur., 2012). U zemljama s umjerenom klimom akutne mikotoksikoze su pak rjeđi slučaj. Postoje također i kronične mikotoksikoze koje nastaju pri dugotrajnoj izloženosti nekom mikotoksinu ranjivih skupina, životinja i ljudi. Različite vrste mikotoksina imaju drugačije ciljane organe toksičnog djelovanja, na pokusnim životinjama je tako dokazano da je za alfatoksin B_1(AFB_1) to jetra, za okratoksin A (OTA) bubrezi, a za zearalenon (ZEA) reproduktivni sustav. Dokazano je i da izloženost AFB_1 uzorkuje maligne tumore kod ljudi, a prema istraživanjima provedenim na životinjama pretpostavlja se da bi karcinogeni i za ljude mogli biti fumonizin B1(FB_1) i okratoksin A (OTA). Navedeni mikotoksini uslijed prisutnosti u hrani i krmivu čine ljude trajno izloženima navedenim opasnostima (Peraica i sur., 2012).

2.4. ANTIMIKOTICI

Antimikotici klasificiraju se u 4 najnovije skupine čiji se antifungalni agensi koriste protiv različitih vrsta i uzročnika mikoza. Razlikujemo ehinokandide, azole, flucitozine i poliene koji se međusobno razlikuju i po mehanizmu djelovanja. Najstarija upotreba antimikotika pogodnih za terapijske učinke kod ljudi upravo se odnosi na poliene s obzirom na njihovo otkriće u 1950-ima. Ehinokandini su pak najčešće danas rasprotranjeni i korišteni animikotici, a kaspofungin je prvi ehinokandin odobren 2001. godine kao pogodan i učunkovit za ljude (Wall i sur., 2020). Azoli su najčešći izbor za liječenje oralnih kandidijaza (Iversen i sur., 2021).

2.4.1. Amfotericin B

Amfotericin B (AmB) jedan je od najstarijih, ali i najučinkovitijih antimikotika. Međutim, njegova je korisnost i efikasnost ograničena zbog nuspojava osobito nefrotoksičnosti. Kako bi se poboljšala njegova općenita sigurnost i konzumacija, nove farmaceutske formulacije amfotericina B posebno su dizajnirane za smanjenje njegovih štetnih učinaka na bubrege. Među klinički dostupnim vrstama ističu se amfotericin B deoksikolate (ABD), liposomalni ampfotericin B (LAB) i amphotericin B lipidni kompleks (Hagiya i sur., 2023). Istraživanje provedeno od autora Agarwal i sur. (2023) ističe ulogu primjene injekcije amfotericina B. Pandemija COVID-19 rezultirala je zamijetnim porastom broja slučajeva mukormikoze. Kirurški zahvat u ovim slučajevima ostaje pak najpogodnije rješenje, ali istraživanje je ispitivalo liječenje dva pacijenta primjenom lokalnog amfotericina B (AmB). Rezultati su ukazali da rani zahvat za gljivični sinusitis u obliku lokalnog AmB-a može izbjeći potrebu za invazivnijim liječenjem. Osim utjecaja i liječenja gljivičnih bolesti primjena amfotericina B u novijim istraživanjima pokazala se učinkovita kod specfičnih dermatoloških stanja. AmB ispitivao se kao potencijalni inhibitor enzima tirozinaze odgovornog za produkciju melanina, pigmenta koji organizmu daje boju. Abnormalna produkcija melanina pak vodi do specifičnih dermatoloških stanja poput hiperpigmentacije, melazme, pojave pjegica.Rezultati su pokazali da je amfotericin B pokazao najvišu veznu učinkovitost protiv ljudske tirozinaze među 3210 FDA-odobrenih lijekova dostupnih u ZINC bazi podataka (Mahalapbutr i sur., 2023).

2.4.2. Azoli

U skupinu azola ubrajaju se flukonazol, itrakonazol, vorikonazol i posakonazol. Antifungalni azoli su kemijski klasificirani kao imidazoli ili triazoli na temelju broja atoma dušika (dva ili tri, redom) u azolnom prstenu. Vorikonazol,-triazol druge generacije, razvijen je sustavnom kemijskom manipulacijom flukonazola kako bi se proizveo spoj s pojačanom snagom i spektrom djelovanja. Struktura vorikonazola slična je flukonazolu, ali je jedan triazolni prsten zamijenjen fluoriranim pirimidinom, a alfa metilna skupina dodana je u propanolni kostur (Andes i Dismukes, 2010). Ove modifikacije povećavaju afinitet vorikonazola prema ciljnom enzimu u *Aspergillus fumigatus* za 10 puta u odnosu na flukonazol. Posakonazol je kemijski sličan itrakonazolu. Strukture oba azola sadrže proširene bočne lance piperazin-fenil-triazola, dok se posakonazol sastoji od furanskog prstena s fluorom. Ovi azolni lijekovi također se mogu razlikovati po svojoj relativnoj veličini molekule i topljivosti u vodi (Andes i Dismukes, 2010). Flukonazol je jedinstven među antifungalnim azolima zahvaljujući svojoj relativno maloj veličini molekule i dobroj topljvosti u vodi. Itrakonazol, vorikonazol i posakonazol manje su topljivi ili

netopljivi u vodi pri fiziološkom pH, čime se smanjuje njihova oralna bioraspoloživost i otežava razvoj prikladnog parenteralnog oblika doziranja. Azoli posjeduju široki spektar djelovanja prema većini gljivičnih patogena povezanih sa sistemskim infekcijama. Među vrstama *Candida*, azoli su najučinkovitiji protiv *C. albicans, Candida. parapsilosis, Candida tropicalis, Candida lusitaniae i Candida dubliniensis* (Andes i Dismukes, 2010).

2.4.3. Ehinokandini

Ehinokandini su najnoviji antimikotici u borbi protiv gljivičnih infekcija. Po svojoj kemijskoj strukturi su lipopeptidi sintetski modificirani iz fermentacijskih bujona raznih gljiva. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je tri vrste ehinokandina: kaspofungin, mikafungin i anidulafungin. Ovi agensi imaju široki spektar djelovanja i slični su jedni drugima s obzirom na *in vitro* aktivnost prema *Candida* sp., pri čemu mikafungin i anidulafungin imaju slične minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), generalno niže u odnosu na kapsofungin (Cappelletty i Eiselstein, 2007).

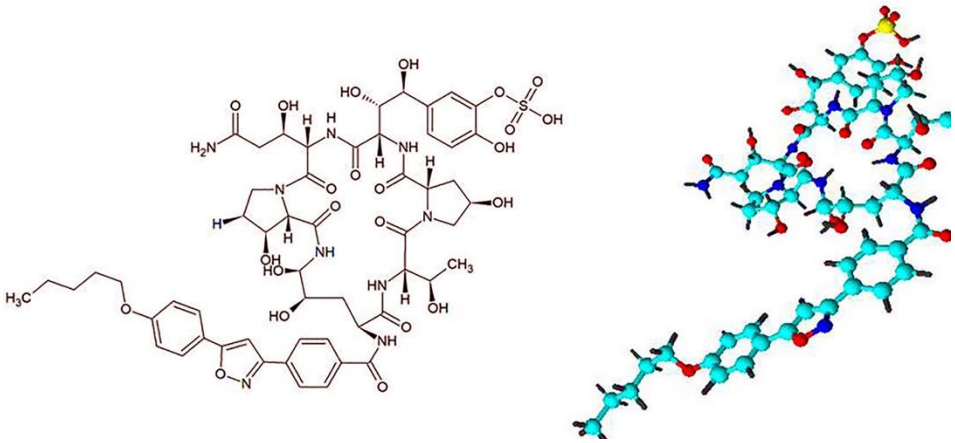
Mehanizam djelovanja ehinokandina je inhibicija sinteze β-1,3-glukana, koji zajedno s hitinom osigurava cjelovitost i oblik stanične stijenke gljiva. Inhibicija se temelji na vezanju ehinokandina na β-1,3-D-glukan sintazu, blokirajući tako samu sintezu β-1,3-glukana. Ova vrsta inhibicije rezultira osmotskom liazom stanice i u konačnici fungicidnim djelovanjem prema *Candida* spp. (Cappelletty i sur., 2007).

Provedeno istraživanje pokazalo je da monoterapija u kojoj su se ehinokandini (mikafungin i kaspofungin) primjenjivali intravenozno bila jednako učinkovita kao i drugi antimikotici (amfotericin B, itrakonazol) u liječenju sistemske kandidijaze kod imunokompromitiranih bolesnika. Pokazala se također i prednost korištenja ehinokandina nad široko rasprostranjenim i primjenjenim amfotericinom B prilikom čega se izbjegavaju ozbiljni štetni učinici poput nefrotoksičnosti (Tang i sur., 2023).

2.4.3.1. Mikafungin

Mikafungin (MICA) je trenutno najčešće upotrebljavani antimikotik iz skupine ehinokandina. Dobiva se kemijskom modifikacijom cikličkog heksapeptida, produkta fermetacije gljive *Coleophoma empetri*. Posjeduje širok spektar djelovanja *in vivo* te *in vitro* protiv vrsta kao što su *Aspergillus* i *Candida* spp., a za poboljšanje antifungalnog učinka može mu se dodati N-

acilni bočni lanac. Mehanizam djelovanja mikafungina temelji se na nekompetitivnoj inhibiciji sinteze 1,3-β-D-glukana, kao važne komponente prisutne u staničnoj stijenci gljivica. Kontinuirana sinteza 1,3-β-D-glukana iznimno je važna i neophodna za održavanje integriteta i čvrstoće stanične stijenke ovih mikroorganizama, a inhibicija te sinteze dovodi do gubitka osmotske nestabilnosti, što posljedično dovodi do smrti stanice (Marena i sur., 2021).



Slika 2. Kemijska struktura i 3-D konformacija mikafungina (Marena i sur., 2020)

2.4.3.1.1. Primjena mikafungina u liječenju

Kao što je prethodno navedeno mikafungin je antimikotik visokog polarnog afiniteta i zahvaljujući toj značajci upotrebljava se u formulacijama za intravenoznu primjenu. Ovaj je lijek odobren za liječenje odraslih i djece s dijagnosticiranim gljivičnim infekcijama uzrokovanim patogenim vrstama *Candida* sp. i *Aspergillus* sp. S obzirom na eksponencijalni porast sistemskih gljivičnih infekcija posljednjih godina, MICA je najčešće korišteni lijek i u slučajevima težih infekcija. Obzirom na njegovu sve češću primjenu, istraživači razvijaju različite analitičke metode za identifikaciju i kvantificiranje MICA u biološkim proizvodima i farmaceutskim formulacijama (Marena i sur., 2021). Uz dobru podnošljivost odraslih i pedijatrijskih bolesnika, istraživanja također pokazuju da mikafungin ne zahtijeva prilagodbu kod bolesnika s bubrežnim i jetrenim oštećenjem. Osim navedene učinkovitosti protiv *Candida* sp. MICA također pokazuje sigurnost i učinkovitost i u interakcijama s drugim lijekovima što ga čini poželjnim u liječenju bolesti poput kandidijaze jednjaka i profilakse tijekom invazivnih infekcija vrstom *Candida* (Joseph i sur., 2012).

U istraživanju Jospeh i sur. (2012) sudjelovalo je 882 odrasla i pedijatrijska bolesnika koji su primali mikafungin i flukonazol u izabranim koncentracijama s ciljem liječenja gljivičnih infekcija tijekom neutropenijske faze prije transplatacije hematopoetskih matičnih stanica. Ukupne stope uspješnosti liječenja bile su značajno veće u skupini koja je primala mikafungin u odnosu na skupinu koja je primala flukonazol tj. 80 % u odnosu na 73,5 %.

Sigurnost i podnošljivost bolesnika za primjenu mikafungina ispitivana je i u istraživanju autora Torre i sur. (2014). Rezultati su pokazali da od preko 3.000 pacijenata koji su primili mikafungin kao terapiju liječenja u slučajevima za kandidijazu i njene različite oblike te invazivnu aspergilozu, trećina njih doživjela je nuspojave povezane s liječenjem. Nuspojave bile su pak rjeđi slučaj kod pedijatrijskih bolesnika što je ukazivalo na dobru podnošljivost i učinkovitost samog lijeka.

Primjena mikafungina istraživana je ne samo kod gljvičnih infekcija, već i kod liječenja onkoloških bolesnika. Mikafungin, antifungalno sredstvo koje inhibira proizvodnju 1,3-β-D-glukana u gljivičnim staničnim stijenkama, djeluje kao inhibitor koji cilja ubikvitin konjugirajući enzim (UBE2M) koji ima ključnu ulogu u procesu povezivanja (konjugacije) molekula ubikvitina na ciljne proteine, što ih označava za razgradnju ili sudjelovanje u drugim staničnim procesima. U opisanim stanjima oboljelih regulacija UBE2M je ključna. MIikafungin svojom interakcijom s UBE2M blokira vezanje istoimenog enzima na ciljane molekule te inducira oštećenje DNA u stanicama želučanog karcinoma. (Mamun i sur., 2023)

2.5. PRIMJENA THEDESA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

THEDES odnosno niskotemperaturno eutektičko otapalo s izraženim bioaktivnim komponentama definira se kao mješavina dviju komponenti koje pri određenom molarnom sastavu postaju tekuće pri sobnoj temperaturi i u kojima je jedna od njih aktivni farmaceutski sastojak (API) (Duarte i sur., 2017). Farmaceutska industrija suočava se s velikim izazovima vezanim za topljivost i propusnost lijekova, što rezultira neadekvatnom farmakokinetikom i slabom bioraspoloživošću aktivnog farmaceutskog sastojka (API).

Novije vrste THEDESA razvijene su na bazi kolin klorida i askorbinske kiseline u molarnom omjeru 2:1 s ili bez deksametazona. Kolin klorid koji najčešće dolazi u kombinaciji sa skupinama B vitamina, u formulacijama otapala nalazi se zbog važne uloge u metaboličkim funkcijama koja uključuje sintezu fosfolipida, neurotransmitera te kao donora metilnih skupina.

Askorbinska kiselina poznatija kao vitamin C ističe se u poticanju biosinteze kolagena, pružanju foto-zaštite, smanjenju sinteze melanina te jačanje imuniteta. Deksametazon je glukokortikoid niske topljivosti u vodi i koristi se za sprječavanje ili čak suzbijanje upale nastale inhibicijom proizvodnje vazoaktivnih, kemoatraktivnih čimbenika te lipolitičkih i proteolitičkih enzima (Silva i sur., 2018).

Novija istraživanja fokusirana su i na primjenu THEDES-a uz pomoć zelene tehnologije s ciljem razvoja ekološki prihvatljivijih, sigurnijih i učinkovitijih lijekova. Upotreba THEDES-a u kombinaciji sa superkritičnim CO_2 počela se istraživati radi formuliranja sustava dostave lijeka primjenom zelene tehnologije. Istraživanje Roda i sur. (2020) imalo je za cilj razvoj THEDES dostavnih sustava u terapiji tuberkuloze, kroz inkapsulaciju L-arginin baziranih THEDES-a u lipidnu matricu, putem tehnologije superkritičnog CO_2, a rezultati učinkovitosti inkapsulacije bili su oko 75 % što je pokazalo uspješnost inkapsulacije tekućih terapeutskih eutektičkih otapala pomoću tehnologije superkritičnih fluida.

Duarte i sur. (2017) razvili su THEDES na bazi mentola u kombinaciji s ibuprofenom, fenilacetilnom kiselinom i bornom kiselinom, u različitim omjerima. Rezultati su pokazali da je u pripremljenim THEDES-ima došlo do povećane topljivosti aktivne tvari u izotoničnoj otopini pri pH 7,4, te povećane propusnosti.

Silva i sur. (2018) su istraživali formulacije THEDES-a na bazi mentola i zasićenih masnih kiselina različitih duljina lanaca i pratili njihov biološki utjecaj na rast patogenih bakterija i stanične kulture keranocita. Rezultati su pokazali dobru antibakterijsku aktivnost prema *Staphylococcus epidermis* i *Staphylococcus aureus* i uspjeh u zaciijeljivanju rana.

Novije istraživanje autora Yin i sur. (2022) u fokusu je imalo razvoj THEDES-a s ostolom (derivat kumarina) i paenolom (fenolni spoj) a rezultati su pokazali kako ova kombinacija zadržava bioaktivnost čistih API-ja i pokazuje bolju topljivost u odnosu na topljivost u vodi te bolju propusnost THEDES-a.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišteni u ovom završnom radu dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada korišteni su kvasci: *Candida utilis* 11, *Candida lipolytica* 33M, *Candida albicans* 86, *Candida famata* SL-K te plijesni *Aspergillus niger* Z100 i *Aspergillus flavus* Z107.

3.1.2. Mikafungin

U radu je korištena otopina mikafungina u PBS (**P**hosphate **B**uffered **S**aline) puferu pH 7,4 u koncentracijama 50 µg/ml i 100 µg/ml. Ostale otopine uključivale su mikafungin otopljen u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima tj. DES-ovima (**D**eep **E**utectic **S**olvents) u istim koncentracijama. Prikaz korištenih eutektičnih otapala nalazi se u tablici 1. Otapanjem aktivne farmaceutske supstance (API) u ovom slučaju mikafungina u DES-u dobiva se terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo (THEDES).

Tablica 1. Prikaz korištenih niskotemperaturnih eutektičnih otapala

Naziv otapala	Sastav	Molarni udio
THEDES 1	Betain:Sukraloza Mikafungin	
THEDES 2	Betain:Etilen-glikol Mikafungin	
DES1	Betain:Sukraloza	4:1
DES2	Betain:Etilen-glikol	1:2

3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca i plijesni

- SA (sladni agar) sastava: sladni ekstrakt 30 g/l; agar 17 g/l. pH vrijednost podloge je 5.5±0.1; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15 min.
- SB (sladni bujon) je istog sastava kao sladni agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

3.1.4. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Njemačka)
- mikroskop (Olympus, Japan)
- Thomaova komorica
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm)
- mikrobiološka ušica
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)

3.2. METODE

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Sojevi kvasaca i plijesni čuvaju se na 4 °C u sladnom bujonu tj. na sladnom agaru (Biolife, Milano, Italija). Svi sojevi su trajno pohranjeni na -80 °C uz dodatak 30 % (v/v) glicerola.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

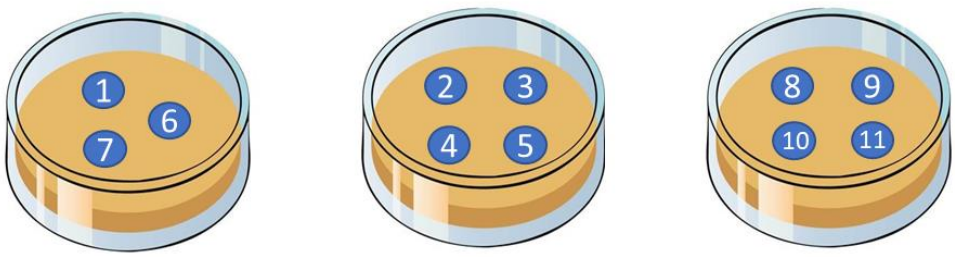
Izabrani sojevi kvasaca i plijesni nacijepljeni su na sladni agar (Biolife) te inkubirani na 28 °C tijekom 48 h ukoliko je riječ o kvascima te 3-5 dana na 25 °C za plijesni.

3.2.3. Neizravno određivanje broja mikroorganizama brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici (broj živih mikroorganizama)

Nakon perioda uzgoja, s ciljem određivanja broja živih stanica, pripremljena su decimalna razrjeđenja kultura kvasca i plijesni, u omjerima 1: 10. Zatim je po 0,1 ml određenih razrjeđenja svake suspenzije ispitivanih mikroorganizama otpipetiran na sladni agar i ravnomjerno razmazan štapićem po Driglaskom. Nakon inkubacije od 48 sata na 28 °C za kvasce, odnosno 25 °C za plijesni, izbrojane su porasle kolonije koje predstavljaju broj živih stanica i izražavaju se kao CFU vrijednosti (CFU, eng. Colony Forming Units) a vrijednosti su bile u rasponu 10^7-10^8 CFU/ml za kvasce te 10^4-10^7 CFU/ml za plijesni.

3.2.3. Određivanje antifungalne aktivnosti disk difuzijskom metodom

0,1 ml prethodno pripremljenih suspenzija nacijepljeno je na sladni agar za svaki pojedini mikoorganizam i razmazano štapićem po Drigalskom. U sljedećem koraku na površinu hranjive podloge u sterilnim uvjetima dodani su filter diskovi prethodno natopljeni u eutektična otapala prikazana u tablici 1. Kao pozitivna kontrola korišten je mikafungin otopljen u PBS-u a negativna kontrola samo PBS pufer. Shematski prikaz vidljiv je na slici 3.

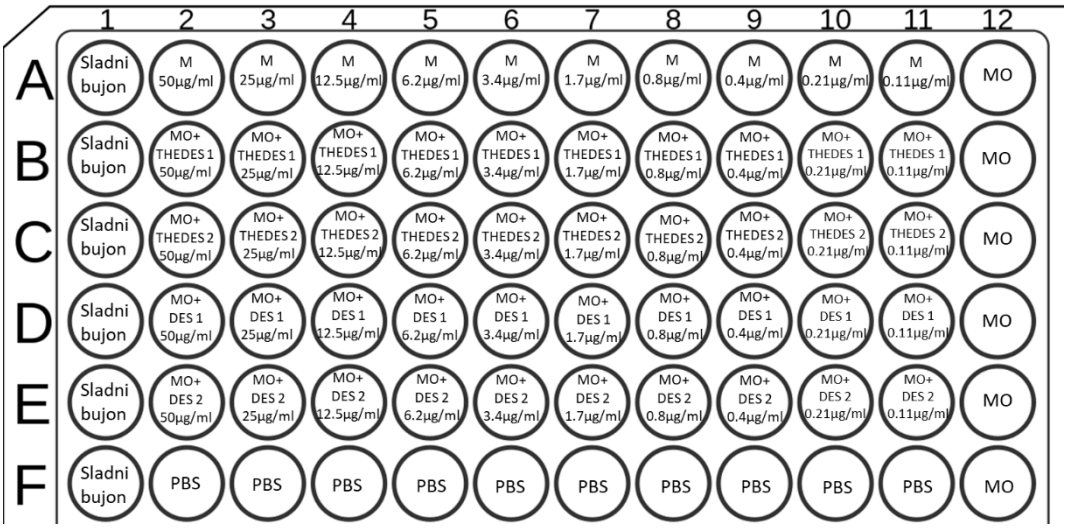


Slika 3. Shematski prikaz uzoraka otapala nanešenih na sladni agar (ploča 1: 1-mikafungin 100 µg/ml, 7-mikafungin 50 µg/ml, 6-PBS; ploča 2: 2-THEDES 1 100 µg/ml, 3-THEDES 2 100 µg/ml, 4-DES 1 100 µg/ml, 5- DES 2 100 µg/ml; ploča 3: 8-THEDES 1 50 µg/ml, 9-THEDES 2 50 µg/ml, 10-DES 1 50 µg/ml, 11-DES 2 50 µg/ml)

Ploče s nacijepljenim kulturama i diskovima stavljene su na inkubaciju tijekom 48 sata pri 28 °C za kvasce, odnosno 4 dana na 25 °C za plijesni. Ukoliko je mikroorganizam osjetljiv na otapalo dolazi do pojave prozirne zone koja predstavlja zonu inhibicije tj. zonu u kojoj nema rasta. Promjer zone nakon završenog perioda inkubacije izmjeren je ravnalom a vrijednost inhibicije iskazana je u mm. Pokus je proveden u triplikatu.

3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

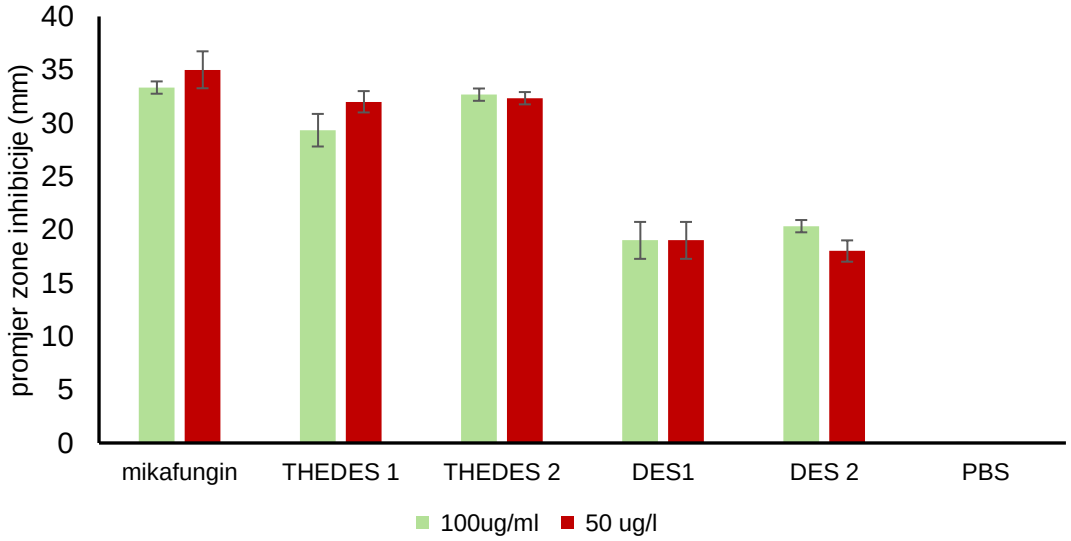
Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije otapala provedeno je u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U prvi stupac dodano je 200 µl sladnog bujona kao slijepa proba. U jažice 2-11 dodano je 100 µl inokuluma mikroorganizma te 100 µl serijski razrijeđenih ispitivanih eutektičnih otapala. U 12. jažicu nacjepljen je samo mikroorganizam. Početna koncentracija otapala je iznosila 50 µg/ml a pripremljena su dvostruka serijska razrijeđenja (25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,2 µg/ml, 3,4 µg/ml, 1,7 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,21 µg/ml, 0,11 µg/ml). U svaki red dodano je jedno otapalo a posljednji red je predstavljao negativnu kontrolu tj. u te jažice je dodan samo PBS pufer. Za svaki mikroorganizam korištena je posebna pločica, ukupno njih 6. Shema nacjepljivanja prikazana je na slici 4.



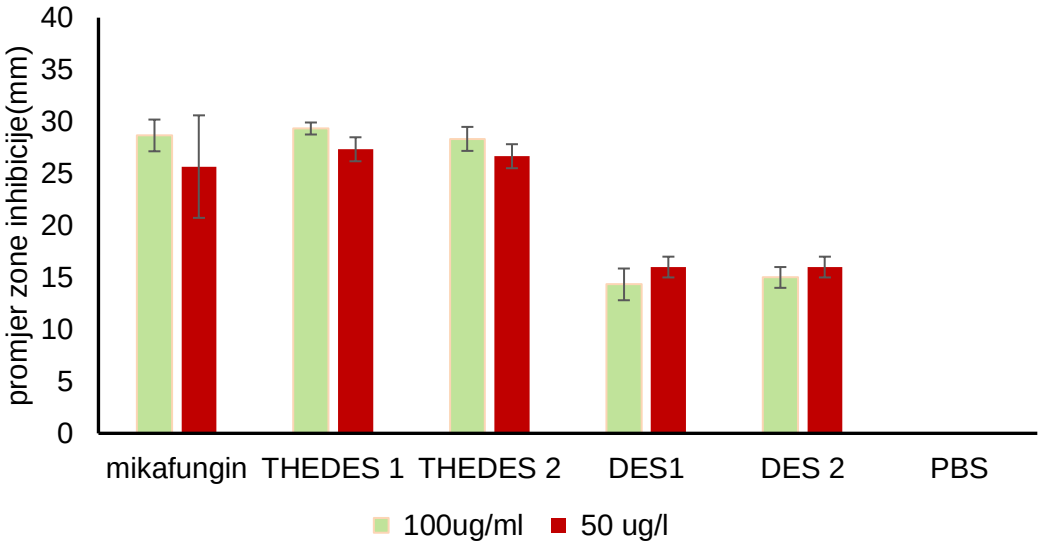
Slika 4. Prikaz uzoraka nanešenih u mikrotitarsku pločicu (MO-mikroorganizam, M-mikafungin)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada bio je usporediti antifungalnu aktivnost mikafungina te mikafungina otopljenog u izabranim eutektičkim otapalima (DES-ovima) kao i odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju navedenih kombinacija. Kao test mikroogranizmi korištene su izabrane vrste plijesni i kvasaca a rezultati antifungalne aktivnosti dobiveni disk difuzijskom metodom prikazani su na slikama 5-10.



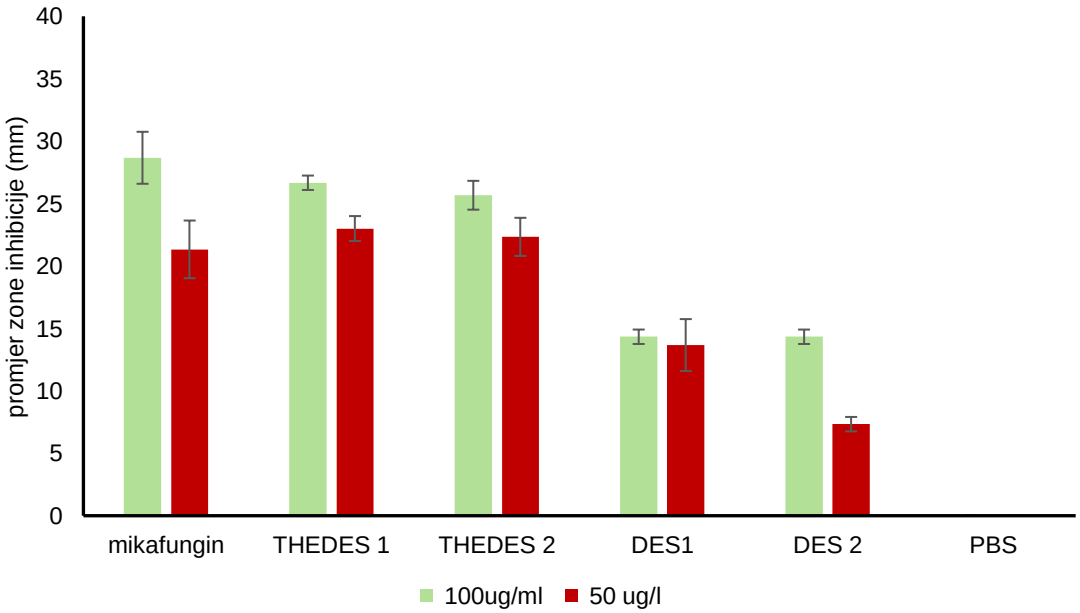
Slika 5. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Aspergillus niger*



Slika 6. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Aspergillus flavus*

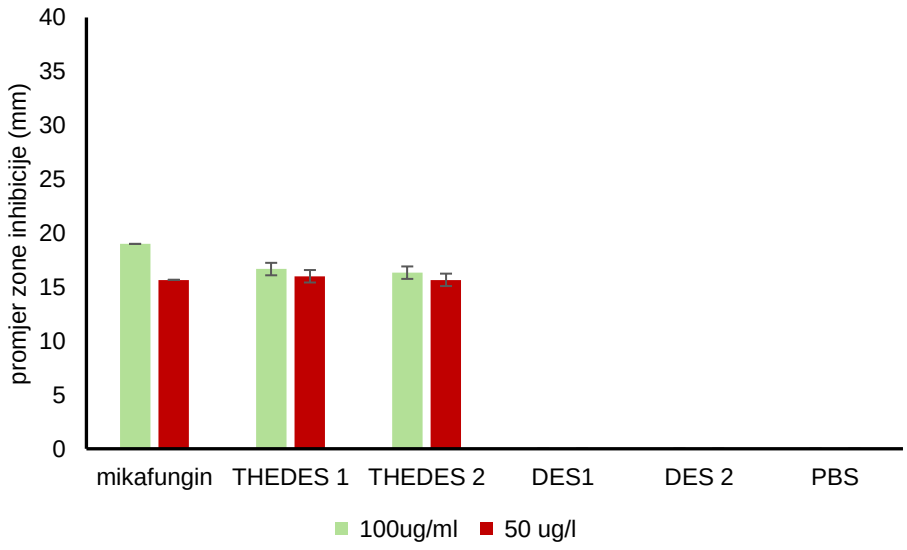
Analizom rezultata *A. niger* i *A. flavus* može se vidjeti kako nema značajnije razlike u inhibiciji prilikom korišenja koncentracije mikafungina od 50 µg/ml i 100 µg/ml. Nešto jača antifungalna aktivnost je zabilježena prema *A. niger* (slika 5) gdje je raspon zona inhibicije za mikafungin i THEDES-e bio 28-33 mm pri koncentraciji 100 µg/ml te 31-36 mm pri 50 µg/ml, u odnosu na *A. flavus* gdje je zabilježeni raspon iznosi 28,33-29,33 mm odnosno 25,67-26,67 mm. Iako je bilo za očekivati kako će kombinacija mikafungina u DES-u pokazati značajnu razliku u odnosu na čisti mikafungin radi bolje topljivosti navedene aktivne tvari u eutektičnim otapalima, kao i radi antimikrobne aktivnosti samih DES-ova vidljive iz prikazanih grafova, rezultati su pokazali tek neznatno bolju aktivnost THEDES-a i to samo kod plijesni *A. flavus* (slika 6).
Dobra antifungalna aktivnost mikafungina prema *Aspergillus* vrstama korištenim u ovom radu dodatno potvrđuje već postojeća istraživanja u kojima se ovaj antimikotik uspješno koristio u liječenju sistemskih aspergiloza (Ota i sur., 2010; Zhang i sur., 2020).

Rezultati antifungalne aktivnosti prema kvascima su nešto drugačiji i prikazani su na slikama 9-12. Jedino je kod kvasca *C. utilis* zabilježena antimikrobna aktivnost svih ispitivanih otopina tj. mikafungina, DES-ova i THEDES-a (slika 7). Veličina zona inhibicije kod veće primjenjene koncentracije od 100 µg/ml bila je u rasponu 14,33-28,67 mm dok je kod koncentracije 50 µg/ml iznosila 7,33-21,33 mm.

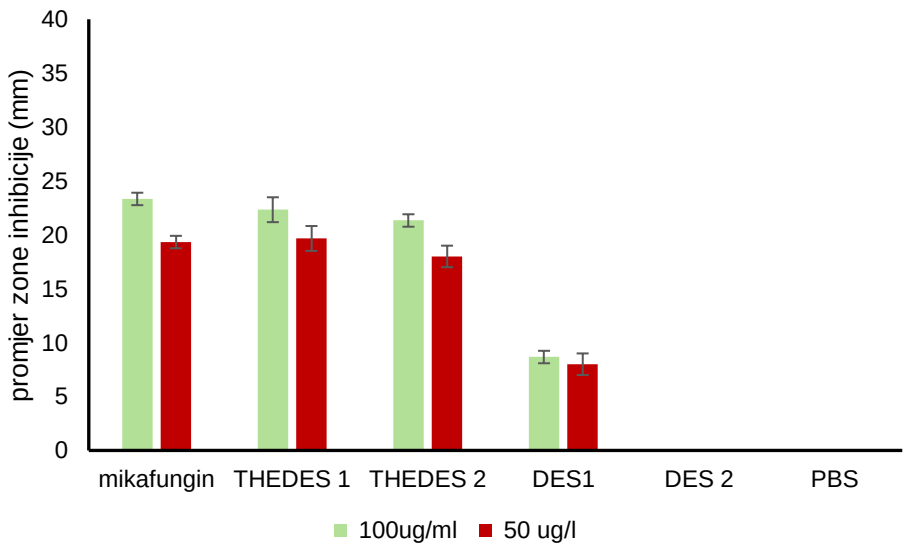


Slika 7. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Candida utilis*

Ostale vrste ispitivanih kvasaca- *C. lypolitica*, *C. albicans* i *C. famata* pokazale su umjerenu osjetljivost prema ispitivanim otopinama, prilikom čega je kod ispitivanja *C. lypolitica* izostala osjetljivost prema DES 1 i DES 2 otapalima (slika 8), *C. albicans* nije pokazala osjetljivost prema DES 2 (slika 11) dok je kod vrste *C. famata* od primjenjih eutektičkih otapala samo DES 1 u većoj koncentraciji pokazao antifungalnu aktivnost (slika 10). Slijedom navedenog može se zaključiti kako je *C. utilis* kvasac koji je najviše osjetljiv na antifungalno djelovanje korištenih kombinacija što je također i vidljivo iz promjera zona inhibicija koje su se kretale u rasponu 14,33-28,67 mm za konc. 100 µg/ml te 7,33-21,33 mm za konc. 50 µg/ml. S druge strane, najotpornijim kvascem se pokazala *C. lypolitica* (slika 8) koja je bila osjetljiva samo na čisti mikafungin i THEDES-e i to u rasponu 16,33-19 mm za konc. 100 µg/ml te 15,67-16 mm za konc. 50 µg/ml.

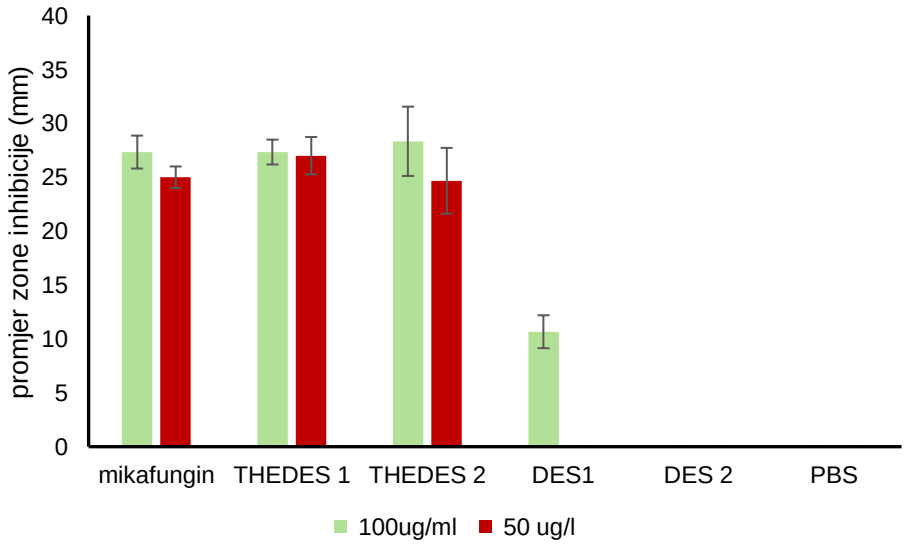


Slika 8. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Candida lipolytica*



Slika 9. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Candida albicans*

Sveobuhvatno gledajući, čisti mikafungin i onaj otopljen u DES-ovima pokazao je zadovoljavajuću antifungalnu aktivnost prema izabranim vrstama plijesni i kvasaca. Mehanizam djelovanja temelji se na nekompetitivnoj inhibiciji sinteze 1,3-β-D-glukana, važne komponente prisutne u staničnoj stijenci gljivica. Kontinuirana sinteza 1,3-β-D-glukana iznimno je važna i neophodna za održavanje integriteta stanične stijenke ovih mikroorganizama, a inhibicija te sinteze dovodi do gubitka osmotske nestabilnosti, što posljedično dovodi do lize stanica i smrti (Hasim i Coleman, 2019).



Slika 10. Antifungalna aktivnost eutektičnih otapala i mikafungina prema *Candida famata*

Kako bi se dobio bolji uvid u inhibicijska svojstva mikafungina i DES-ova u sljedećem koraku istraživanja određena je minimalna inhibitorna koncentracija a rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) izabranih DES-ova i THEDES-a prema odabranim test mikroorganizmima. Početna koncentracija otapala je iznosila 50 µg/ml a pripremljena su razrijeđenja: 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,2 µg/ml, 3,4 µg/ml, 1,7 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,21 µg/ml, 0,11 µg/ml.

	Minimalne inhibitorne koncentracije (µg/mL)				
	Mikafungin	DES 1	DES 2	THEDES 1	THEDES 2
Aspergillus niger	1,7	25	12,5	3,4	0,4
Aspergillus flavus	50	12,5	50	0,4	0,8
Candida utilis	1,7	25	50	1,7	1,7
Candida lipolytica	3,4	6,2	12,5	6,2	6,2
Candida albicans	0,21	/	0,4	0,21	0,21
Candida famata	3,4	50	50	0,21	0,21

Otapanjem mikafungina u DES-ovima zabilježena je promjena MIC vrijednosti u odnosu na čisti mikafungin kod svih ispitanih mikroorganizama osim kod *C. utilis* i *C. albicans* gdje kombinacija THEDES-a nije pokazala niti bolji niti lošiji učinak u odnosu na MIC čistog mikafungina. Jedino je kod kvasca *C. lypolitica* zabilježen porast MIC vrijednosti što nije u skladu s postojećim istraživanjima gdje je zabilježeno smanjenje MIC vrijednosti nakon kombiniranja aktivne tvari i eutektičnog otapala (Silva i sur., 2019; Swebocki i sur., 2024). Kod

kvasca *C. famata* te kod obje vrste plijesni bila je potrebna manja koncentracija kako bi se inhibirao mikrobni rast a primjetna razlika je zabilježena za *A. flavus* gdje je MIK THEDES-a bio manji od 1 u odnosu na MIK čistog mikafungina od 50 µg/ml.

S ciljem još boljeg razumijevanja dobivenih rezultata potrebno je ispitati antifungalnu aktivnost te MIK koncentracije zasebnih komponenti DES-ova te kombinirati različite molarne omjere kako bi se postigli još bolji rezultati.

Obzirom da su istraživanja mikafungina u kombinaciji s eutektičkim otapalima tek u začetku, dobiveni rezultati se ne mogu usporediti s već poznatom literaturom, međutim pružaju vrijednu osnovu za daljnja istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata u ovom radu zaključeno je sljedeće:

1. Mikafungin je u kombinaciji s eutektičkim otapalima inhibirao sve izabrane test mikroorganizme.

2. Plijesni *A. niger* i *A. flavus* pokazale su sličnu osjetljivost prema testiranim kombinacijama mikafungina.

3. Od ispitanih kvasaca, *C. utilis* je pokazala najveću osjetljivost dok je *C. lypolitica* bila najmanje osjetljiva na mikafungin otopljen u DES-ovima.

4. Nije zabilježena značajna razlika prilikom primjene veće (100 µg/ml) i niže (50 µg/ml) koncentracije mikafungina.

5. Otapanje mikafungina u DES-ovima je utjecalo na smanjenje minimalne inhibitorne koncentracije kod plijesni *A. niger* i *A. flavus* te kod kvasaca *C. famata*.

6. Potrebna su dodatna istraživanja antifungalne aktivnosti mikafungina u kombinaciji s DES-ovima kako bi se dobio bolji uvid u osjetljivost mikroorganizama te kako bi se postigli optimalniji sastavi i omjeri eutektičkih otapala.

6. POPIS LITERATURE

Agarwal V, Kumia K, Gupta A, Singh V (2023). Local injection of amphotericin B: novel use in the treatment of fungal maxillary sinusitis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **52**(12), 1282-1285. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2023.07.008

Andes DR, Dismukes WE (2010) Azoles. U: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE (ured.) In Essentials of clinical mycology. izd. Springer NY, str. 61-93

Cadena J, Thompson GR, Patterson TF (2021). Aspergillosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Infectious Disease Clinics*, **35**(2), 415-434. https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.008

Cappelletty D, Eiselstein-McKitrick K (2007). The echinocandins. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 27(3), 369-388. https://doi.org/10.1592/phco.27.3.369

Chandrasekar PH, Sobel JD (2006) Micafungin: A New Echinocandin. *Clinical Infectious Diseases*, **42**(8), 1171–1178. https://doi.org/10.1086/501020

Cooper Jr, CR (2011) Yeasts pathogenic to humans. U: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (ured.) In the yeasts , 5. izd. Elsevier, str. 9-19

Duarte ARC, Ferreira ASD, Barreiros S, Cabrita E, Reis RL, Paiva A (2017). A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **114,** 296-304. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.003

De La Torre P, Reboli AC (2014) Micafungin: an evidence-based review of its place in therapy. *Core evidence*, 27-39. https://doi.org/10.2147/CE.S36304

Enoch DA, Idris SF, Aliyu SH, Micallef C, Sule O, Karas, JA (2014). Micafungin for the treatment of invasive aspergillosis. *Journal of Infection*, **68**(6), 507-526. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.01.007

Gall E (2022) The kingdom Fungi. U:Gall E, Benkeblia N (ured.) Mycoagroecology: Integrating Fungi Into Agroecosystems, str. 35-51.

Gil-Alonso S, Quindós G, Cantón E, Eraso E, Jauregizar N (2019). Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against Candida parapsilosis species complex:Evaluation of the fungicidal activity. *Revista iberoamericana de micologia*, **36**(1), 24-29. https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.12.001

Hagiya H, Nishimura Y, Otsuka F (2023). Safety and usefulness of nebulized liposomal amphotericin B: Systematic scoping review. *Pulm Pharmacolo Ther.* ,**82**. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2023.102233

Hasim, S., & Coleman, J. J. (2019). Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. Future medicinal chemistry, 11(08), 869-883. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0465

Iversen DB, Hellfritzsch M, Stage TB, Aabenhus RM, Lind BS, Pottegård A (2021). Antimycotic treatment of oral candidiasis in warfarin users. *The American Journal of Medicine*, **134**(5), 308-312. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.10.018

Jenks JD, Hoenigl M (2018). Treatment of aspergillosis. *Journal of Fungi*, **4**(3). https://doi.org/10.1016/j.ijom.2023.07.008

Joseph, J. M., Jain, R., & Danziger, L. H. (2012). Micafungin: a new echinocandin antifungal. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 27(1), 53-67. https://doi.org/10.1592/phco.27.1.53

Khatoon A, i Abidin UZ (2018). Mycotoxicosis–diagnosis, prevention and control: past practices and future perspectives. *Toxin Reviews*, **39**(2), 99-114. https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1485701

Li LJ, Chen W, Xu H, Wan Z, Li RY, Liu W (2010). Antifungal activity of ibuprofen against Aspergillus species and its interaction with common antifungal drugs. *Chinese Medical Journal*, **123**(19), 2701-2705.

Lim CSY, Rosli R, Seow HF, Chong PP (2012) Candida and invasive candidiasis: back to basics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, **31**, 21-31. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1273-3

Mahalapbutr P, Sabuakham S, Nasoontorn S, Rungrotmongkol T, Silsirivanit A, Suriya U (2023). Discovery of amphotericin B, an antifungal drug as tyrosinase inhibitor with potent anti-melanogenic activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **246**. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125587

Mamun MAA, Liu S, Zhao L, Li ZR, Shen D, Liu HM (2023). Micafungin: A promising inhibitor of UBE2M in cancer cell growth suppression. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **260**. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115732

Mannu A, Blangetti M, Baldino S, Prandi C (2021). Promising technological and industrial applications of deep eutectic systems. Materials, **14**(10), 2494. https://doi.org/10.3390/ma14102494

Marena GD, Santos RMA, Bauab TM, Chorilli M (2021). Biological properties and analytical methods for micafungin: a critical review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 51(4), 312-328. https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1726726

Markov K, Pleadin J, Jakopović Ž, Zadravec M, Frece J (2022) PLIJESNI- odabrane značajke, izolacija i identifikacija. U: Markov K (ured.) Hrvatski veterinarski institut Zagreb, str .9-10

Moretti S, Bozza S, Massi-Benedetti C, Prezioso L, Rossetti E, Romani L i sur. (2014). An immunomodulatory activity of micafungin in preclinical aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**(4), 1065-1074. https://doi.org/10.1093/jac/dkt457

Ota R, Katada A, Bandoh N, Takahara M, Kishibe K, Hayashi T, Harabuchi Y. (2010). A case of invasive paranasal aspergillosis that developed from a non-invasive form during 5-year follow-up. *Auris Nasus Larynx*, **37**(2), 250-254. https://doi.org/10.1016/j.anl.2009.06.003

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, **4**(1), 1-20. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26

Peraica M, Dubravka Rašić (2012) Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva*: *Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme* 54(3), 81-87.

Roda A, Santos F, Matias AA, Paiva A, Duarte ARC (2020). Design and processing of drug delivery formulations of therapeutic deep eutectic systems for tuberculosis. *The Journal of Supercritical Fluids*, **161**. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104826

Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Geertsen E, Mouton JW, Meis JF (2011) In vitro activity of isavuconazole against 208 Aspergillus flavus isolates in comparison with 7 other antifungal agents: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Diagnostic microbiology and infectious disease, 71(4), 370-377. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.006

Silva JM, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC (2018). Design of functional therapeutic deep eutectic solvents based on choline chloride and ascorbic acid. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **6(**8), 10355-10363. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01687

Silva JM, Pereira CV, Mano F, Silva E, Castro VI, Sá-Nogueira I,Duarte ARC (2019). Therapeutic role of deep eutectic solvents based on menthol and saturated fatty acids on wound healing. ACS Applied Bio Materials, 2(10), 4346-4355. https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00598

Skerlev M. (2007) Bolesti kože uzrokovane gljivama i suvremeni terapijski principi. *Medicus*, **16** (1_Dermatologija), 7-12.
Stephenson S (2022). The kingdom fungi. U: Stepheson S i Gall E (ured.) *Mycoagroecology*, Taylor & Francis Group, str.35-49

Swebocki T, Kocot AM, Barras A, Arellano H, Bonnaud L, Haddadi K, Boukherroub R (2024). Comparison of the Antibacterial Activity of Selected Deep Eutectic Solvents (DESs) and Deep Eutectic Solvents Comprising Organic Acids (OA-DESs) Towards Gram-positive and Gram-negative Species. Advanced healthcare materials, 2303475. https://doi.org/10.1002/adhm.202303475

Tang BHE, Bay JW, Yeong FM, Samuel M (2023) Efficacy and safety of echinocandin monotherapy and combination therapy for immunocompromised patients with systemic candidiasis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Medical Mycology*, **33**(2). https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2023.101362

Wall G, Lopez-Ribot JL (2020). Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. Antibiotics, 9(8). https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445

Yin T, Wu J, Yuan J, Wang X (2022). Therapeutic deep eutectic solvent based on osthole and paeonol: Preparation, characterization, and permeation behavior. Journal of Molecular Liquids, 346. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117133

Zanette RA, Jesus FPK, Pilotto MB, Weiblen C, Pötter L, Ferreiro L (2015). Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against Pythium insidiosum. *Journal de Mycologie Medicale*, **25**(1), 91-94. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.09.002

Zhang, J., Li, Y., & Wang, C. (2020). Clinical Study of Voriconazole Combined with Caspofungin or Micafungin for Invasive Pulmonary Aspergillus in ICU Mechanical Ventilation Patients. Acta Microscopica, 29(1)

Živanović J, Lukić S, Bogdanović M, Jončić M (2009) Mikrobiologija: Autorska skripta za studente medicine

Izjava o izvornosti

Ja Ema Zubović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

EZubović

Vlastoručni potpis