proLékaře.cz | 13.7.2025

Čes. slov. Farm. 2017; 66, 164–167

PŮVODNÍ PRÁCE

Synergický účinok azolových antimykotík (klotrimazol, flukonazol) a prírodných látok

Synergistic effect of azole antimycotics (clotrimazole and fluconazole) and natural substances

Martin Kuruc • Eva Čonková

Došlo 4. júna 2017 / Prijato 11. júla 2017

Súhrn

Terapia mykotických infekcií je vzhľadom na narastajúci vývoj rezistencie patogénov na antimykotiká stále náročnejšia. Jej efektivitu je možné zvýšiť vhodnou kombináciou konvenčných liečiv s látkami prírodného charakteru. Testovaním citlivosti kvasiniek *C. albicans* na klotrimazol samotný a v kombinácii s prípravkom na báze tea tree oleja, resp. s polykompozitným prípravkom obsahujúcim konopný olej a rôzne silice, ako aj s propolisovou tinktúrou bola zistená 100% antimykotická aktivita, preto sa synergický účinok nedal porovnať. Perspektívnym sa však javí synergický účinok prírodných liečiv s flukonazolom. Antifungálna účinnosť flukonazolu samotného dosahovala 80,95 %, avšak po pridaní prírodných liečiv sa zvýšila o 9,55–14,25 %.

Kľúčové slová: *Candida albicans* • flukonazol • klotrimazol • prírodné liečivá • synergizmus

Summary

Nowadays the treatment of fungal infections is difficult due to increasing resistance of fungal pathogens to antimycotics. The efficacy of antimycotics can be increased by a proper combination of commercial drugs and natural substances. The 100% antimycotic activity was found using susceptibility testing of *Candida albicans* yeasts on clotrimazole alone and in combination with tea tree oil, or with a multicomponent preparation containing cannabis oil and various essential oils and in combination with propolis tincture. Combination of natural substances with fluconazole seems to be also prospective. Fluconazole alone achieved an antifungal activity of 80.95% but natural active substances increased its efficacy by 9.55–14.25%.

Key words: *Candida albicans* • fluconazole • clotrimazole • natural active substances • synergism

M. Kuruc • doc. MVDr. Eva Čonková, PhD. (✉)
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Ústav farmakológie
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
e-mail: eva.conkova@uvlf.sk

Úvod

Candida albicans je v posledných desaťročiach najčastejšie diagnostikovaným pôvodcom kandidových infekcií[1, 2]. Je oportúnnym patogénom a k nárastu virulencie a invázii do tkaniva dochádza len za určitých podmienok (potlačenie prirodzenej mikroflóry, liečba imunosupresívami, hormonálne zmeny)[3].

Terapia kandidóz je v súčasnosti zabezpečovaná rôznymi antimykotikami, najmä zo skupiny polyénov a azolových zlúčenín[4]. Na báze azolov sú v lekárňach dostupné desiatky liekov, pričom mnohé z nich obsahujú klotrimazol alebo flukonazol[5, 6].Vzhľadom na narastajúci vývoj rezistencie na antimykotiká[7, 8] sa pozornosť odborníkov zameriava nielen na objavovanie nových liečiv, ale aj na využitie prírodných látok s potenciálnym antimykotickým účinkom.

Viaceré štúdie poukazujú na cytotoxický účinok rastlinných silíc, ktoré ovplyvnením priepustnosti bunkovej membrány húb a interakciou so signálnymi proteínmi viazanými na membránach sprostredkúvajú antifungálny účinok[9]. Stále častejšie sa objavujú vedecké práce zamerané na štúdium kombinácie syntetických a prírodných látok, pričom sa sleduje ich potenciálny synergizmus[10, 11].

Predmetom tejto práce bolo porovnať a otestovať na izolátoch *C. albicans* antifungálnu aktivitu dvoch azolových antimykotík (klotrimazolu a flukonazolu) samostatne a v kombinácii s komerčnými prípravkami prírodného charakteru, ktoré si pacienti môžu voľne zakúpiť v lekárňach.

Pokusná časť

Materiál

Izoláty *C. albicans* (21 klinických vzoriek, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura v Košiciach, Košice); referenčný kmeň *C. albicans* CCM 8320 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika); komerčné prípravky: TT – čistý prírodný 100% tea tree olej s prímesou limonénu, linalolu a geraniolu; KN – polykompozitný prípravok na báze konopného oleja s obsahom arniky, citricidalu, geraniolu, extraktu z grapefruitových semienok, klinčekovej a šalviovej silice; PR – propolisová tinktúra; disky impregnované flukonazolom (FL), resp. klot-

proLékaře.cz | 13.7.2025

rimazolom (CL) 10 µg/disk (CondaPronadisaMicro&-MolecularBiology, Spain); Sabouraud dextrózový agar s chloramfenikolom (SDA) a Saboraud dextrózový bujón (SDB) (HiMediaLaboratoriesPvt. Ltd., Mumbai, India).

Metodika

Na vyhodnotenie antifungálneho účinku vybraných antimykotík (CL a FL) samostatne a v kombinácii s prírodnými liečivami, bola použitá štandardná disková difúzna metóda (DDM) M44-A2[12].

V pilotnom experimente bola pomocou štandardnej mikrodilučnej metódy M27-A3 stanovená MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) prípravkov TT, KN a PR[13]. Hodnoty ich MIC_{50} predstavovali základné koncentrácie pri testovaní kombinovaného účinku s CL, resp. FL.

Obe metodiky boli čiastočne modifikované, ako živné médium bol použitý Sabouraud dextrózový agar, resp. Sabouraud dextrózový bujón.

Stanovenie MIC prírodných liečiv

Na testovanie boli použité 96 jamkové sterilné mikrotitračné platničky. Do jamiek 2 až 11 bol v množstve 100 µl aplikovaný komerčný prírodný prípravok (TT, resp. KN alebo PR), v koncentráciách od 1000 $mg.ml^{-1}$ do 2 $mg.ml^{-1}$, pripravených dvojkovým riedením. Následne bolo do jamiek pridané inokulum (100 µl), s obsahom 1–5 × 10^3 $CFU.ml^{-1}$, nariedené v SDB. Do jamky 12 (negatívna kontrola) bol aplikovaný SDB v množstve 200 µl. Jamka 1 (pozitívna kontrola) obsahovala 200 µl nariedeného inokula. Výsledné koncentrácie prípravkov po pridaní 100 µl inokula predstavovali 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 16; 8; 4; 2 a 1 $mg.ml^{-1}$. Platničky boli inkubované pri teplote 37 °C a po 24 hodinách bola odčítaná hodnota MIC.

Stanovenie antifungálnej účinnosti testovaných látok DDM

Povrch SDA v Petriho miskách (priemer 90 mm) bol inokulovaný suspenziou kvasiniek (1–5 × 10^6 $CFU.ml^{-1}$), ktorá bola pomocou sterilných tampónov nanesená v troch rôznych smeroch dvakrát s 15-minútovým odstupom.

V experimente č. 1 boli na povrch inokulovaného agaru asepticky uložené antimykotické disky impregnované klotrimazolom, resp. flukonazolom.

V experimente č. 2 boli na živnú pôdu umiestnené najskôr antimykotické disky (CL, resp. FL), na ktoré boli následne aplikované nariedené komerčné prípravky prírodného charakteru: TT a KN v koncentrácii 8 $mg.ml^{-1}$ a PR v koncentrácii 4 $mg.ml^{-1}$, v množstve 15 µl/disk. Koncentrácie prípravkov obsahujúce silice boli pripravené vo forme emulzií s arabskou gumou, ktorá predstavovala 50 % z objemu prípravku. Pre zabezpečenie sterility boli pripravené koncentrácie roztokov pred aplikáciou do mikrotitračnej platničky prefiltrované cez sterilný 0,22 µm filter.

Petriho misky boli inkubované 24 hodín pri teplote 37 °C. Účinnosť testovaných látok bola vyhodnotená na základe veľkosti inhibičnej zóny.

Experimenty boli zopakované dvakrát.

Interpretácia výsledkov

MIC testovanej antifungálnej látky bola hodnotená na základe prítomnosti, resp. absencie zákalu v jamke s inokulom a bola porovnávaná s pozitívnou a negatívnou kontrolou. Hodnota MIC bola odčítaná v jamke, v ktorej bolo živné médium číre.

Pre vyhodnotenie citlivosti izolátov *C. albicans* na klotrimazol a flukonazol, testovaných DDM samostatne a v kombinácii s prírodnými liečivami, boli ako interpretačné kritériá použité údaje publikované Dotom[14] a Elfekym[15], na základe ktorých boli kvasinky klasifikované ako citlivé (S), citlivé v závislosti na dávke (S-DD) alebo rezistentné (R). Uvedení autori použili nasledovné kritériá pre CL: S = ≥ 20 mm, S-DD = 19–12 mm a R = ≤ 11 mm a pre FL: S = ≥ 19 mm, S-DD = 18–15 mm a R = ≤ 14 mm. Synergizmus testovaných látok bol hodnotený na základe percentuálneho rozdielu citlivosti kvasiniek na antimykotikum samotné a v kombinácii s prírodným liečivom: $[(S_0 + S\text{-}DD_0) - (S_{PL} + S\text{-}DD_{PL})]$.

Štatistické vyhodnotenie

Popisná štatistika bola vykonaná pomocou programu Excel Microsoft Office 2007, pričom sme sa zamerali na nasledujúce parametre: aritmetický priemer (x), smerodajnú odchýlku (SD), modus (Mo) a medián (Me). Pre posúdenie signifikantnosti údajov bol použitý párový t-test v programe GraphPadPrism.

Výsledky a diskusia

Hodnoty MIC testovaných komerčných prípravkov prírodného charakteru dokumentuje tabuľka 1. Rozpätie MIC pri jednotlivých prípravkoch je takmer zhodné (1–16 $mg.ml^{-1}$, resp. 2–16 $mg.ml^{-1}$). Najnižšia priemerná hodnota MIC bola zistená pri PR (6,95 $mg.ml^{-1}$), čo korešponduje aj s nižším údajom MIC_{50} (4 $mg.ml^{-1}$). Koncentrácie uvedené ako MIC_{50} boli použité pre testovanie synergického účinku konvenčných antimykotík (CL a FL) a prípravkov na prírodnej báze.

Tabuľka 2 uvádza údaje vyhodnotenia citlivosti kvasiniek testovaných DDM. Pri porovnaní priemerných hodnôt veľkosti zón vytvorených pri klotrimazole samotnom a v kombinácii s prírodnými liečivami bol zaznamenaný mierny pokles. Signifikantný rozdiel ($p < 0,05$) bol ale zistený iba v kombinácii s prípravkom na báze propolisu. Na základe interpretačných kritérií však aj v tomto prípade všetky testované izoláty kandíd vykazovali 100% citlivosť.

Podľa literárnych údajov vznik rezistencie kandíd na klotrimazol sa spája najmä s jeho nekontrolovaným používaním, hlavne v krajinách tretieho sveta, v ktorých bola rezistencia zaznamenaná až u tretiny izolátov[16].

Na flukonazol vykazovalo rezistenciu 19,05 % testovaných izolátov *C. albicans*. Jej pokles bol pozorovaný pri použití kombinovaných prípravkov (tab. 2). Vývoj rezistencie na flukonazol je zisťovaný predovšetkým v nemocničných zariadeniach, v ktorých je liečba flukonazolom indikovaná pomerne často[8]. Vznik rezistencie pri *C. albicans* na flukonazol *in vivo* má zrejme multi-

proLékaře.cz | 13.7.2025

Tab. 1. MIC (mg.ml^{-1}) komerčných prípravkov s obsahom prírodných látok

Prípravok	Min–Max	x	SD	Me	Mo	MIC_{50}	MIC_{90}
TT	2–16	9,61	4,96	8	8	8	16
KN	1–16	7,27	6,6	4	1	8	16
PR	2–16	6,95	5,05	4	8	4	16

TT – teatree olej, KN – polykompozitný prípravok konopného oleja a silíc, PR – propolisová tinktúra, Min–Max – rozpätie najnižšej a najvyššej hodnoty, x – priemerná hodnota, SD – smerodajná odchýlka, Me – medián, Mo – modus

Tab. 2. Citlivosť C. albicans na kombináciu syntetických liečiv a komerčných prípravkov prírodného charakteru

Zóny (mm)	Klotrimazol				Flukonazol			
	0	TT 8 mg.ml^{-1}	KN 8 mg.ml^{-1}	PR 4 mg.ml^{-1}	0	TT 8 mg.ml^{-1}	KN 8 mg.ml^{-1}	PR 4 mg.ml^{-1}
min.–max.	24–37	24–37	25–35	24–37	10–22	14–25	11–26	12–23
priemer	31,14	30,76	29,76	29,05*	16,24	19,19**	18,38*	17,52
SD	2,94	2,97	2,55	2,87	2,59	3,08	3,28	2,71
Me	32	31	30	30	16	19	19	17
Mo	16	28	30	30	15	16	19	16
Citlivosť (n/%)								
S	21/100	21/100	21/100	21/100	4/19,05	12/57,1	11/52,4	7/33,3
S-DD	0/0	0/0	0/0	0/0	13/61,9	8/38,1	8/38,1	12/57,2
R	0/0	0/0	0/0	0/0	4/19,05	1/4,8	2/9,5	2/9,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$
TT – tea tree olej, KN – polykompozitný prípravok konopného oleja a silíc, PR – propolisová tinktúra, min.–max. – rozpätie najnižšej a najvyššej nameranej hodnoty, SD – smerodajná odchýlka, Me – medián, Mo – modus, n – počet citlivých kmeňov

faktoriálny pôvod. Počas dlhodobej liečby pacientov sa u pozorovaných subpopulácií kandíd postupne uplatňujú rôzne mechanizmy rezistencie, pričom za najdôležitejší faktor sa považuje tvorba biofilmu[17, 18].

Vyššia antifungálna aktivita flukonazolu bola zaznamenaná v kombinácii s TT (95,2 %), ako aj s prípravkom KN (90,5 %). Tieto údaje korešpondujú aj so signifikantne vyššími priemernými veľkosťami zón inhibície pri FL+TT (19,19 mm; $p < 0,001$) a FL+KN (18,38 mm; $p < 0,05$), v porovnaní so samotným flukonazolom (16,24 mm). Nárast priemernej veľkosti inhibičnej zóny v kombinácii FL+PR nebol štatisticky významný. Táto kombinácia dosahovala 90,5% účinnosť, kým pri samotnom flukonazole činila 80,95 %.

Tea tree olej, ktorý sa získava z rastliny *Melaleuca alternifolia* (*Myrtaceae*), je známy svojimi antimikrobiálnymi, antivírusovými, fungicídnymi a antiinflamačnými účinkami[19]. Popisovaná je jeho účinnosť aj na flukonazol-rezistentné kmene *C. albicans*[20]. Rovnako výsledky našej štúdie poukazujú na vhodnú kombináciu flukonazolu a prípravku s obsahom tea tree oleja, ktorý prispieva rôznou mierou k narušeniu integrity bunkovej membrány húb[21]. Najväčší podiel na jeho antimykotickom účinku majú zrejme terpinén-4-ol a α-terpineol[22, 23].

Predpokladáme, že za antimykotickú aktivitu v nami testovanom polykompozitnom prípravku KN sú zodpovedné šalviová a klinčeková silica ako aj prímes geraniolu, u ktorých bol potvrdený antifungálny efekt[24–26]. Antimikrobiálne a antifungálne účinky klinčekovej silice sú pripisované obsahu eugenolu a karyofylénu[27].

Propolis má ako včelí produkt variabilné zloženie, najväčšia časť účinných látok pozostáva z flavonoidov (flavanóny, flavóny, flavonoly a dihydroflavonoly) a fenolických kyselín[28]. Za narušenie bunkovej membrány kvasiniek a následné zvýšenie účinnosti liečby flukonazolom sú v prípade propolisu pravdepodobne zodpovedné jeho fenolické zložky[29].

Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme skonštatovať, že prírodné látky majú potenciál pre ich využitie pri liečbe kvasinkových infekcií. Potvrdili sme synergický účinok flukonazolu v kombinácii s komerčnými prípravkami s obsahom prírodných látok. Pri kombinácii s klotrimazolom sa však antifungálny efekt nemenil, citlivosť kvasiniek bola pri všetkých testovaniach 100 %. Predpokladáme, že vhodná kombinácia prírodných látok s konvenčnými antimykotikami môže prispieť nielen k znižovaniu dávok potrebných k liečbe mykotických infekcií, ale aj zvrátiť vznik rezistencie kvasiniek.

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377

Stret záujmov: žiadny.

proLékaře.cz | 13.7.2025

Literatúra

1. **Cheng, S. C., et al.** Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. Infect. Immun. 2012; 80, 1304–1313.
2. **Dabas P. S.** An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. J. Yeast Fungal Res. 2013; 4(6), 63–74.
3. **Tömölová Z., Zmrhal J.** Mykotické vulvovaginitidy v našich ambulancích. Prakt. Gyn. 2005; 9(2), 35–39.
4. **Williams D. W., Lewis M.** Candida biofilms and oral candidiosis: Treatment and prevention. Periodontol. 2011; 55, 250–265.
5. **Buchta V., et al.** Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. Med. Pro Praxi 2009; 6(3), 155–164.
6. **Mlynarčík D.** Pestrý svet antimykotík. Prakt. Lekárn. 2013; 3, 20–22.
7. **Cleveland A. A., et al.** Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of Candida resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: Results from population-based surveillance:PLoS ONE 10 (3): doi:10.1371/journal.pone.0120452
8. **Theill L., et al.** Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2016; 48, 43–49.
9. **Zore B. G., et al.** Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. Phytomedicine 2011; 11(13), 1181–1190.
10. **Khan M. S. A., et al.** Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. Med. Mycol. 2012; 50, 33–42.
11. **Stringaro A., et al.** Effects of Mentha suaveolens essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*: Evidence-Based and Alternative Medicine 2014; Article ID 125904, 9 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/125904
12. **CLSI.** Clinical and laboratory standards institute / National comitee for clinical laboratory standards: Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved Guideline – 2nd edition, Document M44-A2. National Comitee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institute 2009; 29(17), 23.
13. **CLSI.** Clinical and laboratory standards institute / National comitee for clinical laboratory standards: Reference method for broth dilution susceptibility testing yeasts. Approved Standard – 3rd edition, Document M27-A3. National Comitee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institute 2002; 28(14).
14. **Dota K. F. D., et al.** A challenge for clinical labolatories: Detection of antifungal resistance in *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis. Lab. Med. 2011; 42(2), 87–93.
15. **Elfeky D. S., et al.** Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolatesin cases of vulvovaginal candidiasis. Alexan. J. Med. 2016; 52, 269–277.
16. **Nelson M., et al.** Identification and susceptibility profile of vaginal *Candida* species to antifungal agents among pregnant women attending antenatal clinic of Thika District Hospital, Kenya. Open. J. Med. Microb. 2013; 3(4), 239–247.
17. **Martínez M.** Heterogenous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole tehrapy for oropharyngeal candidosis. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 49(3), 515–524.
18. **Niimi M., et al.** Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology 2010; 98, 15–25.
19. **Farrer-Halls G.** Aromaterapie od A po Z. 1. vydanie. Praha: Metafora 2007.
20. **Mondello F., et al.** In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51, 1223–1229.
21. **Hammer K. A., et al.** Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 53, 1081–1085.
22. **Marcos-Arias C., et al.** In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complement. Alter. Med. 2011; 11, 119. http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/119
23. **Ramage G., et al.** Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its 3 derivate components: Potential role in management of oral candidosis in cancer patients. Front Microbiol. 2012; 3, 220. http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00220/full
24. **Ahmad A., et al.** In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. J. Med. Microbiol. 2010; 59, 1178–1184.
25. **Abu-Darwish M. S., et al.** Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and antiinflammatory potential: Biomed Res. Int. 2013; 538940. doi: 10.1155/2013/538940. Epub 2013 Oct 9.
26. **Leite M. C. A., et al.** Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. Med. Mycol. 2014; 53, 275–284.
27. **Pinto E., et al.** Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J. Med. Microbiol. 2009; 58, 1454–1462.
28. **Bankova V., et al.** Chemical composition of european propolis: expected and unexpected results. Z. Naturforsch. C. 2014; 57(5–6), 530–533.
29. **Stepanović S., et al.** In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiol. Res. 2003; 158, 353–357.