

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Vliv quorum sensing na kvasinkové
organismy

Diplomová práce

Hradec Králové, 2008

Soňa PETEROVÁ

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC
KRÁLOVÉ

Department of Biological and Medical Sciences

Effect of quorum sensing compounds on
yeasts

Diploma Thesis

Hradec Králové, 2008

Soňa PETEROVÁ

Za odborné vedení děkuji doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc.

Za pomoc při realizování praktické části této práce a cenné rady děkuji paní Mgr. Marcele Vejsové a paní Idě Dufkové.

Tato práce byla podpořena Centrem základního výzkumu č. LC 531 (Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek) MŠMT.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

OBSAH

OBSAH	5
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Houbové organismy a jejich význam pro člověka	11
2.2. Onemocnění způsobená houbami.....	11
2.3. Léčba mykotických infekcí	12
2.3.1 Systémová antimykotika	12
2.3.2 Lokální antimykotika	14
2.4. <i>Candida albicans</i>	14
2.4.1 Morfologie <i>Candida albicans</i>	15
2.5. Kandidóza.....	18
2.5.1 Virulenční faktory <i>C. albicans</i>	19
2.5.2 Vulvovaginální kandidóza.....	21
2.5.3 Rekurentní vulvovaginální kandidóza.....	23
2.5.4 Predispoziční faktory pro vulvovaginální kandidózu.....	23
2.5.5 Klinický obraz a diagnostika	24
2.5.6 Terapie akutní vulvovaginální kandidózy	25
2.5.7 Terapie rekurentní vulvovaginální kandidózy.....	26
2.6. Farnesol	27
2.6.1 Quorum sensing.....	27
2.6.2 Farnesol	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Materiál	30
3.2. Metodika.....	31
3.2.1 Složení a příprava médií.....	31
3.2.2 Příprava inokula	31
3.2.3 Příprava roztoků farnesolu	32
3.2.4 Schéma pokusu.....	32
3.3. Vlastní pokus	33

4 VÝSLEDKY	34
5 DISKUZE.....	44
6 ZÁVĚR.....	46
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	47
8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	50

ABSTRAKT

Farnesol, izoprenoidní alkohol produkovaný kvasinkou *Candida albicans* jako jeden z regulačních faktorů – quorum sensing, ovlivňuje morfologii této kvasinky v závislosti na podmínkách prostředí a velikosti populace kvasinky. V naší práci jsme studovali vliv farnesolu na souboru sedmi kmenů *C. albicans* - CA RVVK 8797, CA RVVK 26 580, CA VVK 25 188, CA VVK 26 736, CA 26 453/00, CA 26 677/00 a ATCC 90028.

Výsledky pokusů potvrdily, že farnesol inhibuje tvorbu klíčících hyf *C. albicans*, přičemž jednotlivé kmeny *C. albicans* jsou k farnesolu různě citlivé. Zatímco například kmen VVK 25 188 reagoval na přítomnost exogenního farnesolu velmi málo, jiné kmeny byly naopak ovlivněny velice výrazně.

Účinek farnesolu byl do značné míry ovlivněn použitým médiem. V indukčním médiu NYP byla inhibice tvorby klíčících hyf farnesolem méně patrná než v prekolostrálním séru .

Také velikost inokula měla vliv na výsledky pokusů s externě přidávaným farnesolem. Při pokusech s velikostí inokula 10^5 cfu/ml se výsledky víceméně shodovaly s výsledky získanými při pokusech s inokulem o velikosti 10^6 cfu/ml, při použití inokula o velikosti 10^7 cfu/ml byl již patrný také vliv endogenně vytvořeného farnesolu a inhibice tvorby klíčících hyf byla výraznější.

ABSTRACT

Farnesol is an isoprenoid alcohol produced by yeast *Candida albicans*. It is a quorum sensing factor, that is effective on morphology of this yeast. The effect depends on environmental conditions and on the size of the yeast population at the same time. Our study was focused on the influence of farnesol on seven strains of *C. albicans* - CA RVVK 8797, CA RVVK 26 580, CA VVK 25 188, CA VVK 26 736, CA 26 453/00, CA 26 677/00 and ATCC 90028.

Our results confirmed, that farnesol inhibits germ tube formation in *C. albicans*. In addition we marked that the sensitivity to farnesol is strain-dependent. For example strain VVK 25 188 reacted on presence of exogenous farnesol very slightly, on the other hand another strains were influenced very distinctively.

The effect of farnesol was highly influenced by medium used for the experiment. The inhibition of germination was less apparent in medium NYP than in precolostral serum.

The size of inoculum also influenced the results of experiments with external added farnesol. The results of experiments with 10^5 cfu/ml inoculum were very similar to results of experiments with inoculum of size 10^6 cfu/ml. When the 10^7 cfu/ml inoculum was used, we observed the effect of exogenous and endogenous farnesol at the same time and the inhibition of germination was more expressive.

SEZNAM ZKRATEK

Atb	antibiotika, antibiotický
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming unit
FPP	farnesyl-pyrofosfát
HK	hormonální kontracepce
SGA	Sabouraudův glukózový agar
VVK	vulvovaginální kandidóza
RVVK	rekurentní vulvovaginální kandidóza

1 ÚVOD

Kvasinka *Candida albicans* patří mezi nejčastější původce mykotických onemocnění člověka. Působí zejména kožní a slizniční mykózy, vzácněji může vyvolat vážné systémové onemocnění, zvláště u imunoalterovaných pacientů. Představuje dominantní etiologické agens vulvovaginální kandidózy, která postihuje více než 70% žen během jejich fertilního věku. Některé pacientky mohou onemocnět vícekrát za život, u predisponovaných žen dochází k atakám i několikrát ročně (rekurentní vulvovaginální kandidóza).

Vzhledem k alarmujícímu nárůstu závažných systémových kandidóz je v posledních desetiletích v centru pozornosti výzkum jak nových látek, které by mohly pomoci v boji proti těmto organismům, tak studium patogenních mechanismů této kvasinky. Jednou z látek zajímavých z obou hledisek se zdá být farnesol. Ten působí jako quorum sensing faktor a ovlivňuje některé vlastnosti *C. albicans*, které by mohly mít vztah k virulenci těchto mikroorganismů.

Cílem práce bylo ověřit vliv farnesolu na tvorbu klíčnicích hyf na souboru sedmi kmenů *C. albicans* získaných z pacientek s akutní a rekurentní formou vulvovaginální kandidózy. Studium bylo zaměřeno nejen na vliv koncentrace farnesolu na morfogenezi *C. albicans*, ale také na vliv velikosti inokula.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Houbové organismy a jejich význam pro člověka

Houby (Fungi) tvoří samostatnou říši živých organismů, jejíž zástupci jsou jedno- i vícebuněčné **eukaryotické** organismy. Jejich buňky se tak svou stavbou podobají více savčím buňkám než bakteriím.

Nejčastěji se jedná o saprofytické organismy, to znamená, že živiny získávají rozkladem různých organických látek jako je celulóza nebo keratin. Jen malá část druhů se adaptovala k parazitismu rostlin a živočichů. Zástupci těchto hub mohou působit velké hospodářské ztráty a být také příčinou četných a za určitých okolností i závažných onemocnění člověka.

Na druhé straně je řada druhů hub využívána člověkem k jeho užitku, např. v potravinářství, medicíně nebo ve farmacii.

2.2. Onemocnění způsobená houbami

Lidský organismus může být houbami poškozen čtyřmi základními způsoby. Alimentární otravy způsobené požitím jedovatých plodnic vyšších hub se nazývají **mycetismy**. U nás se jedná nejčastěji o zástupce rodu *Amanita* (muchomůrka), dále například *Entoloma lividum* (závojenka olovová) nebo *Boletus satanas* (hřib satan).

Dalším projevem poškození zdraví člověka jsou **mykotoxikózy**, tedy otravy toxickými látkami sekundárního metabolismu hub, jako jsou např. aflatoxiny nebo námelové alkaloidy. K těmto otravám dochází nejčastěji zprostředkovaně požitím kontaminované potravy a mezi nejčastější původce patří významní producenti mykotoxinů jako jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*.

Lidský organismus může dále hypersenzitivně reagovat na houbové alergeny představované nejčastěji sporami. Zde mluvíme o **mykoalergiích** a tyto se mohou projevit např. jako alergická rhinitis a astma, chronická bronchitis aj. K nejčastějším alergenním houbám patří např. hyfomycety rodu *Cladosporium* nebo *Aspergillus*, dále některé kvasinky a zygomycety.

Posledním a zároveň nejběžnějším typem onemocnění vyvolaných houbami jsou **mykózy**. Pro tento typ onemocnění je typická kolonizace a

následně proliferace houby ve tkáních nebo v tělních tekutinách člověka. K nákaze může dojít vdechnutím houby, kontaktem (přímým i nepřímým) a traumatem, kdy dochází k porušení přirozené ochranné bariéry hostitele.

Houbové infekce se dělí podle anatomické lokalizace na infekce povrchové, kožní (dermatomykózy), podkožní a hluboké (systémové i lokální). Nejčastěji se v populaci vyskytují mykózy kožní, jejichž původci jsou hlavně zástupci dermatofytů (parazitické druhy rodu *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*).

Z hlediska závažnosti jsou na prvním místě mykózy systémové, které mohou postihnout jeden nebo i více orgánů, diseminovat a přejít do septického stavu ohrožujícího život pacienta. Podle původu rozlišujeme systémové infekce primární a sekundární. Původci primárních mykóz jsou hlavně dimorfní houby a v některých případech také kvasinka *Cryptococcus neoformans*. Z klinického hlediska jsou velice významné sekundární systémové mykózy, nazývané též oportunní. Vyskytují se hlavně u imunodeficitních pacientů převážně jako nozokomiální nákazy (hospitalismy), jejichž původci nejsou za normálních okolností pro člověka nebezpeční. Jedná se hlavně o kandidy, aspergily, kryptokoky a zygomycety (Buchta, 1998).

2.3. Léčba mykotických infekcí

Ve srovnání s antibiotiky máme k terapii mykotických onemocnění k dispozici poměrně málo antimykotik. Buňky hub jsou stejně jako lidské buňky eukaryotní a tato blízkost stavby je příčinou úzkého spektra látek, které je možno použít v terapii mykotických onemocnění. Většina látek smrtících pro houby je totiž zároveň toxická pro člověka. Téměř všechny antimykotické látky působí na úrovni buněčné membrány, kde využívají rozdílnost sterolů obsažených v buněčné membráně hub a lidských buněk.

Antimykotika jsou látky sloužící k terapii jak systémových, tak lokálních mykotických onemocnění, rozlišujeme tedy látky pro celkovou a lokální terapii.

2.3.1 Systémová antimykotika

V současné době jsou nejpoužívanější skupinou z hlediska chemické struktury **azolové deriváty**. Tyto látky inhibují cytochrom P450 a blokují

syntézu ergosterolu. Dělíme je chemicky dále na dvě podskupiny – imidazoly (mají v molekule pětičlenný cyklus se dvěma atomy dusíku) a triazoly (mají tři dusíkaté atomy v pětičlenném cyklu).

Z širokého spektra azolových antimykotik jsou však pro celkovou terapii vhodné jen látky, které jsou v organismu dostatečně stabilní (nepodléhají rychlé metabolické inaktivaci). Z podskupiny imidazolových derivátů se pro celkovou terapii používá **ketokonazol** (p.o.) (dříve také i.v. mikonazol), jeho spektrum účinku zahrnuje dermatofyty, kandidy, dimorfní houby, eumycety, fykomyce a další houby. Pro své nežádoucí účinky je však z terapie vytlačován účinnějšími triazolovými deriváty.

Podskupina triazolů obsahuje u nás čtyři používané látky **flukonazol, itrakonazol, vorikonazol a posakonazol**. Tyto látky mají širší spektrum než imidazoly, flukonazol působí i na kryptokoky, itrakonazol ničí navíc aspergily. Vorikonazol jako jedno z nejnovějších antimykotik této skupiny působí na kmeny kandid a aspergilů rezistentních na flukonazol nebo itrakonazol a je tedy indikován pouze v závažných a odůvodněných případech (invazivní aspergilóza). Posakonazol má velmi široké spektrum účinku podobně jako vorikonazol, navíc zahrnuje i skupinu zygomycetů (Doležal, Buchta, 2006).

Ve fázi klinického zkoušení je **ravukonazol**, širokospektrý derivát flukonazolu, který působí i proti kmenům kvasinek na flukonazol rezistentních (Doležal, Buchta, 2006).

Další skupinou systémových antimykotik jsou **polyenová antimykotika**. Působí na kvasinky i plísně a u nás se pro celkové podání používá **amfotericin B**.

Flucytosin řadíme do skupiny tzv. **antimetabolitů**. Sám o sobě má úzké spektrum účinku, proto se kombinuje s jinými antimykotiky, většinou s amfotericinem B. Tato kombinace je výhodná také proto, že se zde uplatňuje synergismus, tj. vzájemná potenciace účinků obou kombinovaných látek. Využití této kombinace je při léčbě kryptokokové a kandidové meningitidy.

V dermatologii používaná perorální forma **terbinafinu** ze skupiny **allylaminů** se může stát alternativou i v léčbě některých refrakterních slizničních a systémových mykóz. Toto antimykotikum však dosahuje vysokých koncentrací v kůži a nehtech, a proto se téměř výhradně používá v terapii dermatomykóz.

Echinokandiny jsou relativně novou skupinou antimykotických látek s účinkem na aspergily a kvasinky (vyjma kryptokoků). Zástupcem pro celkové použití je **kaspofungin**, ke kterému nedávno přibyly **mikafungin** a **anidulafungin**. Používají se převážně u imunokompromitovaných pacientů při nesnášenlivosti nebo rezistenci na některý z triazolových derivátů nebo amfotericin B.

Dalším zástupcem celkových antimykotik je **griseofulvin**. Je však využíván výhradně v dermatologii k celkové terapii některých forem dermatofytózy (tinea capitis).

2.3.2 Lokální antimykotika

V některých případech houbových infekcí je výhodnější použít antimykotické látky lokálně. Zabrání se tak jejich toxickým účinkům na organismus a při tom lze dosáhnout uspokojivého efektu. Lokální terapie se využívá obzvláště u dermatomykóz. V gynekologii mají přípravky pro lokální použití významné uplatnění v terapii vulvovaginálních infekcí (viz kap. 2.5.6).

Většinu imidazolových antimykotik lze podávat pouze místně, používají se například **klotrimazol**, **isokonazol**, **oxikonazol**, **fentikonazol**, **ekonazol**, **tiokonazol**, ze zástupců triazolových derivátů např. **terkonazol**.

Z polyenových antimykotik se lokálně uplatňují **natamycin** a **nystatin**, které jsou po celkovém podání vysoce toxické, při aplikaci na sliznice se však nevstřebávají.

Lokálně lze použít také allylaminová antimykotika **terbinafin** a **naftifin**, nebo látky jiných chemických skupin jako **amorolfin** či **ciklopirox**.

Dále se lokálně používá mnoho látek s nespecifickým účinkem na mikroorganismy, například **kyselina undecylenová**.

2.4. *Candida albicans*

Rod *Candida* zahrnuje druhy, které patří mezi časté původce povrchových i systémových mykóz, obvykle endogenního původu. Přestože tento rod zahrnuje kolem 200 druhů, jen malé procento z nich je patogenní pro člověka. Důvodem je také fakt, že kolem 65% druhů rodu *Candida* není schopno růst při teplotě lidského těla, tedy 37°C (Calderone, 2002).

Mezi nejvýznamnější zástupce tohoto rodu patří *Candida albicans*, která je klasickým původcem kandidózy. Patogenní jsou také druhy *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* aj.

Zástupci rodu *Candida* se vyskytují celosvětově a jsou adaptovaní na saprofytický způsob života vázaný na člověka. *Candida albicans* se vyskytuje i u zdravých jedinců, kde kolonizuje hlavně orofarynx, rektum, méně kůži. Kůže nebo sliznice jsou také hlavním zdrojem případné endogenní infekce.

Candida albicans je aerobní, růstově málo náročná kvasinka. Dobře roste na Sabouraudově glukózovém agaru (SGA) při teplotě 37°C i 20°C. Patří mezi organismy termofilní, to znamená, že se při teplotě nižší než 20°C nemnoží (Janderová, Bendová, 1999).

Tvoří dva hlavní typy kolonií. V klinickém materiálu jsou to kulaté, vypouklé, hladké a lesklé kolonie s kvasnou vůní, kolonie z materiálu z vnějšího prostředí jsou naopak matné a šedé, tvořené protáhlými kvasinkovými buňkami (Bednář, 1996).

2.4.1 Morfologie *Candida albicans*

C. albicans je řazena mezi dimorfní houby, tj. houby, které se vyskytují ve dvou (i více) morfortypech. Dimorfismus je mechanismus, který těmto houbám umožňuje přežít a množit se v různých prostředích. Dimorfní houby jsou tedy schopné aktivovat na základě signálů z prostředí regulační kaskády, které vedou ke změně morfortypu buněk na formu, která je lépe přizpůsobena daným podmínkám prostředí. Zdá se také, že dimorfismus je úzce spjat s patogenitou hub (Woods, 2002).

Candida albicans se vyskytuje ve více buněčných formách a každá z nich interaguje s hostitelem jinak. Vždy však za účelem umožnit přežití houby.

První morfologickou formou *C. albicans* jsou kvasinkovité buňky zvané **blastokonidie** (obr. 1). To jsou obvykle jednojaderné oválné nebo kulaté buňky o velikosti 3-5 μm , které se množí převážně pučením. Tato fenotypická forma *C. albicans* je obvykle spojena s asymptomatickým osídlením pochvy, ale podílí se také na šíření a přenosu kandid krví nebo jinými tělními tekutinami (Mašata, 2004).



Obr. 1: Kvasinky (Sudbery et al., 2004)

Pučení probíhá vytvářením pupenu na mateřské buňce. Tento pupen se postupně zvětšuje, buněčné organely fragmentují a část jich po rozdělení jádra putuje do pupenu – tedy nově se tvořící kvasinkovité buňky. *C. albicans* patří mezi multipolárně pučící kvasinky, takže pupen u ní může vznikat na jakémkoli místě povrchu buňky, nikdy se však nevytváří na stejném místě (Janderová, Bendová, 1999).

Jestliže během pučení nevznikne přepážka mezi mateřskou a dceřinou buňkou, nedojde k jejich úplnému oddělení a vniká tak postupně **pseudomycelium** tvořené blastokonidiiemi, které jsou protáhlé a vytváří větvené řetízky. Tento typ kvasinkovitých buněk nazýváme **pseudohyfa** (obr. 2) a jsou mezistupněm mezi kvasinkami a hyfami, i když někteří autoři řadí hyfy i pseudohyfy pro jejich podobnost pod společný název „vláknitá forma“ *C. albicans*.



Obr. 2: Pseudohyfy (Sudbery et al., 2004)

Tato podobnost je však jen povrchní. Při bližším zkoumání zjistíme mezi pseudohyfami a hyfami velké rozdíly. Mezi základní rozdíly patří přítomnost konstriktce v místě septa mezi mateřskou a dceřinou buňkou u pseudohyf, která chybí u hyf pravých. Rozdílné je také místo konání první mitózy, která u pseudohyf probíhá v místě krčku mezi mateřskou a dceřinou buňkou, u hyf však probíhá zcela v klíční hyfě (Brown, 2002).

Také pseudomycelium se liší od pravého mycelia a to tím, že koncová buňka pseudomycelia je vždy nejmenší (jedná se o narůstající pupen), kdežto u pravého mycelia je koncová buňka největší (zde se jedná o rostoucí buňku před dělením) (Janderová, Bendová, 1999). Navíc mateřské buňky a jejich pupeny (pseudohyfy) se v pseudomyceliu dělí synchronizovaně, zatímco velká část buněk pravého mycelia je zastavena ve svém růstu (Gow, 2002).

C. albicans může tvořit také pravé **hyfy** (obr. 3), což jsou útvary složené z většího počtu buněk, mezi kterými jsou septa. Hyfy vyrůstají z kvasinkovitých buněk nebo jako větve již existujících hyf a množí se dělením. Mají průměr asi 2 μm a jejich délka bývá mezi 15–22 μm (Gow, 2002).



Obr. 3: Hyfa (Sudbery et al., 2004)

Prvním stádiem hyf jsou tzv. **klíční hyfy**, které vznikají jako výrůstky kvasinkovitých buněk a vyznačují se apikálním růstem. Jedná se o růst do délky a v časných stádiích buněčného cyklu apikálně rostou hyfy i kvasinky. U kvasinek je však vystřídán růstem izotropickým.

Toto významně souvisí s lokalizací aktinu a myozinu na povrchu buněk. Aktin je proteinem umožňujícím cytokinezi, je proto významný také během množení buněk, kdy umožňuje vznik septa mezi mateřskou a dceřinou buňkou. U hyf se však aktin nachází ve vrcholové části po celou dobu průběhu buněčného cyklu a tak umožňuje apikální růst hyfy (Gow, 2002).

Klíční hyfy jsou významným prvkem v diagnostice *C. albicans*, protože *C. albicans* spolu s *C. dubliniensis* jsou zatím jediné známé druhy kandid tvořící klíční hyfy v séru za daných podmínek a klíčení je tedy pro *C. albicans* druhově specifické. Růst hyf může být *in vitro* indukován kultivací *C. albicans* v komplexním médiu, chemicky definovaném médiu nebo v séru při teplotě vyšší než 35°C a pH 6,5 – 7,0 (Calderone, 2002).

Klíčící kvasinky, které vytváří mycelia, mají invazivní vlastnosti a má se za to, že způsobují symptomatické onemocnění. Schopnost tvořit hyfy je tedy významným virulenčním faktorem *C. albicans*. (viz kap. 2.5.1)

Oba hlavní morfotypy (kvasinka a hyfa) se barví pozitivně podle Grama. Hyfy a klíční hyfy se od blastokonidií liší některými povrchovými znaky, jako jsou antigeny buněčné stěny. To je významné při diagnostice časně fáze generalizace systémové kandidózy, protože polysacharidové antigeny hyf se uvolňují do krve při diseminaci onemocnění a dají se proto prokázat v séru (Bednář, 1996).

Za určitých okolností může *C. albicans* tvořit **chlamydospory**. Jedná se o kulaté, silnostěnné útvary, které vyrůstají na koncích i po stranách hyf. Předpokládá se, že se jedná o klidové buňky odolnější k nepříznivým vlivům prostředí.

K tvorbě těchto útvarů dochází při kultivaci *C. albicans* na chudých půdách, např. na rýžovém nebo kukuřičném agaru, nebo na půdách obsahujících žluč (Frágner, 1967). Chlamydospory byly pozorovány i v živých hostitelských tkáních, jejich výskyt je však velmi řídký a význam pro patogenitu je zatím nejasný (Calderone, 2002).

Candida albicans osidluje u člověka kůži a vlhké sliznice trávicího traktu a vaginy, kde žije jako komenzál v kvasinkovité formě. Při změně podmínek prostředí dochází k morfologické konverzi (tvorbě vláknitých forem), která je úžeji spjata s infekčním procesem. Na rozdíl od pravých dimorfních hub však ve tkáni invadované *C. albicans* nalézáme obvykle oba morfotypy. U ostatních dimorfních hub tomu tak není – ty tvoří v infikované tkáni výhradně kvasinkovité buňky.

2.5. Kandidóza

C. albicans je za normálních podmínek komenzál - „spolustolovník“ člověka, který neohrožuje lidské zdraví. Vyskytuje se běžně asi u 20 % populace a frekvence nosičství stoupá s věkem a také v době těhotenství (Greenwood, 1999). Projevuje se převážně jako potenciální patogen způsobující sekundární infekce komplikující jiné onemocnění jako je např. TBC, diabetes mellitus, karcinom nebo hemoblastóza. Infekce může vzniknout také po terapii širokospektrými antibiotiky, která naruší složení normální mikroflóry.

V poslední době však významně roste počet exogenních infekcí s mezilidským přenosem. Jedná se převážně o nozokomiální kandidózy. Stále

častěji vznikají tyto infekce primárně (tedy bez předchozího oslabení imunity postiženého). Tyto primární infekce jsou vyvolané virulentnějšími kmeny *C. albicans*, přičemž virulence se u různých kmenů výrazně liší (Bednář, 1996).

2.5.1 Virulenční faktory *C. albicans*

Pro patogenitu *C. albicans* jsou významné některé vlastnosti. V první řadě se jedná o schopnost **adherence** k hostitelské buňce a schopnost kolonizovat povrchy. Patogenní druhy kandid adherují k povrchům lidského těla lépe než druhy nepatogenní.

Adheziny *C. albicans* jsou obvykle polysacharidy a glykoproteiny. Z glykoproteinů je významným adhezinem **manoprotein**. Buněčná stěna kvasinek *C. albicans* obsahuje kolem 50% manoproteinů. Ve střední vrstvě buněčné stěny plní strukturní funkci, hlavně se však nachází ve vnější vrstvě, kde jako součást antigenních struktur *C. albicans* umožňuje adhezi kvasinek k různým povrchům lidského organismu. Zároveň ale také inhibuje schopnost makrofágů rozeznat danou kvasinku jako cizorodý objekt a tak ji chrání před fagocytózou (Calderone, Gow, 2002; Janderová, Bendová, 1999).

Dalším důležitým faktorem podmiňujícím patogenitu je schopnost **klíčení a tvorby hyf**. Tato schopnost je spojována s invazivitou kandid, protože klíčící buňky nejenže lépe adherují, ale také se mohou germinací uvolnit z fagocytů po ingesci. Vlákňité formy kandid prorůstají do tkání, tento morfortyp je tedy považován za virulentnější, parazitickou formu *C. albicans*.

Je nutné ovšem poznamenat, že patogenní jsou obě formy *C. albicans* - hyfy i kvasinky. Oba morfortypy mají svou roli v určité fázi proliferace onemocnění. Hyfy se svojí schopností najít poškození epitelii nebo endoteliálních povrchů jsou zodpovědné za invazi do tkání, kvasinky zase podporují diseminaci tělními tekutinami (Brown, 2002).

Významnou podmínkou patogenity *C. albicans* je také schopnost **produkovat kyselou proteinázu**, která má keratolytické účinky a umožňuje invazi *C. albicans* do kůže. Také fosfolipáza C má pravděpodobně svůj podíl na virulenci *C. albicans* (Bednář, 1996).

Kandidóza se převážně projevuje jako lehké onemocnění kůže a sliznic dýchacího systému, GIT nebo urogenitálního traktu.

Na kůži se jedná o dermatomykózy a úporné onychomykózy. Ty se od onychomykóz vzniklých působením dermatofytů liší tím, že nehtová ploténka se v případě napadení kandidami nerozpadá ani netřepí, jsou na ní bělavé skvrny, které mohou být namodralé či nazelenalé, a nehet se neztlušťuje, ale naopak se nápadně ztenčuje (Frágner, 1967).

Na sliznicích se kandidóza obvykle projevuje v dutině ústní jako soor (moučnivka), vyskytuje se u novorozenců, kteří se nakazí při porodu průchodem vagínou napadenou kandidami. Zástupci rodu *Candida* (převážně *Candida albicans*) často napadají právě sliznici vagíny, kde způsobují vulvovaginitidy (viz kap.2.5.2).

Nejtěžší formy kandidózy jsou infekce diseminované a orgánové. Při nich se kandidy dostávají invazivně nebo hematogenně do tkání a postihují plíce, GIT, ledviny a další důležité orgány.

Závažná je také skutečnost, že *C. albicans* je častým původcem nozokomiálních nákaz, jejichž výskyt v posledním desetiletí zaznamenal několikanásobný nárůst.

Příčiny vzniku sekundární kandidózy lze rozdělit na vnitřní a vnější. K vnitřním příčinám patří stavy oslabující obranyschopnost pacienta (maligní tumory a jiná těžká celková onemocnění), nedostatečná výživa, věk a podstatnou roli hrají také poruchy imunity, protože kandidóza je typickým projevem imunodeficitů vrozených i získaných.

Vnější vlivy jsou často příčinou vzniku kandidózy jako hospitalismu, protože zahrnují právě úkony prováděné ve zdravotnických zařízeních v rámci terapie nebo diagnostiky. Mezi tyto příčiny patří např. léčba imunosupresivy nebo cytostatiky, kandidóza ale také často vzniká jako superinfekce po léčbě antibiotiky. Další příčinou vzniku kandidózy může být zavlečení kandid do krve kontaminovanými cévními katetry nebo infúzními roztoky

2.5.2 Vulvovaginální kandidóza

Vulvovaginální infekce jsou nejčastějším onemocněním v gynekologii. Jedná se o záněty zevních rodidel a pochvy, které způsobují jednak exogenní mikroorganismy, ale také mikroorganismy endogenní, tvořící za normálních podmínek běžnou vaginální mikroflóru. Někdy může docházet pouze k lokalizovanému poškození zevních rodidel. Při zánětu vulvy je rizikovým faktorem její blízkost s konečníkem, pochvou, močovou trubicí a také fakt, že je vulva místem vlhké zapářky. Při vzniku infekce pochvy hraje významnou roli poševní sliznice a její mikroflóra.

Mezi nejčastější příčiny vaginálních zánětů patří infekce vyvolané kandidami, trichomonádami nebo anaerobními bakteriemi jako je *Gardnerella vaginalis* a *Mobiluncus* spp. Kandidy zaujímají druhé místo v žebříčku nejčastějších vyvolavatelů poševních infekcí, přičemž v 85-90% případů kvasinkové infekce je zjištěna přítomnost kmenů *C. albicans* (Mašata, Jedličková, 2004). Dalšími, tzv. non-*albicans* druhy, jsou *C. glabrata* a *C. tropicalis*. Infekce způsobené těmito druhy kandid postihují většinou imunosuprimované pacientky a mohou být rezistentní na běžnou léčbu, což představuje pro tyto pacientky určité riziko.

Pochva je kolonizována různými druhy aerobních i anaerobních mikroorganismů. Tato mikroflóra se významně podílí na podmínkách vaginálního prostředí a tak napomáhá k ochraně vaginy před vznikem infekcí způsobených exogenními patogeny. Endogenní mikroorganismy jsou totiž lépe adaptované na prostředí pochvy a mohou sliznici po jejím případném narušení (např. po terapii antibiotiky) snadno rekolonizovat. Nejznámější bakterie osidlující pochvu jsou zástupci rodu *Lactobacillus*. Tyto bakterie produkují kyselinu mléčnou, která spolu s dalšími dosud ne zcela objasněnými mechanismy snižuje poševní pH a omezuje tak růst jiných mikroorganismů. Některé kmeny mají také schopnost uvolňovat peroxid vodíku a tím omezují růst některých potenciálně patogenních anaerobních mikroorganismů (Špaček et al., 1997).

Acidobazické podmínky v pochvě jsou tak velice významným faktorem vzniku infekce, protože pH určuje osídlení pochvy mikroorganismy.

Normální osídlení pochvy je do pH 4,5. Při vyšších hodnotách pH není toto osídlení prakticky možné.

Pro normální kolonizaci pochvy je také významná estrogenní stimulace. Bylo prokázáno, že složení bakteriální flóry se v pochvě mění v závislosti na menstruačním cyklu. Přítomnost estrogenu zvyšuje výskyt normální mikroflóry na poševní sliznici (Mašata, Jedličková, 2004).

Součástí flóry pochvy je i *C. albicans*, která se vyskytuje asi u 20% žen bez toho, aby vyvolávala klinické příznaky kandidózy (Mašata, Jedličková, 2004). Tato kolonizace může přetrvávat i mnoho let. Asi 75% žen v reprodukčním věku však prodělá alespoň jednu kandidovou infekci (Špaček et al., 2000), téměř polovina z nich i dvakrát. Některé pacientky trpí VVK opakovaně, v takovém případě hovoříme o **rekurentní kandidové vulvovaginitidě** (RVVK, viz dále).

Výskyt vulvovaginální kandidózy se v poslední době výrazně zvyšuje. Vzniku infekce předchází třístupňový proces, při kterém dojde nejprve k adhezi *C. albicans* na epitel pochvy. Adheze umožní germinaci blastospor a vznik mycelií, která jako invazivní formy *C. albicans* pronikají do epitelu.

Candida albicans má daleko vyšší afinitu k poševní sliznici než jiné druhy kandid. Tím lze vysvětlit skutečnost, že většina vulvovaginálních kandidóz je způsobena právě *C. albicans*.

K adhezi na sliznici pochvy dochází díky manoproteinu přítomném v buněčné membráně kandid. Tento adhezín rozpoznává na povrchu buněk poševního epitelu specifický receptor, na který se naváže (Mašata, Jedličková, 2004). Přítomnost tohoto receptoru a jeho hojnost na epitelových buňkách je tedy také důležitá z hlediska vnímavosti ženy k infekci. Z tohoto pohledu je pro adhezenci kandid významné působení estrogenů na vaginální epitel, protože zvyšují tvorbu glykoproteinových komplexů, které slouží jako receptory pro blastospory a tím potencují adhezenci kandid k epitelu. Proto je také VVK vzácná při hypoestrinních stavech (premenarche, postmenopauza) a naopak velmi častá během těhotenství (Mašata, Jedličková, 2004).

V neposlední řadě ovlivňují schopnost kandid adherovat ke sliznici pochvy také laktobacily. Ty s kandidami kompetují o receptory na epitelových buňkách. Při redukci nebo narušení složení normální mikroflóry vaginálního

prostředí tak může snadněji vzniknout kandidová infekce (Mašata, Jedličková, 2004).

2.5.3 Rekurentní vulvovaginální kandidóza

Jedná se o vulvovaginální kandidovou infekci, která se pacientkám v určitých intervalech vrací. Při vyšetření těchto pacientek většinou není nalezena žádná vyvolávající příčina. Předpokládalo se, že vyvolávacím faktorem je opakovaná reinfekce vagíny kandidami z rekta nebo při pohlavním styku. To se ale jednoznačně nepotvrdilo. Několik studií sice prokázalo v akutní fázi infekce přítomnost stejných kmenů *C. albicans* také v rektu, ale jiné studie například neprokázaly redukci VVK po perorální aplikaci nystatinu, který snižuje střevní kolonizaci (Mašata, Jedličková, 2004).

Studie prokazující vliv sexuálního přenosu kvasinek jako vyvolávajícího faktoru dosud nebyly provedeny. U partnerů žen s RVVK však bývá 4x častější asymptomatické osídlení penisu kvasinkami, než u partnerů neinfikovaných žen (Mašata, Jedličková, 2004).

Nález u pacientek trpících RVVK je i během ataky většinou normální bez zánětlivých změn na sliznici pochvy (na rozdíl od akutní VVK), a proto je v těchto případech vždy nutné mikrobiologické vyšetření poševního sekretu (Špaček et al., 2000).

2.5.4 Predispoziční faktory pro vulvovaginální kandidózu

Jak již bylo řečeno, pro vznik VVK existuje spousta predispozičních faktorů, které zvyšují citlivost ženy ke kandidám a zvyšují tak riziko vzniku infekce. Jedním z těchto faktorů je **těhotenství**. Obecně během těhotenství je vaginální sliznice daleko vnímavější pro kandidózu než sliznice netěhotné ženy, přičemž největší počet infekcí těhotných žen vzniká ve třetím trimestru. Zásluhu na tom má v tomto období zvýšená hladina pohlavních hormonů (hlavně estrogenů), které zvyšují množství glykogenu v pochvě a tak zlepšují podmínky pro růst a množení kandid, včetně podpory konverze kvasinkovité formy do myceliální u *C. albicans*.

Na principu zvýšené hladiny hormonů je založen i predispoziční efekt **hormonální antikoncepce s vysokými dávkami estrogenů**. Naproti tomu preparáty se sníženým obsahem estrogenů nevedly ke zvýšenému výskytu VVK (Mašata, Jedličková, 2004).

Dalším predispozičním faktorem je **diabetes mellitus**. Pacientky trpící touto chorobou mají poševní sliznici častěji kolonizovanou kandidami a to opět zvyšuje riziko propuknutí infekce.

Zmíněn byl také vliv **antibiotické terapie**, zejména širokospektrými atb. Antibiotika obecně zpomalují růst nebo ničí různé mikroorganismy, atb se širokým spektrem takto působí i na přirozenou mikroflóru pochvy a eliminují tak endogenní vaginální osídlení. To má za následek zvýšení rizika osídlení vaginální sliznice kandidami s následnou možností propuknutí kandidové infekce.

Mezi další faktory zvyšující incidenci vulvovaginální kandidózy patří např. **přiléhavé nylonové prádlo, používání výplachů, deodorantů a parfémovaných toaletních potřeb, také plavání v bazénech s chlorovanou vodou** a následné **dlouhodobé nošení vlhkých plavek**, ale také nadměrný příjem **glycidů** v potravě (Mašata, Jedličková, 2004).

2.5.5 Klinický obraz a diagnostika

Klinický obraz se u různých pacientek výrazně liší. Všechny však mají pruritus. Typickým objektivním příznakem VVK je bělavý tvarohovitý nebo sýrovitý výtok, který ale může být i vodnatý nebo hustý homogenní. Většinou nezapáchá a na rozdíl od pruritu nemusí být u všech postižených. U některých pacientek převládá exsudativní forma VVK s hojným výtokem, u jiných není výtok téměř žádný. Často je při VVK bolestivá pochva, vulva pálí. Tyto subjektivní příznaky však nejsou specifické a nemohou být podkladem diagnózy VVK (Buchta et al., 1997). Dále může být přítomna dyspareunie a dysurie. Obvykle bývá také erytém a edém stydkých pysků a vulvy, erytém nalézáme i v pochvě. Tyto příznaky se většinou objevují týden před začátkem menstruace a během ní se zmírňují (Mašata, Jedličková, 2004).

V diagnostice VVK se využívá objektivního popisu charakteristických klinických příznaků (viz výše) a mikroskopie vaginálního sekretu (Buchta et al., 1997). Toto jednoduché vyšetření nativního preparátu jednoznačně prokáže přítomnost kvasinek a mycelií. Z patogenetického hlediska je významný nález hyfálních nebo pseudohyfálních forem *C. albicans*, protože tyto formy jsou spojovány s invazivitou této kvasinky (viz kap. 2.4.1) Při negativním výsledku a při RVVK je nutná kultivace na Sabouraudově a

Nickersonově agaru a dále je třeba provést vyšetření citlivosti k antimykotikům (Mašata, Jedličková, 2004).

Diagnóza a terapie vulvovaginální vaginitidy je u části pacientek komplikována výskytem atypických klinických projevů (Buchta et al., 1998).

2.5.6 Terapie akutní vulvovaginální kandidózy

K léčbě akutní kandidové vulvovaginitidy lze využít lokální i celkové prostředky. Z lokálních antimykotik se v současné době nejvíce používají **azolová antimykotika** v různých lékových formách (krém, vaginální globulky, vaginální tablety, ...), jejichž účinnost se pohybuje mezi 85–90%. K nejčastěji používaným látkám patří imidazoly jako např. klotrimazol, mikonazol, ekonazol, z novějších butokonazol, oxikonazol a fentikonazol, triazolové antimykotikum terkonazol aj. (Mašata, Jedličková, 2004; Buchta et al., 1998).

Dále se v lokální terapii stále ještě používají polyenová antimykotika **natamycin** a **nystatin**, která mají ale nižší účinnost než imidazoly.

Ciklopiroxolamin patří do skupiny **hydroxypyridonových antimykotik**. Používá se hlavně pro terapii VVK a dále pro léčbu smíšených mykotických a bakteriálních infekcí.

Lokálně lze také využít kombinace antimykotik s jinými antimikrobními látkami. Nejčastěji se kombinuje nystatin a nifuratel, nebo nystatin s neomycinem a polymyxinem B.

V neposlední řadě má v lokální terapii význam také dezinfekce. Antimykotickým účinkem se vyznačuje **jodpovidon**. Používá se u smíšených infekcí (Mašata, 2004).

Vlastní terapie se provádí v 1–3 denních cyklech, kdy se aplikuje antimykotikum ve vysoké dávce, která zaručí dostatečnou inhibiční koncentraci této látky i po ukončení léčby.

Celkové antimykotické preparáty podávané per os jsou vysoce účinné. V současné době jsou v ČR nejvíce používané dvě látky patřící do skupiny azolových antimykotik – triazoly **flukonazol** (v dávce 150 mg) a **itrakonazol** (400 mg), které se podávají jednorázově, itrakonazol i v nižší dávce (200 mg) po tři dny. Lékem volby akutní vulvovaginální kandidózy je flukonazol, který

má lepší farmakologické vlastnosti (hlavně minimum lékových interakcí a vedlejších nežádoucích účinků) (Buchta et al., 1998).

Léčba celkovými antimykotiky není významně lepší než terapie lokální, spíše se u ní projevuje negativní vliv nežádoucích účinků vyplývajících z celkového působení těchto látek, kdy je možná hepatotoxicita nebo interakce s jinými léčivými, zejména s látkami, které se metabolizují na cytochromu P 450. Studie ovšem ukazují, že v případě možnosti volby pacientky upřednostňují právě perorální terapii před lokální (Mašata, Jedličková, 2004).

2.5.7 Terapie rekurentní vulvovaginální kandidózy

Terapie rekurentní vulvovaginální kandidózy je obtížná. Dostupné přípravky sice rychle odstraní klinické příznaky akutní ataky, ale z dlouhodobého hlediska se nejedná o vyléčení RVVK, protože tato terapie nevede k eradikaci houbového agens a nezabrání další atace. Na rozdíl od sporadické VVK vyžaduje ataka rekurentní vulvovaginální kandidózy delší terapii, obvykle od 3 do 14 dnů (Buchta et al., 1998).

Před vlastní farmakoterapií je nutné zjistit a vyloučit všechny rizikové faktory (viz kap. 2.5.4). Samotné protiinfekční látky v případě akutní ataky RVVK neodstraní podstatu problému, odstraní pouze klinické projevy. To je důvod, proč po zdánlivém vyléčení dojde během několika měsíců k opětovnému propuknutí infekce.

Vždy je nutná dlouhodobá profylaktická aplikace antimykotik, s výhodou se v tomto případě podávají antimykotika celková. Doporučuje se podávat 150–300 mg **flukonazolu** vždy při zahájení menzes po dobu 4–12 měsíců.

Alternativou celkové terapie je terapie lokální. V některých případech je efektivní také desenzibilizace kvasinkovým antigenem. Vhodné je terapii RVVK doplnit lokální aplikací přípravků s laktobacily (Mašata, Jedličková, 2004).

2.6. Farnesol

2.6.1 Quorum sensing

Quorum sensing jsou látky, které regulují genovou expresi a umožňují buňkám koordinovanou reakci na signály z vnějšího prostředí a možnost se přizpůsobit novým měnícím se podmínkám. Vedle toho slouží jako nástroj komunikace v rámci populace téhož druhu, možná i na mezidruhové úrovni. Tento mechanismus byl poprvé sledován u bakterií.

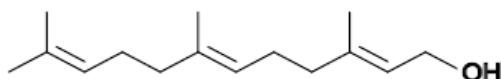
Látky, které působí jako signály quorum sensing, se nazývají regulační faktory. Tyto chemicky různorodé látky se zapojují do regulace mnoha důležitých biologických funkcí, jako je např. luminiscence, produkce antibiotik, ale i virulence nebo tvorba biofilmu (Zhang, Dong, 2004), což má velký význam v medicíně při hledání účinných protimikrobiálních látek k terapii různých infekcí.

Quorum sensing je proto jedním z předmětů mikrobiologických výzkumů posledního desetiletí.

2.6.2 Farnesol

Farnesol je seskviterpenický alkohol, který se vyskytuje běžně v přírodě jako součást mnoha éterických olejů rostlin. Chemicky se jedná o *E,E*-3, 7, 11-trimethyl-2, 6, 10-dodekatrien-1-ol (obr. 4), jeho molekulová hmotnost je 222,37. Je to látka lipofilní, ve vodě špatně rozpustná (vytváří maximálně 1,2 mM roztoky) a termostabilní.

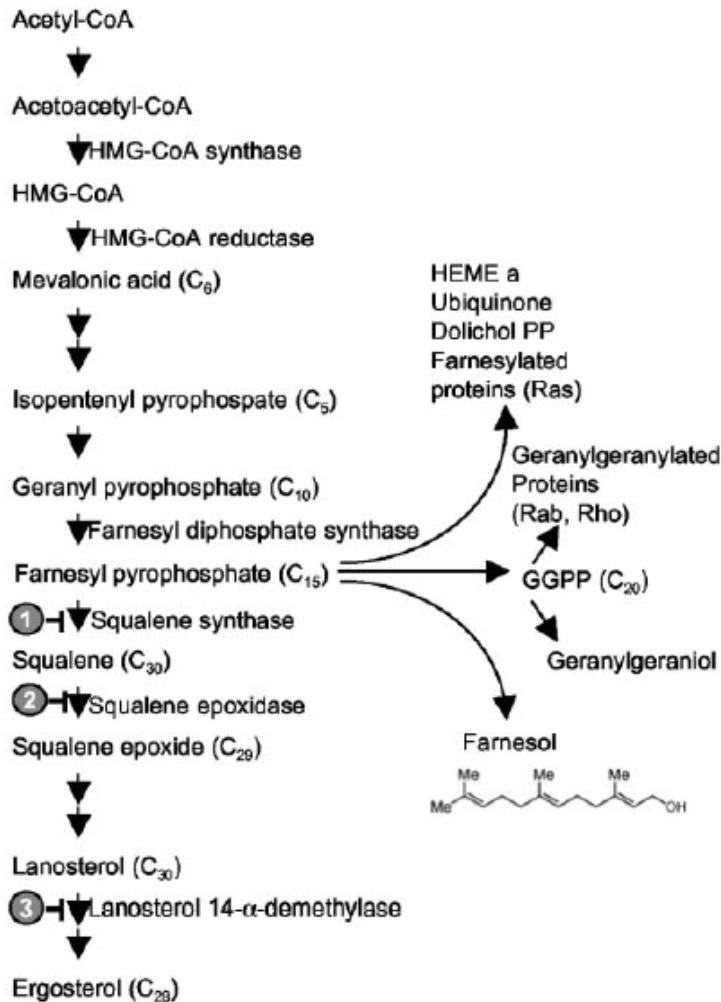
Vzhledem k jeho chemické struktuře se farnesol může vyskytovat ve čtyřech izomerických formách, aktivitu quorum sensing má však pouze izomer *E,E*.



Obr. 4: Strukturální vzorec farnesolu

Farnesol je v buňkách *C. albicans* tvořen v aerobním prostředí při teplotě 15-42°C. Vzniká alternativní cestou při syntéze ergosterolu defosforylací farnesyl-pyrofosfátu (FPP) (Obr. 5), který je důležitým

prekurzorem při posttranslační modifikaci proteinů (Nickerson et al., 2006). Farnesylované proteiny (tedy proteiny s navázaným farnesylem pocházejícím z FPP) hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech.



Obr. 5: Schéma syntézy farnesolu (Nickerson et al., 2006)

Jako substance je farnesol znám již delší dobu a jako součást silic je využíván např. v parfumerii. V poslední době je zkoumán také jeho protirakovinný efekt.

Hlavním předmětem výzkumu je však v posledním desetiletí farnesol jako regulační faktor u kvasinky *C. albicans*. Bylo zjištěno, že ovlivňuje nejen růst (ve vysokých koncentracích v médiu růst inhibuje), ale také morfologii (při nízkých koncentracích v médiu) a tvorbu biofilmu u těchto hub, a proto je také potenciální antifungální látkou pro prevenci kandidových infekcí.

Farnesol jako quorum sensing signál má vliv na tvorbu hyf u *C. albicans*. Pokud je přidán do média současně se sérem (jeden z faktorů

podmiňujících tvorbu hyf, viz kap.2.4.1), dochází ke snížení počtu vytvořených hyf oproti médiu bez farnesolu. Pokud je však farnesol přidán po delší době, je pozorován menší vliv, protože farnesol blokuje pouze tvorbu hyf, nikoli však prodlužování již vytvořených klíčnicích hyf (Saidi et al., 2006).

K jeho tvorbě dochází kontinuálně během růstu buněk a množství vytvořeného farnesolu je proporcionální k velikosti populace (Hornby et al., 2001). Tím se dá vysvětlit, proč se quorum sensing efekt projeví až při vyšší hustotě inokula (nad 10^6 cfu/ml). Při tomto počtu buněk je již koncentrace farnesolu dostačující pro inhibici tvorby klíčnicích hyf u *C. albicans*.

Vzhledem k tomu, že farnesol působí na úrovni metabolismu, nezabíjí buňky *C. albicans*, a proto je řazen k potenciálním antifungálním látkám nové generace. Výhodou při jeho uplatnění v medicíně by mohl být také nižší výskyt rezistence na tuto látku vzhledem k tomu, že kvasinky nezabíjí (Hornby et al., 2001).

Vlastní mechanismus účinku farnesolu však nebyl dosud objasněn. Zdá se, že působí na úrovni genové exprese a inhibuje kaskádu proteinkinázy aktivované mitogeny (MAP). Tato biochemická cesta je pokládána za jednu z regulačních mechanismů morfogeneze u *C. albicans*. Produktem této kaskády je protein (GAP1mRNA), který se podílí na vzniku hyf u *C. albicans*. Zdá se tedy, že inhibicí tvorby tohoto proteinu farnesol inhibuje také tvorbu hyf u *C. albicans* (Sato et al., 2004).

Svým účinkem na morfologii *C. albicans* má farnesol vliv zároveň na tvorbu biofilmu (Nickerson et al., 2006). Tvorba biofilmu je dalším z virulencních faktorů *C. albicans*. Pro jeho vznik je však potřeba přítomnosti obou morfotypů *C. albicans*, tedy kvasinek i hyf. Inhibicí tvorby hyf tak farnesol vlastně inhibuje také tvorbu biofilmu a tím by mohl mít význam při předcházení vzniku kandidových infekcí u katetrizovaných pacientů.

Otázkou zůstává, k čemu farnesol kvasinkám *C. albicans* slouží. Podle jedné hypotézy farnesol pomáhá eliminovat nežádoucí příživníky v prostředí lidského organismu. Pro jiné houbové organismy je totiž toxický (v koncentraci nad 300 μ M) (Nickerson et al., 2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Kmeny *Candida albicans*

Candida albicans RVVK 8797

Candida albicans RVVK 26 580

Candida albicans VVK 25 188

Candida albicans VVK 26 736

Candida albicans 26 453/00

Candida albicans 26 677/00

Candida albicans ATCC 90028

Přístroje a pomůcky

Skleněné a plastové zkumavky

Ependorffovy zkumavky

Automatické pipety ACURA 825

Laminární box CLEAN AIR Type DLF 360 (Woerden)

Mikrobiologický inkubátor TCH100 (Laboratorní přístroje Praha)

Třepačka MS2 MINISHAKER (IKA)

Mikroskop OLYMPUS BX40

Počítadlo LEUCONOR 2

Denzitometr BIOSAN (McFarland)

Počítačové programy Microsoft® Word a Excel

Chemikálie

Methanol (Sigma)

Aqua pro injectione (Fresenius Kabi)

Farnesol (Fluka-Chemie)

Sabouraudův glukózový agar (HIMEDIA)

Testovací médium: NYP (Marichal, 1986)

Prekolostrální telecí sérum (Sevapharma)

1.2. Metodika

3.2.1 Složení a příprava médií

Sabouraudův glukózový agar (SGA)

Složení: Glukóza	20,0 g
Neopepton	10,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

Příprava: Složky agaru byly smíchány a rozvařeny. Poté byl SGA sterilizován autoklávováním při 121°C po dobu 15 minut. pH takto připraveného SGA je v rozmezí $5,6 \pm 0,2$ a neupravuje se.

NYP

Složení: N-acetyl-D-glukosamin	0,0221 g
L-prolin	0,0115 g
NaCl ₂	0,45 g
YNB	0,335 g
Destilovaná voda	100,0 ml

Příprava: Jednotlivé suroviny byly rozpuštěny v daném množství destilované vody. Pomocí NaOH 10M bylo následně upraveno pH tak, aby jeho hodnota byla v rozmezí 6,7–6,75.

Sérum z telecí krve bylo uchováváno zamražené při teplotě -15°C. Před použitím bylo nutné jej rozmrazit a promíchat.

3.2.2 Příprava inokula

Pokusy byly prováděny se sedmi kmeny *Candida albicans* (CA), a to CA RVVK 8797, CA RVVK 26 580, CA VVK 25 188, CA VVK 26 736, CA ATCC 90028, CA 26 453/00 a CA 26 677/00. Jedná se o sbírkové kmeny a izoláty z pochvy získané ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové od pacientek trpících vulvovaginální kandidózou.

Jednotlivé kmeny byly uchovávány v lednici při 4°C na SGA a před každým pokusem byly přeočkovány na sterilní SGA a 24 hodin inkubovány při teplotě 37°C. Z takto připravených kmenů byly těsně před začátkem pokusu vytvořeny vodné suspenze o denzitě odpovídající konečné velikosti

inokula 10^5 , 10^6 a 10^7 cfu/ml. Tato velikost byla ověřena pomocí Bürkerovy komůrky.

3.2.3 Příprava roztoků farnesolu

Při pokusech se pracovalo s koncentrací farnesolu 300 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$ a 3 $\mu\text{mol/l}$.

Před začátkem pokusu bylo připraveno 5 ml NYPu nebo séra o takové koncentraci farnesolu, že po přidání 10 μl inokula do 0,5 ml tohoto média bylo dosaženo koncentrace farnesolu 300 $\mu\text{mol/l}$.

Nejprve byl připraven 5% roztok farnesolu v methanolu, kdy se 5,69 μl farnesolu rozpustilo ve 120 μl methanolu. 8,6 μl tohoto roztoku pak bylo přidáno do 4991,4 μl séra nebo NYPu a po důkladném protřepání bylo takto připravené médium rozplněno do zkumavek.

Nižších koncentrací farnesolu bylo dosaženo následným naředěním koncentrovanějšího roztoku NYPem nebo sérem desetkrát za vzniku koncentrace 30 $\mu\text{mol/l}$ a stolet za vzniku koncentrace 3 $\mu\text{mol/l}$. Obě takto připravená média byla také rozplněna po 0,5 ml do Ependorffových zkumavek.

3.2.4 Schéma pokusu

K testování účinku farnesolu na kmeny *C. albicans* byla použita metoda hodnocení buněk v Bürkerově komůrce.

1. Příprava: a) příprava média
b) příprava kmenů
2. Vlastní pokus: a) příprava suspenzí testovaných kmenů
b) příprava testovacího média jako roztoku farnesolu o požadované koncentraci
c) rozplnění testovacího média do Ependorffových zkumavek
d) inokulace
e) inkubace 3 hodiny v termostatu při 37°C
3. Odečítání výsledků vizuálně počítáním buněk pod mikroskopem
4. Vyhodnocení, zpracování výsledků

3.7. Vlastní pokus

Nejprve bylo připraveno inokulum suspendováním jednotlivých kmenů *C. albicans* do přibližně 3 ml vody na injekci a následným ověřením správné denzity suspenze každého kmene pomocí denzitometru. Pro velikost inokula 10^5 cfu/ml bylo potřeba vytvořit suspenzi o denzitě blízké hodnotě 2,7. Pro inokulum o velikosti 10^6 cfu/ml bylo třeba mít suspenzi o denzitě přibližně 6,4 a pro velikost 10^7 cfu/ml byla nutná počáteční denzita suspenze 13-14.

Správná velikost inokula byla vždy zkontrolována pomocí Bürkerovy komůrky ve vzorku 0,5 ml média s přidanými 10 μ l suspenze, což odpovídá testovacím podmínkám.

Poté bylo připraveno médium s požadovanou koncentrací farnesolu (viz kap.3.2.3) a po rozplnění tohoto média do zkumavek bylo do každé přidáno 10 μ l suspenze tak, abychom pro každý kmen získali tři zkumavky o různé koncentraci farnesolu.

Po důkladném promíchání Ependorffových zkumavek na třepače byly tyto zkumavky s konečnou koncentrací obsaženého farnesolu umístěny do inkubátoru nastaveného na 37°C.

Po třech hodinách proběhlo vizuální vyhodnocení pokusu počítáním vytvořených klíčnicích hyf, případně pseudohyf, pod mikroskopem (zvětšení 200x) v Bürkerově komůrce se 13 μ l testovaného média.

Výsledky byly zaznamenány do tabulek a následně vyhodnoceny statisticky pomocí programu Microsoft® Excel.

Důležitým faktorem při pokusech bylo důkladné protřepávání Ependorffových zkumavek jak během přípravy testu, tak (a to hlavně) po vyjmutí z inkubátoru před konečným hodnocením, protože kvasinky časem klesají ke dnu zkumavky a při nedokonalém protřepání nebylo možné hodnotit počet vytvořených klíčnicích hyf vzhledem k nedostatku jakýchkoli buněk, a proto byl pokus znehodnocen.

4 VÝSLEDKY

Nejprve byla testována schopnost kmenů *Candida albicans* tvořit klíční hyfy v používaných testovacích médiích. V následujících pokusech byl sledován vliv farnesolu na tvorbu klíčících hyf kvasinek o hraniční velikosti inokula 10^6 cfu/ml, při které by buňky ještě neměly produkovat farnesol v takovém množství, aby ovlivnil jejich morfologii. Tyto pokusy byly provedeny v obou testovacích médiích, tedy v NYPu i v séru. Další pokusy s velikostí inokula 10^5 a 10^7 cfu/ml se prováděly pouze na vybraných kmenech a pouze v NYPu. Pro kontrolu byly provedeny také testy médiem obohaceným pouze o methanol používaný při ostatních pokusech jako rozpouštědlo pro farnesol. Výsledky pokusů jsou sumarizovány v Tab.1 až 10c.

Testovací médium prekolostální telecí sérum, velikost inokula 10^6 cfu/ml

Tab. 1 Tvorba klíčících hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	44,5	0,71	54,5	2,12	1,0	1,41
RVVK 26 580	23,3	4,04	72,7	4,51	4,0	1,00
ATCC 90028	68,5	6,36	30,0	7,07	1,5	0,71
VVK 25 188	3,3	1,53	94,7	1,53	2,0	2,00
VVK 26 736	43,7	3,51	51,0	2,65	5,3	1,53
CA 26 677/00	19,5	4,95	76,5	3,54	4,0	1,41
CA 26 453/00	24,5	0,71	71,0	1,41	4,5	2,12

% K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 2 Vliv methanolu* na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	49,0	1,41	49,0	2,83	2,0	1,41
RVVK 26 580	20,5	0,71	76,0	1,41	3,5	0,71
ATCC 90028	64,5	4,95	34,0	4,24	2,0	1,41
VVK 25 188	3,0	1,41	96,5	0,71	1,0	0,00
VVK 26 736	46,5	4,95	50,0	4,24	3,5	0,71
CA 26 677/00	18,0	7,07	80,5	6,36	1,5	0,71
CA 26 453/00	28,0	2,83	67,5	4,95	4,5	2,12

* 0,0172% (v/v)

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 3a Vliv farnesolu o koncentraci 300 μ mol/l na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	99,0	0,00	0,0	0,00	1,0	0,00
RVVK 26 580	98,7	1,53	0,0	0,00	1,3	1,53
ATCC 90028	99,5	0,58	0,3	0,50	0,3	0,50
VVK 25 188	94,7	3,21	3,0	3,00	2,3	1,15
VVK 26 736	98,3	1,53	0,0	0,00	1,7	1,53
CA 26 677/00	94,3	3,51	3,7	3,21	2,0	2,00
CA 26 453/00	95,0	2,83	1,5	0,71	3,5	3,54

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 3b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	95,0	2,00	1,3	1,53	2,0	2,00
RVVK 26 580	95,0	1,00	4,0	1,00	0,7	1,15
ATCC 90028	99,3	1,15	0,7	1,15	0,0	0,00
VVK 25 188	59,5	2,12	33,5	3,54	7,0	1,41
VVK 26 736	96,0	1,00	0,0	0,00	4,0	1,00
CA 26 677/00	64,7	7,02	32,0	6,24	2,7	1,53
CA 26 453/00	75,0	4,00	15,0	3,46	10,0	5,29

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 3c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	70,7	4,16	27,3	3,51	2,0	1,00
RVVK 26 580	55,0	6,08	41,7	3,21	3,3	3,06
ATCC 90028	95,8	2,22	4,0	2,45	0,3	0,50
VVK 25 188	19,0	3,46	80,0	2,65	1,0	1,00
VVK 26 736	77,0	5,29	17,7	4,51	5,3	1,53
CA 26 677/00	33,7	1,53	62,0	0,00	4,3	1,53
CA 26 453/00	48,3	9,07	47,5	8,58	4,3	1,26

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Testovací médium NYP, velikost inokula 10⁶ cfu/ml

Tab. 4 Tvorba klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	26,8	6,18	73,3	6,18	0,0	0,00
RVVK 26 580	6,8	3,30	92,8	2,63	0,5	1,00
ATCC 90028	31,3	3,06	68,0	3,46	0,7	1,15
VVK 25 188	4,7	3,51	94,0	1,73	1,3	2,31
VVK 26 736	15,7	0,58	80,3	1,15	4,0	1,00
CA 26 677/00	15,8	6,29	78,3	6,60	5,5	1,73
CA 26 453/00	20,3	1,53	79,3	2,08	0,3	0,58

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 5 Vliv methanolu* na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	20,5	6,36	77,5	6,36	2,0	0,00
RVVK 26 580	6,3	2,08	93,7	2,08	0,0	0,00
ATCC 90028	34,0	2,83	64,5	4,95	1,5	2,12
VVK 25 188	8,0	2,65	88,0	4,36	4,0	3,00
VVK 26 736	24,3	6,43	72,7	4,73	3,0	2,65
CA 26 677/00	16,0	6,08	79,3	4,73	4,7	1,53
CA 26 453/00	25,5	6,36	72,5	4,95	2,0	1,41

* 0,0172% (v/v)

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 6a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	31,8	9,73	65,2	8,35	3,0	1,58
RVVK 26 580	45,0	4,08	44,3	9,64	5,3	0,96
ATCC 90028	82,6	5,94	12,6	2,61	4,6	3,91
VVK 25 188	44,5	17,41	32,5	10,75	8,0	3,92
VVK 26 736	70,3	8,14	14,0	2,00	15,7	6,35
CA 26 677/00	29,8	6,02	67,5	6,24	2,5	1,29
CA 26 453/00	57,5	3,87	39,3	4,92	3,3	1,71

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 6b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	32,0	4,00	67,0	4,00	0,7	0,58
RVVK 26 580	28,8	7,14	68,8	5,91	3,0	1,83
ATCC 90028	78,0	8,72	16,7	8,33	5,3	1,15
VVK 25 188	42,0	8,54	53,0	7,81	4,3	4,03
VVK 26 736	73,7	0,58	13,0	4,00	13,3	3,51
CA 26 677/00	15,8	5,68	79,5	6,14	4,75	2,75
CA 26 453/00	37,5	3,11	56,8	2,87	5,8	2,22

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 6c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 8797	17,0	5,66	81,8	5,81	1,2	1,30
RVVK 26 580	20,3	4,19	79,3	4,11	0,5	1,00
ATCC 90028	60,0	5,29	37,0	5,20	1,0	1,00
VVK 25 188	27,7	2,08	68,0	3,00	3,5	1,91
VVK 26 736	58,3	4,51	20,3	3,06	16,3	4,16
CA 26 677/00	8,3	3,59	90,8	4,79	1,0	1,41
CA 26 453/00	24,8	3,86	72,5	4,20	2,8	1,71

% K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Testování vlivu velikosti inokula v NYPu, velikost inokula 10^5 cfu/ml

Tab. 7 Tvorba klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	3,3	2,08	96,7	2,08	0,0	0,00
ATCC 90028	23,3	5,13	76,3	5,03	0,3	0,58
VVK 26 736	7,7	0,58	88,7	1,53	3,7	2,08

% K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 8a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	45,7	8,08	46,3	9,87	7,7	2,08
ATCC 90028	85,5	4,95	3,0	4,24	11,5	0,71
VVK 26 736	62,3	6,65	9,0	5,60	27,3	6,08

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 8b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	21,5	2,38	72,3	4,35	6,3	2,22
ATCC 90028	76,0	6,08	15,0	6,93	9,0	1,00
VVK 26 736	49,3	4,04	17,3	3,79	33,3	2,08

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Tab. 8c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	8,7	4,04	88,7	4,16	2,7	0,58
ATCC 90028	36,3	7,57	55,7	6,81	8,0	1,00
VVK 26 736	32,3	2,22	49,0	6,06	18,8	7,63

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Testování vlivu velikosti inokula v NYP, velikost inokula 10^7 cfu/ml

Tab. 9 Tvorba klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	91,3	2,08	8,7	2,08	0,0	0,00
ATCC 90028	91,3	1,53	8,7	1,53	0,0	0,00
VVK 26 736	96,7	1,15	3,0	1,00	0,3	0,58

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudoohyfy

Tab. 10a Vliv farnesolu o koncentraci 300 μ mol/l na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	95,8	3,10	3,8	2,87	0,5	0,58
ATCC 90028	98,0	1,00	0,3	0,58	1,7	0,58
VVK 26 736	98,7	0,58	0,3	0,58	1,0	1,00

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudoohyfy

Tab. 10b Vliv farnesolu o koncentraci 30 μ mol/l na tvorbu klíčních hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	95,3	1,71	3,5	2,65	1,3	1,50
ATCC 90028	97,0	2,00	2,0	1,00	1,0	1,00
VVK 26 736	98,7	0,58	0,7	0,58	0,7	0,58

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíční hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudoohyfy

Tab. 10c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčících hyf u kmenů *Candida albicans*

KMEN	% K	SO	% H	SO	% PH	SO
RVVK 26 580	90,8	1,26	9,0	1,41	0,3	0,50
ATCC 90028	92,7	2,52	7,0	2,00	0,3	0,58
VVK 26 736	97,7	2,08	1,3	1,15	1,0	1,00

%K = procentuální podíl kvasinkovitých forem

SO = směrodatná odchylka

%H = procentuální podíl buněk tvořících klíčící hyfy

%PH = procentuální podíl buněk tvořících pseudohyfy

Standardní podmínky indukce klíčních hyf

Výsledky pokusů bez farnesolu se standardním inokulem ukázaly značné rozdíly mezi kmeny ve schopnosti tvořit klíčící hyfy (Tab. 1 a 4). Nejvyšší podíl klíčících hyf byl zjištěn u kmenů CA RVVK 26 580 a CA VVK 25 188, naproti tomu kmen CA ATCC 90028 tvoří hyfy méně.

Samotný methanol neměl signifikantní vliv na tvorbu klíčících hyf testovaných kmenů *C. albicans* v koncentracích potřebných k rozpuštění a naředění farnesolu (0,0172%) (Tab. 1, 2, 4 a 5).

Vliv farnesolu na tvorbu hyf

Přítomnost farnesolu v testovacím médiu ve všech testovaných koncentracích alespoň částečně inhibovala tvorbu klíčících hyf u testovaných kvasinek. Závislost byla přímo úměrná koncentraci farnesolu v médiu, tj. jeho vliv byl menší při použití nižší koncentrace farnesolu a naopak vyšší u vyšších koncentrací farnesolu (viz Tab. 3a-c a 6a-c).

Vliv média

Výsledky ukázaly, že NYP jako médium má vyšší potenciál pro indukci tvorby klíčících hyf u *C. albicans*, tj. poskytuje kvasinkám lepší podmínky pro tvorbu klíčících hyf. Vliv farnesolu na tyto kvasinky byl v NYPu daleko méně patrný než v séru. (viz Tab.3a-c a 6a-c).

Vliv velikosti inokula

Velikost inokula měla značný vliv na počet vytvořených hyf. Při velikosti inokula 10^5 cfu/ml kvasinky tvořily klíčící hyfy v nepatrně větším procentu než stejné kmeny při použití inokula o velikosti 10^6 cfu/ml (viz Tab. 4 a 7). Výsledky pokusů s inokulem o velikosti 10^7 cfu/ml však ukazují výrazné snížení počtu vytvořených klíčících hyf v porovnání s inokulem 10^6 cfu/ml (viz Tab. 9).

5 DISKUZE

Cílem práce bylo prokázat vliv farnesolu na tvorbu klíčních hyf u sedmi kmenů *C. albicans*.

Z výsledků pokusů vyplývá, že tvorba klíčních hyf je ovlivněna jak koncentrací farnesolu, tak velikostí inokula. Při pokusech prováděných s velikostí inokula 10^6 cfu/ml, byl vliv farnesolu jasně patrný zejména při nejvyšší koncentraci farnesolu, tedy 300 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 3a a 6a), a při srovnání výsledků pokusů prováděných v různých médiích je vidět, že vliv farnesolu byl daleko výraznější v prekolostrálním telecím séru než v NYPu (Tab. 3a-c a 6a-c). Tento jev je patrný již u kontrolních pokusů, z jejichž výsledků lze vyčíst, že v NYPu tvořily všechny kmeny *C. albicans* více klíčních hyf než v séru (Tab. 1 a 4).

NYP jako speciální médium s velmi nízkým obsahem živin poskytuje kvasinkám lepší podmínky k tvorbě klíčních hyf, a proto je pravděpodobně farnesol v tomto médiu méně účinný. Jiným možným vysvětlením je, že sérum obsahuje inhibiční faktor, který (za možného přispění farnesolu) interferuje se schopností séra indukovat tvorbu klíčních hyf.

Kvasinka *C. albicans* produkuje farnesol kontinuálně v určitém množství, které je pro každý kmen pravděpodobně specifické a závisí přímou úměrou na buněčné mase (Hornby et al., 2001). Při velikosti inokula větší než 10^6 cfu/ml dochází k produkci farnesolu buňkami *C. albicans* již v takovém měřítku, že se projeví jeho efekt. Proto bylo při pokusech s inokulem o velikosti 10^7 cfu/ml zjištěno daleko nižší procento klíčních hyf než při pokusech s inokulem menším (Tab. 9). Při těchto pokusech byl tedy sledován vliv jak externě přidaného, tak kvasinkami během pokusu vytvořeného farnesolu (Tab. 10a-c).

Naopak během pokusů s inokulem o velikosti 10^5 cfu/ml byl sledován jednoznačně vliv pouze externě dodaného farnesolu, protože při této hustotě inokula je málo pravděpodobné, že by buňky tvořily farnesol v takovém množství, které by mohlo ovlivnit jejich morfologii. Při těchto pokusech kvasinky tvořily klíční hyfy ve větším množství než buňky při pokusech s inokulem 10^6 cfu/ml (Tab 4-6c a 7-8c), z toho můžeme usuzovat, že i při této

velikosti inokula (tedy 10^6 cfu/ml) kvasinky určité nezanedbatelné množství farnesolu produkují. Rozdíly ve výsledcích však nejsou tak významné.

Zajímavým jevem byla také rozdílná schopnost jednotlivých kmenů *C. albicans* tvořit klíční hyfy a také různá citlivost použitých kmenů k farnesolu. Nejvíce klíční hyfy tvořily kmeny CA VVK 25 188 a CA RVVK 26 580 (Tab. 1 a 4), z toho můžeme usuzovat na jejich větší schopnost invadovat tkáň pacienta. Naopak kmen CA ATCC 90028 tvořil v porovnání s ostatními kmeny klíční hyfy daleko méně (Tab. 1 a 4).

Co se týká citlivosti k farnesolu, mezi nejcitlivější lze zařadit kmeny CA ATCC 90028 a CA VVK 26 736. U těchto kmenů byla i při pokusech s nejnižší koncentrací farnesolu patrná výrazná inhibice tvorby klíčnicích hyf. Ke kmenům méně citlivým patří CA RVVK 8797 a 26 580, CA VVK 25 118 a kmen 26 677/00 (vztaženo na výsledky pokusů v NYPu) U těchto kmenů neměl farnesol při našich pokusech výraznější vliv ani v nejvyšší použité koncentraci (Tab. 6a-c).

Zajímavým problémem, který se nabízí, je případný vliv kombinace farnesolu s antibiotiky používanými k terapii kandidóz. Zdá se, že látky blokující syntézu sterolů by mohly mít stimulační vliv na tvorbu farnesolu kvasinkami (Nickerson K. et al., 2006).

Jelikož by farnesol svým inhibičním působením na tvorbu hyf mohl inhibovat také tvorbu biofilmu, mohl by mít význam i v prevenci systémových kandidóz u katetrizovaných pacientů (Nickerson K. et al, 2006). Tyto hypotézy jsou předmětem výzkumů.

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na ověření účinnosti farnesolu na inhibici tvorby klíčnicích hyf u sedmi kmenů *C. albicans*. Naše pokusy prokázaly vliv farnesolu na morfologii kvasinek, který byl kmenově specifický a výraznější v séru v porovnání s indukčním médiem NYP a mohl by mít význam pro budoucí využití farnesolu v antimykotické terapii.

Farnesol působil inhibičně na tvorbu hyf ve všech použitých koncentracích (3, 30 a 300 $\mu\text{mol/l}$), v nízkých koncentracích byl však jeho účinek méně patrný než v koncentracích vyšších a byl kmenově variabilní. Nejvýrazněji reagovaly na farnesol kmeny CA ATCC 90028 a CA VVK 26 736, méně citlivé se ukázaly kmeny CA RVVK 8797 a 26 580, CA VVK 25 118 a kmen CA 26 677/00.

Další studie se zaměřují mimo jiné na zjištění účinku farnesolu na lidské buňky a možné ovlivnění účinku farnesolu po aplikaci do živého organismu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996, s. 344–364.
- Brown, A. J. P.: Expression of Growth Form-Specific Factors during Morphogenesis in *Candida albicans*. In *Candida and Candidiasis*. Calderone R. A.. Washington, D.C.: ASM Press, 2002, s.87–89.
- Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J. et al.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998, s. 143–157.
- Buchta, V., Špaček, J., Jílek, P.: Mykotické infekce ženského genitálu II. Diagnóza. *Gynekolog*, 1997; **4**: 173-175.
- Buchta, V., Špaček, J., Jílek, P.: Mykotické infekce ženského genitálu III. Terapie. *Gynekolog*, 1998; **7**: 73-82.
- Calderone, R. A.: Taxonomy and Biology of *Candida*. In *Candida and Candidiasis*. Calderone R. A.. Washington, D.C.: ASM Press, 2002, s.15–23.
- Calderone, R. A., Gow, N. A. R.: Host Recognition by *Candida* Species. In *Candida and Candidiasis*. Calderone R. A.. Washington, D.C.: ASM Press, 2002, s.67–82.
- Doležal, M., Buchta, V.: Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékárenství*, 2006; **1**:25-29.
- Frágner, P.: *Mykologie pro lékaře*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1967, s. 17 a 266-286.
- Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F. et al.: *Lékařská mikrobiologie, přehled infekčních onemocnění: patogenita, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999, s. 563–570.
- Gow, N. A. R.: Cell Biology and Cell Cycle of *Candida albicans*. In *Candida and Candidiasis*. Calderone R. A.. Washington, D.C.: ASM Press, 2002, s.145–155.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D. et al.:Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 2001; **67**: 2982-2992.

- Janderová, B., Bendová, O.: *Úvod do biologie kvasinek*. Praha: Karolinum, 1999, s.7–27.
- Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007, s.506-514.
- Marichal, P., Gorrens, J., Van Cutsem, J., Vanden Bossche, H.: Culture media for the study of the effects of azole derivatives on germ tube formation and hyphal growth of *C. albicans*. *Mycosen*, 1986; **29**:76-81.
- Mašata, J., Jedličková, A., Řezáčová, J., Martan, A., Halaška, M.: *Infekce v gynekologii a porodnictví a základy jejich antiinfekční léčby*. Praha: Maxdorf, 2004, s.20–56 a 319–324.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., Hornby, J. M.: Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006; **72**:3805-3813.
- Saidi, S., Luitaud, C., Rouabhia, M.: In vitro synergistic effect of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast*, 2006; **23**: 673-687.
- Sato, T., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T.: Farnesol, a Morphogenetic Autoregulatory Substance in the Dimorphic Fungus *Candida albicans*, Inhibits Hyphae Growth through Suppression of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biol.Pharm.Bull*, 2004; **27**:751-752.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J.: The distinct morphogenetic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 2004.
- Špaček, J., Buchta, V., Jílek, P.: Mykotické infekce ženského genitálu I. *Epidemiologie a mikrobiologie. Gynekolog*, 1997, **2**:67-70.
- Špaček, J., Buchta, V., Jílek, P.: Rekurentní vulvovaginální kandidóza. *Gynekolog*, 2000; **6**:274-280.
- Whiteway, M., Oberholzer, U.: *Candida* Morphogenesis and host-patogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 2004; **7**:350-357.
- Woods, J. P.: Dimorphism in Human Pathogens. In *Fungal Pathogenesis, Principles and Clinical Applications*. Calderone R. A., Cihlar R. L.. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002, s.99–106.

Zhang, L., Dong, Y.: Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology*, 2004; **53**:1563-1571.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1: Kvasinky	16
Obr. 2: Pseudohyfy	16
Obr. 3: Hyfa.....	17
Obr. 4: Strukturní vzorec farnesolu	27
Obr. 5: Schéma syntézy farnesolu	28
Tab. 1 Tvorba klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	34
Tab. 2 Vliv methanolu* na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i> .	35
Tab. 3a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	35
Tab. 3b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	36
Tab. 3c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	36
Tab. 4 Tvorba klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	37
Tab. 5 Vliv methanolu * na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i> ..	37
Tab. 6a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	38
Tab. 6b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i> (CA).....	38
Tab. 6c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	39
Tab. 7 Tvorba klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	39
Tab. 8a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	40
Tab. 8b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	40
Tab. 8c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	40
Tab. 9 Tvorba klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	41

Tab. 10a Vliv farnesolu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	41
Tab. 10b Vliv farnesolu o koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	41
Tab. 10c Vliv farnesolu o koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$ na tvorbu klíčních hyf u kmenů <i>Candida albicans</i>	42