

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



Richard Fluxa

**Potenciál slepičích protilátek v kontextu kvasinkových onemocnění**

The potential of chicken antibodies in the context of yeast diseases

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za čas, který mi věnoval při teoretickém a experimentálním vypracování této práce, za jeho nápomocnost a trpělivost. Dále chci moc poděkovat paní RNDr. Veronice Hýskové, PhD. za její rady k práci s naměřenými daty a panu Mgr. Pavlu Cahynovi, Ph.D. za jeho pomoc při řešení úkolů v oblasti informatiky.

## **Abstrakt**

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na popis patogenního mikroorganismu *Candida albicans*, jeho virulentních faktorů a problematiku kvasinkových onemocnění z pohledu imunochemie. Představuje slepičí specifické protilátky izotypu IgY jako možný nástroj k léčbě kvasinkových infekcí a k jejich profylaxi.

Tato práce byla uskutečněna v návaznosti na stejnojmennou bakalářskou práci Bc. Matúše Vodeckého s tím rozdílem, že imunizace slepice A suspenzí buněčných stěn kvasinky *Candida albicans* a slepice B suspenzí celých buněk *Candida albicans* nezahrnovala přidavek mykobakterií (neúplné Freundovo adjuvans) za účelem možného vyššího zisku specifických protilátek.

Pro detekci slepičích specifických protilátek byly využity především metody ELISA a CELISA, dále pak metody založené na filtraci a centrifugaci. Bakalářská práce má z velké části charakter rešerše.

**Klíčová slova:** *Candida albicans*, profylaxe, protilátky IgY, ELISA

## **Abstract**

The presented bachelor's thesis focuses on the description of the pathogenic microorganism *Candida albicans*, its virulence factors, the issue of yeast infections from an immunochemical perspective, and introduces chicken-specific antibodies of the IgY isotype as a potential tool for the treatment and prophylaxis of yeast infections.

This study was conducted as a follow-up to the bachelor's thesis of Bc. Matúš Vodecký with the difference that the immunization of hen A with a suspension of *Candida albicans* cell walls and hen B with a suspension of whole *Candida albicans* cells did not include the addition of mycobacteria (incomplete Freund's adjuvant) to potentially increase the yield of specific antibodies.

The methods primarily used for the detection of chicken-specific antibodies were ELISA and CELISA, along with filtration – and centrifugation-based techniques. The bachelor's thesis is largely of a review nature.

Keywords: *Candida albicans*, prophylaxis, IgY antibodies, ELISA

## Obsah

Použité zkratky .....	8
1. Úvod do problematiky kvasinkových onemocnění .....	13
1.1 Kvasinka <i>Candida albicans</i> .....	14
1.2. Faktory virulence kvasinky <i>Candida albicans</i> .....	15
1.3 Kandidózy .....	28
1.4 Chemoterapie kandidóz .....	29
1.5 Aktivní a pasivní imunizace .....	33
1.5.1 Aktivní imunizace proti kvasince <i>Candida albicans</i> a její omezení.....	34
1.5.2 Pasivní imunizace proti kvasince <i>Candida albicans</i> jako možnost účinné imunoterapie pomocí slepičích specifických protilátek IgY.....	35
1.5.3 Strukturní a biochemické charakteristiky IgY .....	37
1.5.4 Další možnosti aplikace slepičích IgY .....	38
1.5.5 Monoklonální a polyklonální protilátky .....	39
1.5.6 Imunochemické stanovení specifických protilátek pomocí ELISA.....	40
2. Cíle práce.....	43
3. Materiály a metody.....	44
3.1 Použitý materiál .....	44
3.2 Přístroje.....	45
3.3 Metody.....	47
3.3.1 Příprava VSF média .....	47
3.3.2 Kultivace kvasinek.....	47
3.3.3 Imunizace slepice buněčnou stěnou a celými buňkami kvasinky <i>Candida albicans</i> .....	48
3.3.4 Izolace polyklonálních protilátek ze slepičích vajec.....	49
3.3.5 Fotometrické měření hmotnostní koncentrace izolovaných polyklonálních protilátek .....	51
3.3.6 ELISA .....	51
3.3.7 CELISA.....	52
3.3.8 Další techniky imunochemická detekce specifických protilátek .....	53

4. Výsledky.....	58
4.1 Izolace a charakterizace protilátek .....	58
4.2 Imunoreaktivita protilátek .....	58
4.2.1 ELISA .....	58
4.2.2 CELISA.....	60
4.2.3 Centrifugační postup .....	62
4.2.4 Filtrační protokol .....	62
5. Diskuze.....	64
6. Souhrn .....	69

## **Použité zkratky**

- $A_{280\text{ nm}}$  ... absorbance při vlnové délce 280 nm
- ABC ... skupina transmembránových přenašečů (z angl. „ATP-binding cassette“)
- ACHI* ... gen pro acetyl-CoA-hydrolasu
- AIDS ... syndrom získané imunodeficiency (z angl. „Acquired Immunodeficiency Syndrome“)
- Als ... sekvence podobná aglutininu (z angl. „Agglutinin-like sequence“)
- ALS* ... označení genů pro adhezivní proteiny
- AMB ... amphotericin B
- APC ... antigen prezentující buňky
- ATO5* ... gen pro transportní protein *ato5p*
- ATP ... adenosintrifosfát
- C.* ... *Candida*
- °C ... stupeň Celsia
- cAMP ... cyklický adenosinmonofosfát
- Cek1 ... signalizační dráha Cek1 (z angl. „Extracellular signal-regulated kinase 1“)
- CELISA ... ELISA s celými buňkami (z angl. „cell-based enzyme-linked immunosorbent Assay“)
- CDR ... hypervariabilní doména imunoglobulinů (z angl. „Complementary Determining Region“)
- CDR1 ... název ABC transportéru (z angl. „Pleiotropic ABC efflux transporter of multiple drugs CDR 1“)
- CDR2 ... název ABC transportéru (z angl. „Multidrug resistance protein CDR2“)
- CFU ... buněčné jednotky tvořící kolonie (z angl. „colony forming units“)
- $c_g$  ... hmotnostní koncentrace



CL ...	candidalysin
CoA ...	koenzym A
DNA ...	deoxyribonukleová kyselina
<i>DURI,2</i> ...	gen pro multifunkční enzym urea-karboxylasu
<i>E.</i> ...	<i>Escherichia</i>
Ecel ...	proteinový prekursor candidalysinu (z angl. „Extent of cell elongation protein 1“)
<i>ECE1</i> ...	gen pro protein ecel
ECM ...	extracelulární matrix
<i>EED1</i> ...	gen pro eed1
Eed1 ...	transkripční faktor (z angl. „Transcriptional regulator DEF1“)
Efg1 ...	transkripční faktor (z angl. „Enhanced filamentous growth protein 1“)
EGFR ...	receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. „Epidermal growth factor receptor“)
EIA ...	označení skupiny analytických metod využívajících imunodetekce pomocí molekul značených enzymem (z angl. „Enzyme Immunoassay“)
ELISA...	analytická imunodetekční metoda (z angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
<i>ERG3</i> ...	gen pro C-5-steroldesaturasu
<i>ERG6</i> ...	gen pro sterol C-24-methyltransferasu
<i>ERG11</i> ...	gen pro 14- $\alpha$ -lanosteroldemethylasu
EPS ...	extracelulární polymerní substance
Fab ...	fragment vázající antigen (z angl. „antigen-binding fragment“)
F(ab) <sub>2</sub> ...	fragment imunoglobulinu tvořený dvěma Fab fragmenty
Fc ...	část imunoglobulinu bez Fab fragmentu (z angl. „fragment crystallizable“)
5-FC ...	5-fluorocytosin

Fv ...	část Fab fragmentu (z angl. „single-chain variable fragment“)
G-CSF ...	cytokin stimulující kolonie granulocytů (z angl. „granulocyte colony-stimulating factor“)
GIT ...	gastrointestinální trakt
g/l ...	gram na litr
GM-CSF ...	cytokin stimulující kolonie makrofágů a granulocytů (z angl. „Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“)
GPI ...	glykosylfosfatidylinositol
GUT ...	kvasinková forma <i>C. albicans</i> (z angl. „Gastrointestinally induced transition“)
h ...	hodina
H ...	těžký řetězec imunoglobulinu
HAMA ...	lidské protilátky proti myším protilátkám (z angl. „Human anti-mouse antibody“)
HOG ...	signální dráha (z angl. „High osmolarity glycerol pathway“)
Hwp1 ...	název proteinu buněčné stěny <i>C. albicans</i> (z angl. „Hyphal wall protein 1“)
Ig ...	imunoglobulin
IL ...	interleukin
kDa ...	kilodalton
Kex1 ...	proteasa (z angl. „Pheromone-processing carboxypeptidase KEX1“)
Kex2 ...	proteasa, kexin 2
L ...	lehký řetězec imunoglobulinu
<i>L</i> ...	<i>Listeria</i>
<i>M</i> ...	molekulová hmotnost
MAPK ...	proteinkináza aktivovaná mitogenem (z angl. „Mitogen activated protein kinase“)

MDR1 ... název transmembránového transportéru (z angl. „Multidrug resistance protein 1“)

*MEP1* ... gen pro transportér amoniaku mep1p

mep1p... transportér (permeasa) amoniaku 1

*MEP2* ... gen pro transportér amoniaku mep2p

mep2p ... transportér (permeasa) amoniaku 2

MFS ... skupina transmembránových přenašečů (z angl. „major facilitator superfamily“)

mM ... milimolární koncentrace

μM ... mikromolární koncentrace

NF-κB ... transkripční faktor (z angl. „nuclear factor kappa B“)

nm ... nanometr

pacC ... pH-senzitivní transkripční faktor

PBS ... fosfátový pufr (z angl. „phosphate buffered saline“)

pFc' ... imunoglobulinový fragment IgG po štěpení pepsinem

*PHR1* ... gen pro protein phr1p (z angl. „pH-responsive protein 1“)

*PHR2* ... gen pro protein phr2p (z angl. „pH-responsive protein 2“)

Phr1p ... protein regulovaný pH (z angl. „pH-responsive protein 1“)

Pir ... manoprotein buněčné stěny *C. albicans* (z angl. „Protein with internal repeats 1“)

Ras1p ... nitrobuněčný protein s názvem Ras1p

Rim101p ...transkripční faktor (z angl. „pH-response transcription factor pacC/RIM101“)

RNA ... ribonukleová kyselina

RPM ... otáčky za minutu (z angl. „revolutions per minute“)

*SAP* ... geny pro secernované aspartátové proteasy (z angl. „Secreted aspartyl proteases“)

Sap ... secernovaná aspartátová proteasa

Saps ... secernované aspartátové proteasy

Stp2 ... transkripční faktor (z angl. „Transcriptional regulator STP2“)

Ume6 ... transkripční faktor (z angl. „Transcriptional regulatory protein UME6“)

Upc2 ... transkripční faktor (z angl. „Sterol uptake control protein 2“)

*UPC2* ... gen pro transkripční faktor Upc2

UV ... ultrafialové (záření)

VH ... variabilní N-koncová doména těžkého řetězce imunoglobulinu

VL ... variabilní N-koncová doména lehkého řetězce imunoglobulinu

VSF... médium simulující prostředí ženského reprodukčního traktu  
(z angl. „vaginal simulant fluid“)

VVC ... vulvovaginální kandidóza

% (v/v) ... objemová procenta

% (w/v) ... hmotnostní procenta

Wor1 ... regulátor přeměny z bílého buněčného typu na neprůhledný buněčný typ  
(z angl. „White-opaque regulator 1“)

*WOR1* ... gen pro Wor1

YPD ... médium pro kvasinky bohaté na živiny (z angl. „yeast extract peptone dextrose“)

## 1. Úvod do problematiky kvasinkových onemocnění

Odhaduje se, že říše hub domény eukaryota zahrnuje od 1,5 do zhruba 5 milionů druhů<sup>1,2</sup>. Pouze několik stovek z nich může způsobit klinická onemocnění člověka<sup>3</sup>. Kmenu Ascomycota náleží některé z neúspěšnějších lidských patogenů, které mohou hostitele infikovat bez toho, aniž by byl výrazně imunokompromitován, jako jsou například *Histoplasma*, *Blastomyces*, ale též do tohoto kmenu patří oportunní houby, které mohou způsobit onemocnění primárně u imunokompromitovaných pacientů jako rod *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* a *Candida*<sup>2</sup>.

Rod *Candida* je nejčastějším původcem houbových infekcí (kandidóz). Okolo 90 % houbových infekcí bývá způsobeno pěti druhy kvasinek, a to *Candida albicans* (65,3 % ze všech druhů *Candida*), dále *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei*<sup>4</sup>. Tato houbová infekční onemocnění patří mezi významná zdravotní omezení, protože postihují miliony lidí na celém světě a jsou spojena s vysokou mortalitou. Skupina infekcí způsobená kvasinkou *Candida albicans* sahá od méně závažných povrchových lokálních kandidóz přes několik typů orgánově specifických infekcí až k systémovým život ohrožujícím stavům<sup>5</sup>.

Kandidy pronikají do oběhu prorůstáním pseudomycelia do cév. Systémová postižení jsou převážně komplikacemi stavů se sníženou imunitou, AIDS, neutropenií a krevními tumory<sup>6</sup>. Závažnost kvasinkových onemocnění se odvíjí od imunokompetence pacienta, proto jsou těmito infekcemi ohroženi například pacienti se získaným syndromem lidské imunodeficiency, onkologičtí pacienti či astmatici, u kterých hrozí těžší průběhy houbových infekcí<sup>5</sup>.

Úporné vulvovaginální kandidózy (též zvané vulvovaginitidy) se vyskytují i u imunokompetentních žen a po přemnožení kvasinky *Candida albicans* v ženské vagině jsou doprovázeny nepříjemným svěděním a pálením a mohou se vyskytnout jako důsledek užívání kontraceptiv obsahujících estrogeny či nadužívání antibiotik<sup>7</sup>. Ačkoliv se nejedná o letální zánět, vyplývá z vysokých počtů případů tohoto typu patologie a s ním spojeného snížení kvality života dotyčných pacientů značná potřeba porozumění patologickým mechanismům vzniku těchto infekcí pro nalezení účinného léčiva. V současnosti se k léčbě kandidóz využívají nedostatečně působící antimykotika.

Dalším úskalím kvasinkových infekcí bývá i nedostatečně efektivní diagnostika a poměrně častý návrat infekce po úspěšném, ale pouze dočasném залéčení asi u deseti procent z celkového počtu pacientů postižených vulvovaginální kandidózou<sup>8</sup>. K léčbě chronických a akutních mykóz se využívají antifungální léčiva, tento přístup je ovšem stále omezen jejich toxicitou.

Patogenním agens je u kandidóz eukaryotní mikroorganismus, a tudíž je při vývoji antifungálních léčiv omezen počet cílových struktur, na které léčivo smí mířit, aby nepoškodilo hostitele patogenu. Antimykotika vykazují jistou nedostatečnost i z důvodu vzniku rezistencí patogenních kvasinek především ve zdravotnických centrech. Velmi zneklidňující jsou pak multirezistentní houbové kmeny, které způsobují, že pacient neodpovídá na rozličné třídy antifungálních farmak. Pro druhy rodu *Candida* jsou multirezistence typické<sup>9,10</sup>. Selhání léků může být také následkem vzniku antagonismu mezi medikací proti jinému primárně vzniklému onemocnění pacientů s kandidózou, u kterých se kvasinková onemocnění objevila až sekundárně<sup>11</sup>. Vedle farmakoterapie se vzhledem k jejím omezením jako terapeutický nástroj hodí využít například slepičí specifické protilátky namířené proti tomuto patogenu<sup>12</sup>.

### 1.1 Kvasinka *Candida albicans*

Kvasinka *Candida albicans* (*C. albicans*) je oportunně patogenní vnitrobuněčný parazit, který je součástí lidské komenzální mikrobioty u většiny celosvětové populace. Za jistých podmínek je *C. albicans* původcem lokálních epiteliálních infekcí vedoucích k rozvoji orálních, vaginálních nebo gastrointestinálních kandidóz, nebo až život ohrožujících masivních infekcí a vaskulárních systémových kandidóz<sup>7</sup>.

*C. albicans* způsobuje též onemocnění kůže, které není zvláště nebezpečné, ale bývá torpidní. Dalším projevem endogenních kandidóz jsou například bílé povlaky na jazyku či na sliznici dutiny ústní, které se zvládají lokální terapií například potřením krystalovou violetí. Vážnější infekce vznikají při antibakteriální léčbě, kdy kandidy nahradí potlačenou bakteriální flóru. Stejně jako například *C. tropicalis*, *C. krusei* nebo *C. dublinensis* tvoří *C. albicans* oválné blastosporu o velikosti 4 až 6 mikrometrů typického kvasinkovitého vzhledu s pučícími novými buňkami.

Pokud se vypučená buňka neoddělí, protahuje se do délky a vzniká pseudomycelium či pseudohyfa, která může být dlouhá několik desítek mikrometrů. V paždí pseudomycelia vyrůstají nové blastospor. Pseudomycelium se tvoří ve tkáni a v bílkovinném prostředí, na čemž je založen spolehlivý diagnostický test, kdy se v séru vytváří výrůstky pseudohyf do několika desítek minut. V tekuté půdě a na agarovém médiu s dostatkem sacharidů, glukosy nebo maltosy (například na Sabouraudově agaru) vyrůstají převážně kvasinkovité blastospor, které jsou grampozitivní. Na Sabouraudově agaru vykazují blastospor *C. albicans* typickou ovocnou vůni, kterou vydávají mladé smetanově bílé kolonie vyrostlé při laboratorní teplotě. U starých kolonií převažuje slabý pach sýra<sup>6</sup>.

## 1.2. Faktory virulence kvasinky *Candida albicans*

*C. albicans* se vyznačuje velkou přizpůsobivostí, jejíž zásadní součástí představuje schopnost přežít v několika anatomicky odlišných místech hostitele, kde každé z nich přispívá různou měrou ke specifickému a pro růst mikroorganismů nepříznivému tlaku prostředí. Především její schopnost měnit okolní pH a adaptovat se na pH okolí má za důsledek, že onemocnění, které *C. albicans* může způsobit, převyšuje ta, která mohou být způsobena jinými oportunně patogenními organismy. *Escherichia coli* též jako *C. albicans* kolonizuje střevní epitel, je však v porovnání s *C. albicans* pouze přechodně k nalezení v ústní dutině a téměř nikdy ve vaginálním kanálu.

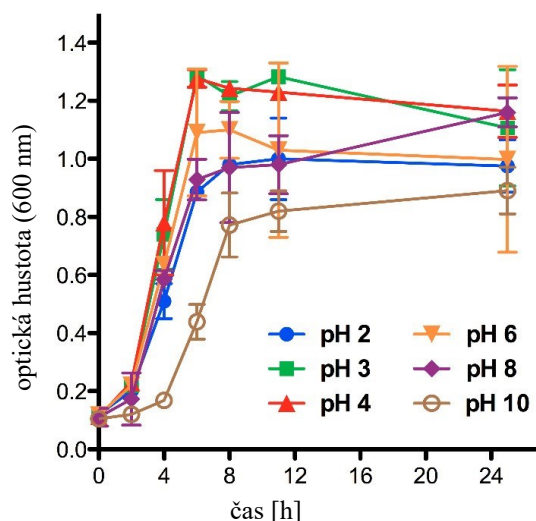
Jedním z příkladů, jak se *C. albicans* adaptuje na fyziologické extrémy hostitele je skutečnost, že při neutrálním pH krevního řečiště nebo tkáni dochází pod vlivem transkripčního faktoru Rim101p u *C. albicans* k expresi genu *PHR1*. Funkce *PHR1* je mimo jiné spjata s biosyntézou buněčné stěny, zatímco ve vaginálním kanálu je exprese *PHR1* vypnuta a je zapnut druhý pH regulovatelný gen jménem *PHR2*, který *C. albicans* poskytuje obdobné funkce<sup>13</sup>.

Geny *PHR1* a *PHR2* kódují mimo jiné enzymy phr1p a phr2p glykosidasy (lyasy) reaktivovatelné světlem, které zajišťují opravy DNA po její destrukci účinky UV záření. Mutantní kmeny *C. albicans* bez *PHR2* nejsou schopny růst v kyselém prostředí, ovšem v neutrálním prostředí jsou plně virulentní<sup>14</sup>.

*C. albicans* je dále například schopna aktivně neutralizovat jak kyselé, tak i zásadité pH svého okolí. V kyselých podmínkách dokáže během méně než 12 hodin zvýšit hodnotu pH jejího okolí z hodnoty 4 na 7, což vede k autoindukci přechodu na prodlouženou pseudohyfální formu. Ta je kritickým virulentním faktorem a je zodpovědná za invazivní pronikání tkáněmi. Aktivní alkalizace okolí *C. albicans* je spojena s nedostatkem uhlíku v médiích chudých na glukosu.

Nedostatek glukosy je mimo jiné předpokládanou charakteristikou prostředí, která by měla převládat ve fagosomech fagocytů při likvidaci *C. albicans* jako vnitrobuněčného parazita. Spojitost mezi stupněm alkalizace okolí kvasinky a mírou katabolismu a vychytávání aminokyselin z prostředí jako zdroje uhlíku byla nalezena pomocí genetických experimentů. Například mutace transkripčního faktoru Stp2, který aktivuje expresi genů pro aminokyselinové permeasy, genu *ACH1* pro expresi acetyl-CoA-hydrolasy a genů *DURI,2* či *ATO5* pro expresi enzymů důležitých v metabolismu dusíkatých látek, vedou k zastavení nebo zpomalení neutralizace okolí.

Houby jsou obecně více acidofilní než běžné patogenní bakterie. Pro patogenní kvasinky je důležitou adaptací přizpůsobování se neutrálnímu či alkalickému pH<sup>14</sup>. *C. albicans* má schopnost růst v širokém rozmezí hodnot pH (viz Obr. 1).



Obrázek 1: Obecná schopnost *C. albicans* růst v širokém rozmezí pH hodnot. Převzato a upraveno<sup>14</sup>.

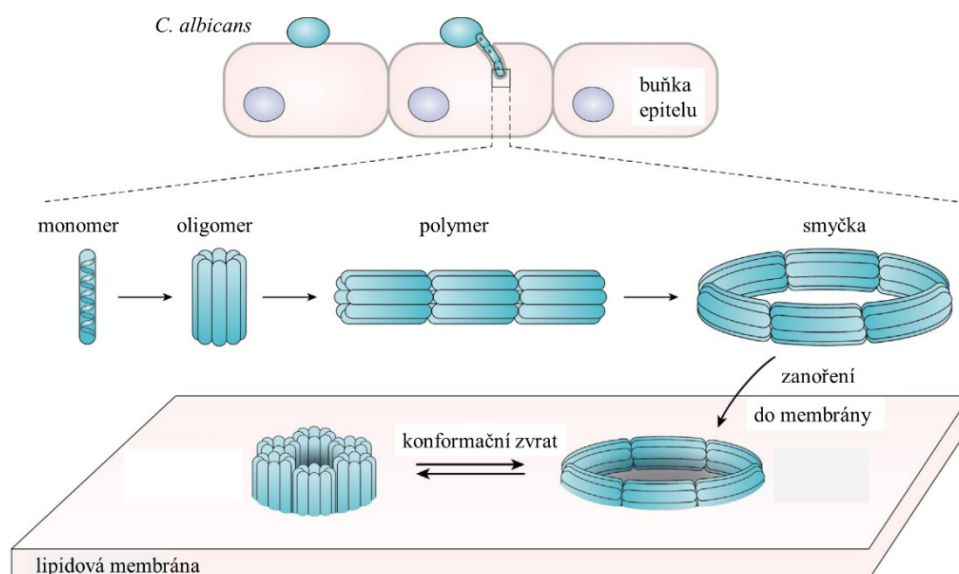


Dalším virulentním faktorem je cytolytický peptidický toxin hub candidalysin (CL). Vyskytuje v různých obměnách mezi rozličnými druhy a izoláty kvasinek rodu *Candida*. Fungální gen *ECE1* exprimovaný *C. albicans* je potřebný pro rozvoj její patogenity. *ECE1* kóduje polypeptid Ece1, jenž je působením proteáz Kex1 a Kex2 proteolyticky štěpen na lysin/argininových zbytcích na osm peptidů. Candidalysin sestávající ze 31 aminokyselin je zodpovědný za poškození epiteliálních buněk a aktivaci imunitního systému. Geneticky mutované kmeny bez exprese CL jsou sice schopny morfogenese, ale již nezpůsobují žádná slizniční onemocnění, což podtrhuje roli CL při kandidózní infekci<sup>15</sup>.

Komenzální forma *C. albicans* je schopna aktivovat pouze tzv. primární fázi MAPK odpovědi a NF- $\kappa$ B signalizaci, které přirozeně nestačí k sekreci cytokinů a rekrutování efektorových imunitních buněk do místa zánětu. Migrace efektorových buněk imunitního systému do místa zánětu může být pro hostitele v závislosti na orgánu, kde zánět probíhá, a imunitním stavu či jiném onemocnění pacienta buď výhodné, nebo naopak nežádoucí.

Navzdory tomu, že CL je zodpovědný za aktivaci důležité imunitní signalizace reagující na kandidózu, nebyly zatím nalezeny struktury buněčného povrchu, které by po vazbě na CL signalizaci spouštěly. Proto CL pravděpodobně aktivuje imunitní signalizaci sám o sobě, a to zejména jeho schopností perforovat plazmatickou membránu infikované buňky.

Před poškozením membrán se CL nejprve sám automaticky skládá do polymerních struktur, které zpočátku rostou, a nakonec se uzavírají do smyček, které se vážou na buněčné membrány, do kterých se vmezeřují, a vytváří v nich následně otvor (viz *Obr. 2*).



Obrázek 2: Samovolné skládání candidalysinu a následná reorganizace po zanoření do membrány zajišťující větší efektivitu perforace. Převzato a upraveno<sup>15</sup>.

Pro zahájení imunitní odpovědi proti patogenním hyfám, která zajistí aktivaci efektorových buněk vrozeného i adaptivního imunitního systému hostitele, je zapotřebí, aby byla aktivována tzv. sekundární fáze MAPK imunitní odpovědi. Imunitní signalizační dráha epitelálních buněk reagující na přítomnost CL je udržována na základě trvalé aktivity MAPK (mitogen-activated protein kinase) proteinkinasy.

MAPK signalizace během infekce vyvolané *C. albicans* prostřednictvím CL vede ke zvýšeným koncentracím transkripčního faktoru c-Fos, který zapříčiňuje expresi cytokinů jako je interleukin IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF a GM-CSF (tzv. sekundární fáze MAPK imunitní odpovědi proti patogenním hyfám *C. albicans*, které jsou schopny CL secernovat). V této sekundární fázi (též označované jako tzv. damage response) MAPK signalizace je aktivován receptor pro epidermální růstový faktor EGFR. Výsledkem MAPK signalizace je aktivace transkripčního faktoru c-Fos.

Působením c-Fos dochází k produkci výše zmíněných prozánětlivých cytokinů působících chemotakticky především na neutrofile a makrofágy. Druh těchto secernovaných složek humorální nebuněčné neadaptivní imunity amplifikujících signál této prozánětlivé odpovědi závisí přímo úměrně na molární koncentraci přítomného CL.

Koncentrace CL  $1,5\text{--}15\ \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  jsou postačující pro zajištění vazby c-Fos k DNA, produkci G-CSF a GM-CSF, ovšem až při  $70\ \mu\text{M}$  koncentraci dochází v epiteliálních buňkách k sekreci IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  IL-6. Rozličné spektrum produkovaných cytokinů v závislosti na rozdílné koncentraci CL souvisí s různým větvením signálních drah, které CL spouští<sup>15,16</sup>.

Další virulenční faktor *C. albicans* představuje její schopnost vytvářet biofilmy, což jsou těsně srostlé buněčné komunity adherované k povrchům. Biofilmy jsou vysoce resistantní vůči antimykotikům, imunitnímu systému hostitele a jiným enviromentálním faktorům, což biofilmy činí významnou klinickou výzvou<sup>17</sup>. Multicelulární komunity biofilmu mohou růst na hostitelských tkáních a medicínských zařízeních a nástrojích, jako jsou například katetry nebo dentální protézy<sup>18</sup>.

Biofilmy u rodu *Candida* vykazují jistou morfologickou heterogenitu příslušných buněk. Předstupněm tvorby biofilmu je adheze k biotickým a abiotickým povrchům a agregace buněk. *ALS* (agglutinin-like sequence) geny kódují několik členů rodiny adhesivních proteinů, které jsou pak exprimovány buňkami biofilmu, aby se biofilm k povrchu trvale udržel. Na formování biofilmu se na molekulární úrovni podílí více signalizačních drah<sup>19</sup>.

Tvorba biofilmu zahrnuje několik stádií počínaje adhezí buněk kvasinek k povrchu, která může trvat až 11 hodin. Tato počáteční fáze je následována tvorbou mikrokolonií a množením buněk. Poté následuje po dobu 12–30 hodin intermediární fáze, která zahrnuje produkci extracelulární polymerní substance (EPS) a tvorbu dvojvrstvy tvořené kvasinkovými formami se zárodečnými trubicemi nebo hyfálními buněk.

Biofilm podléhá zrání (maturaci) v momentě, kdy EPS tvoří jakožto součásti ECM (extracelulární matrix) hustou síť kvasinkových a hyfálních forem buněk. Zrání trvá 38–72 h<sup>20</sup>. Nakonec dochází ve fázi disperze k uvolňování pučících dceřiných buněk, které k povrchům neadherují, jsou schopné propagace, kolonizace a infekce. Zralé biofilmy tvoří komplikované sítě sestávající z hyf, pseudohyf a jednobuněčných kvasinkových buněk zabalených do EPS<sup>21</sup>. Z dalších virulentních struktur exprimuje *C. albicans* dále 3 různé druhy (třídy) secernovaných hydrolytických enzymů, kterými jsou tzv. proteasy, fosfolipasy B a lipasy. Pro hydrolytické enzymy *C. albicans* je typická široká substrátovou specifita.

Značná hydrolytická aktivita byla kromě *C. albicans* nalezena i u jiných druhů kvasinek, jako je *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*. Nejvíce prostudovanou skupinou jsou secernované aspartátové proteasy. O fyziologických funkcích secernovaných fosfolipas je známo velmi málo, ještě méně pak o skupině lipas. Fosfolipasy jsou extracelulárně secernované a jejich úlohou je rozrušení buněčných membrán hostitelských buněk<sup>22</sup>.

Secernované aspartátové proteasy (Saps) je skupina 10 hydrolytických izoenzymů. Jsou kódovány rodinou nejméně deseti genů označovanou *SAP*. Saps přispívají k invazi *C. albicans* hlouběji do tkání hostitele. Děje se tak rozkladem buněčných membrán a degradací povrchových molekul hostitelských buněk. Protože tyto enzymy taktéž poškozují složky humorální a buněčné imunity, jsou kvasinky jejich produkcí schopny dobře odolávat antimikrobiálním imunitním mechanismům hostitelského organismu. Osm z těchto proteas (Sap 1–8) jsou secernované do extracelulárního prostoru, zatímco Sap 9 a Sap 10 jsou spojeny s buněčnou membránou pomocí GPI kotev. Saps je možné inhibovat například hexapeptidem pepstatinem A<sup>23</sup>.

Většina Saps vykazuje pH-optimum v kyselé oblasti a plní více úloh. Jejich pleiotropické funkce byly ukázány *in vitro* a *in vivo* pokusy<sup>24–27</sup>. Jednou z těchto funkcí je poškození epitelálních buněk s podobnými důsledky jako mají účinky candidalysinu, tj. rekrutování neutrofilů a indukce prozánětlivých odpovědí v podobě produkce IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ <sup>24–27</sup>. Proteolytická schopnost umožňuje *C. albicans* především rozkládat proteiny jako zdroj dusíku.

Proteolytická aktivita nepatogenních druhů z rodu *Candida* je obecně nižší než u původců kandidóz a dále je nižší u kvasinkových izolátů z nemocných pacientů v porovnání s izoláty ze zdravých hostitelů kvasinek. Pro budoucí výzkum prevence a terapie kandidóz má tedy význam zabývat se farmakologickými a imunologickými způsoby inhibice hydrolytických enzymů exprimovaných *C. albicans*<sup>28</sup>.

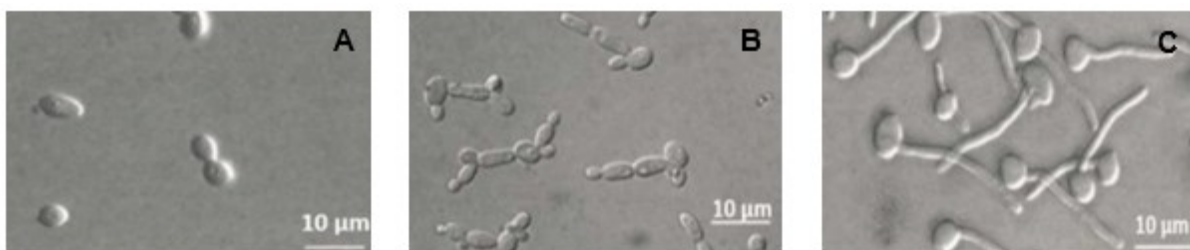
*C. albicans* může v rámci svého životního cyklu měnit a vykazovat různé morfologické formy. Schopnost polymorfního mikroorganismu *C. albicans* měnit vzhled se nazývá morfogenetická plasticita a je považována za důležitý patogenní atribut.

Význam této schopnosti tkví v přežití v různých hostitelských nikách a tkáních s rozličnými podmínkami prostředí daného místa v organismu. Těmito různými morfologickými formami jsou jednobuněčná kvasinková forma (blastospory), hyfální, pseudohyfální (viz Obr. 3). Dále bývá též rozlišována „bílá“ a „neprůhledná“ kvasinková buněčná forma, „šedé“ buňky a tzv. GUT forma. V kontextu kolonií lze též rozlišovat mezi dispergovanými buňkami (planktonickým růstem volně plovoucích kvasinek) a buňkami v biofilmu. Tyto jednotlivé morfogenetické formy se navzájem liší buněčným fenotypem, tvarem kolonií, mírou přilnavosti k pevným povrchům, profilem genové exprese a virulencí. Zmíněné formy a jejich změny jsou indukovány změnami v okolním prostředí<sup>29</sup>.

Jednobuněčná kvasinková forma bývá považována za formu komenzální, která kolonizuje povrchy některých hostitelských nik<sup>30</sup>. Hyfální forma je naproti tomu považována za formu invazivní, která penetruje hostitelské bariéry a umožňuje *C. albicans* získat přístup do hlouběji lokalizovaných tkání<sup>31</sup>.

K environmentálním faktorům, které morfologický stav *C. albicans* ovlivňují, patří stimuly jako je teplota, pH, dostupnost živin, nebo molekuly zprostředkující „quorum sensing“<sup>14,32,33</sup>. Důležitost přeměny z kvasinkové formy na hyfální je možné demonstrovat faktem, že kmeny *C. albicans* bez schopnosti filamentace jsou zcela avirulentní<sup>34</sup>. Ovšem schopnost způsobovat lidské nemoci jinými druhy kvasinek než *C. albicans*, jako je například *C. glabrata* nebo *C. auris*, které postrádají schopnost filamentace, je důkazem toho, že filamentace sama o sobě není nutnou podmínkou pro patogenezi u rodu *Candida*.

Kmeny, jejichž morfologie je omezena jen na hyfální formu jsou překvapivě *in vivo* hypovirulentní, z čehož vyplývá, že tranzice mezi kvasinkovou formou a filamentární formou je klíčová pro efektivní virulenci spíše než jednotlivé morfologické stavy<sup>35</sup>.



Obrázek 3: Jednobuněčná kvasinková forma (A), pseudohyfální (B) a hyfální (C). Převzato a upraveno<sup>29</sup>.

Při kyselém pH a teplotě okolo 30 °C rostou *C. albicans* jako jednobuněčné kvasinky. Při teplotě nad 34 °C v séru nebo v Leeho mediu nad 37 °C a neutrálním pH s dostatkem *N*-acetylglukosaminu přecházejí kvasinky formy do hyf. Hyfální forma je podlouhlá, vykazuje vláknitou strukturu s pravými přepážkami (septy) oddělujícími jednotlivé buňky v hyfě, avšak bez konstrikcí, tj. bez zúžení v místech, kde jsou buňky odděleny buněčnou stěnou. Stěny hyf jsou rovné a mají hladký vzhled, čímž se odlišují od pseudohyf, které v místě styku buněk vykazují zřetelná zúžení.

Pseudohyfy rostou při neutrálním pH. Jedná se o formu přechodnou mezi jednobuněčnou kvasinkovou a hyfální. Na pseudohyfách je dceřiný pupen, který se protahuje a po vytvoření septa zůstává dceřiná buňka spojená s mateřskou buňkou. Ve výsledku se vytváří filamenty, které sestávají z takto protáhlých buněk s konstrikcemi v místě sept, které jakožto přepážky oddělují jednotlivé buňky od sebe. Prodlužování pupenů do pseudohyf může být až extrémní, kdy takovéto filamenty mohou připomínat hyfální formu. Pseudohyfy a hyfy se souhrnně označují jako formy filamentární. Jak hyfální, tak pseudohyfální formy jsou invazivní, protože při laboratorní kultivaci vnikají do agarového substrátu<sup>36</sup>.

Vysoké koncentrace (600mM) fosfátu indukují tvorbu pseudohyf<sup>36</sup>. Formování hyf bývá pozorováno za předpokladu, že se *C. albicans* nachází v séru, dále za vyšší teploty, neutrálního pH, omezeného přístupu k živinám, nízkého parciálního tlaku kyslíku. Bakteriální peptidoglykany v séru hostitele, parciální tlak CO<sub>2</sub> a *N*-acetylglukosamin jsou silnými spouštěči filamentace. Molekuly zprostředkující „quorum sensing“, jako je například farnesol (3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodekatrien-1-ol), též způsobují filamentaci *in vitro*. Zatímco kvasinková forma za zmíněných podmínek prochází tranzicí do hyfální formy, přeměna pseudohyf do hyf je poměrně vzácná<sup>37</sup>.

Ume6 je transkripční faktor, který se uplatňuje při filamentaci a přeměně z jednobuněčné kvasinky na hyfu, jeho koncentrace přímo úměrně koreluje s výskytem hyfálních forem. Je-li jeho koncentrace nízká, převládá u *C. albicans* forma pseudohyfální<sup>38</sup>. Transkripční faktor eed1 (Transcriptional regulator DEF1) kódovaný genem *EED1* je potřebný k tomu, aby *C. albicans* nejen tvořila zárodečné trubice, ale aby je byla schopna prodloužit do hyf, a v morfogenezi z jednobuněčné kvasinky do hyfy má tedy zásadní význam<sup>39</sup>.

Další podmínkou, která indukuje přepínání z jednobuněčné kvasinkové formy na filamentální, je nedostatek dusíku. V odpověď na nedostatek dusíku v prostředí exprimuje *C. albicans* geny s názvy *MEP1* a *MEP2*. Tyto geny kódují dvě amoniakální permeasy *mep1p* a *mep2p* umožňující růst v prostředí, ve kterém je limitně malé množství amoniaku jediným zdrojem dusíku. Tyto transportéry amoniaku se liší tím, že *mep2p* má na rozdíl od *mep1p* indukční funkci jako aktivátor signalizačních drah vedoucích k filamentaci s názvy MAP kinasová dráha a cAMP-dependentní signalizační dráha, která je závislá na přítomnosti a aktivitě nitrobuněčného proteinu *Ras1p* s jeho C-koncem vyčnívajícím z buněčné membrány do extracelulárního prostoru. Jeho C-konec je nezbytný pro realizaci signalizační kaskády, ale postradatelný pro transportní funkci amoniaku pomocí *mep1p* a *mep2p*. V momentě, kde se v prostředí vyskytuje vyšší množství amoniaku, jsou *mep2p* transportéry zapojeny do jeho přenosu přes membránu a nepracují v rámci výše zmíněných signalizačních drah, což má za následek, že *C. albicans* je v prostředí bohatším na amoniak držena v jednobuněčné kvasinkové formě<sup>40</sup>.

„Šedý“ buněčný fenotyp je druh krátkodobé, přechodné morfologie. Jedná se o protáhlé formy s hladce vypadajícím buněčným povrchem, který společně s bílými a neprůhlednými buněčnými formami tvoří triádu přechodových morfologických stavů přispívajících ke zvýšení adaptačních schopností *C. albicans* na prostředí hostitele. Z této trojice typů buněk vykazuje „šedý“ buněčný typ nejvyšší aktivitu Sap proteas a také nejvyšší schopnost způsobovat povrchové kožní infekce. „Šedé“ buňky se rozmnožují tisíckrát efektivněji než „bílé“ buňky, ale zároveň méně efektivně než „neprůhledné“ buňky. Hlavní transkripční regulátor přepínání mezi „bílou“ a „neprůhlednou“ formou je transkripční faktor *Wor1*. *Wor1* je zásadní pro tvorbu „neprůhledných“ buněk, ale jeho aktivita není třeba pro tranzici z „bílých“ do „šedých“ buněk.

Pro vytvoření „bílého“ buněčného fenotypu je nutný transkripční faktor Efg1, který ale není třeba pro tranzici z „šedých“ do „neprůhledných“ buněk. Každý z těchto tří stavů lze jednoduše rozlišit na základě selektivního barvení kolonií pomocí barviva s názvem Phloxin B. Kolonie neprůhledných buněk se takto barví do růžova, šedé formy buněk jsou následně světle růžové a kolonie bílých buněk zůstávají po kontaktu s barvivem bílé<sup>41</sup>.

Další morfologická forma se nazývá GUT (z angl. „gastrointestinally induced transition“). Tento fenotyp závisí na expresi genu *WOR1* a je stabilní při 30 až 37° C. GUT buňky exprimují především geny pro vstřebávání anorganického fosfátu a vykazují sníženou expresi genů asociovaných s buněčnou adhezí a vychytáváním železa. Transkripční faktory pocházející ze savčího GITu aktivují expresi kvasinkového genu *WOR1* a podporují přechod (přepínání) mezi „bílymi“ buňkami a buňkami GUT. Za jistých podmínek se GUT buňky mohou transformovat do neprůhledných forem schopných množení<sup>19,42</sup>.

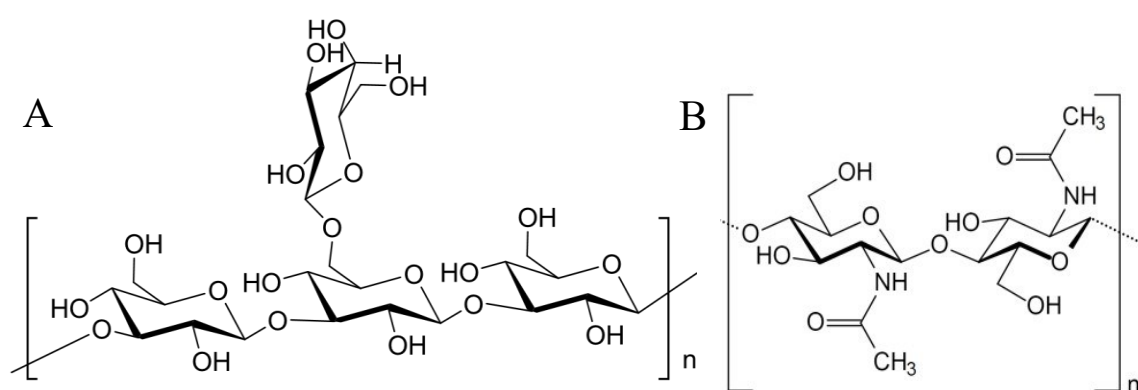
Dalším velmi významným virulentním faktorem *C. albicans* je existence její buněčné stěny.

Buněčná stěna *C. albicans* je komplexní a dynamická struktura, která sestává z „jádra“ tvořeného z  $\beta$ -1,3-glukanu kovalentně propojeného s  $\beta$ -1,6-glukanem, chitinu a vnější vrstvy tvořené glykosylovanými proteiny. Dvojvrstvá buněčná stěna uděluje buňkám tvar, zaručuje ochranu proti různým typům šoku (např. teplotní, osmotický stres) a adhezi na úrovni epiteliálních buněk hostitele. Její složení zahrnující imunogenní molekuly jako je chitin,  $\beta$ -1,3-glukan,  $\beta$ -1,6-glukan, manan a manoproteiny vytváří rozhraní pro interakci nejen s imunitními buňkami hostitele přes glykokonjugáty, ale představuje také hlavní cíl antifungálních léčiv, především z třídy echinocandinů<sup>43</sup>.

Vnitřní matrix buněčné stěny sestávající z propojených  $\beta$ -glukanových a chitinových molekul zaručuje tuhost a fyzikální vlastnosti, díky kterým buňky odolávají mechanickému natahování, ohýbání, pnutí. Buňky *C. albicans* ve formě vejčitých blastospor remodelují složení vlastních buněčných stěn v čase. Též přizpůsobují svůj metabolismus v závislosti na změnách jejich okolí prostřednictvím evolučně zakonzervovaných signalizačních drah.

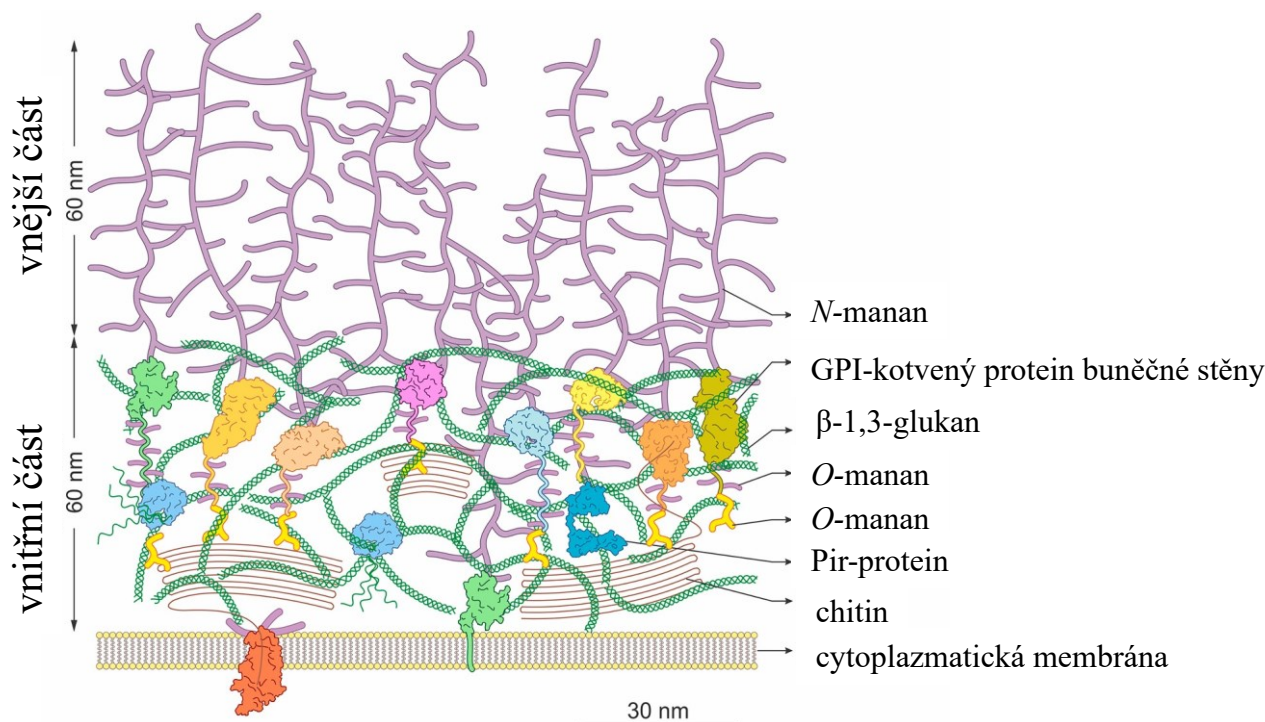


Ty řídí adaptace na buněčný stres, jako je HOG (z angl. „high-olmolarity glycerol pathway“) signalizační dráha, která vede k produkci a akumulaci osmoticky aktivních látek a zajišťuje návrat objemu buňky do původního stavu nebo signalizační dráha Cek1, která reguluje expozici  $\alpha$ -1,2- a  $\beta$ -1,2-manosidů, a tím reguluje i rozpoznání *C. albicans* imunitním systémem hostitele<sup>44,45</sup>. Amorfní vnitřní vrstva buněčné stěny je tvořena především z  $\beta$ -1,3- a  $\beta$ -1,6-glukanu a chitinu (viz Obr. 4).



Obrázek 4: Struktura  $\beta$ -1,3-glukanu a  $\beta$ -1,6-glukanu (A) a chitinu (B). Převzato a upraveno<sup>46,47</sup>.

Vnější fibrilární vrstva buněčné stěny obsahuje zejména vysoce manosylované proteiny buněčné stěny. Architektura obou těchto vrstev je viditelná v elektronovém mikroskopu. Fibrily sestávají ze zřetězených *N*-větvených mananů, které jsou spojeny s vrstvou GPI proteinů. GPI-proteiny jsou koncentrovány zhruba ve střední části buněčné stěny (viz Obr. 5). Neelastické chitinové mikrofibrily vyčnívají z nefibrilárního chitinu a  $\beta$ -glukanu, což umožňuje jakýsi ohyb  $\beta$ -glukanové sítě například při morfogenezi nebo pnutí v důsledku osmózy<sup>48</sup>. Chitin je biopolymer složený z jednotek  $\beta$ -1,4-*N*-acetylglukosaminu a je napojen na glukanovou síť, která bývá maskována vnější vrstvou<sup>47</sup>. Nachází se v buněčné stěně *C. albicans* v  $\alpha$ -formě, tj. přiléhající řetězce základní jednotky příslušného biopolymeru jsou antiparalelní. Tyto řetězce se spojují pomocí vodíkových můstků a skládají se do tzv. chitinových mikrofibril o průřezu 9-15 nm a délce zhruba 33 nm. Chitin je lineární neflexibilní látka, která v buněčné stěně netvoří souvislou vrstvu, nýbrž je v ní roztroušena a v případě poškození  $\beta$ -1,3-glukanu se na chitin mohou navázat proteiny buněčné stěny, které jsou jinak navázány na  $\beta$ -1,3-glukan.

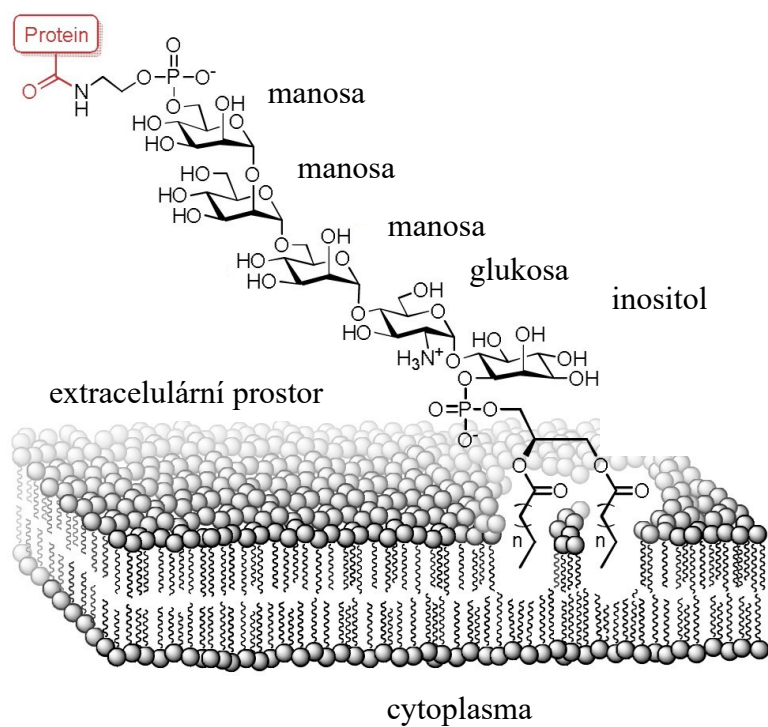


Obrázek 5: Schematický model buněčné stěny *C. albicans*. Hnědě chitinové mikrofibrily prostoupené helixy (zeleně)  $\beta$ -1,3-glukanu, fialově *N*-mananové řetězce připojené na proteiny buněčné stěny tvoří její vnější část, GPI kotvené proteiny mají globulární doménu, ke které jsou navázány *N*-glykosidickou vazbou dlouhé mananové struktury, a „stonkovitou“ doménu, na kterou jsou *O*-glykosidickou vazbou navázány krátké (fialové) mananové struktury, chromově žlutou je vyobrazen adhezivní protein Als 3, olivově zelenou adhezivní proteiny Als 2–9, mátově zelenou superoxididismutasa 5, citronově žlutou je secernovaná aspartátová proteasa Sap1, světle modrou secernovaná aspartátová proteasa Sap3, béžovou endoglukanasa, růžově exoglukanasa, oranžově je chitinasa, které jsou všechny přes  $\beta$ -1,6-glukan (žlutě) napojeny kovalentně na  $\beta$ -1,3-glukan a chitin, červeně je vyznačen enzym chitinsynthasa s její transmembránovou doménou. Manosylované proteiny buněčné stěny jsou rozprostřeny v celé vnitřní vrstvě, malá část z nich se nachází integrovaná v plazmatické membráně (nezobrazeno). Převzato a upraveno <sup>48</sup>

Způsob jistého rozprostření chitinu uděluje buněčné stěně zároveň vyšší hustotu, a tím i odolnost, ale nebrání jí ve flexibilním ohybu nebo ohybech v rámci adaptace na osmotický či mechanický stres. Prostorová struktura  $\beta$ -1,3-glukanu je helikální a buněčné stěně propůjčuje pružnost, přičemž jedna otočka zahrnuje šest jednotek glukosy s vnitřním průměrem šroubovice 1,44 nm. Zároveň jsou molekuly  $\beta$ -1,3-glukanu větvené, a tudíž obsahují i několik neredukujících konců, které slouží jako místa napojení GPI-kotvených proteinů buněčné stěny.

Prostorová struktura  $\beta$ -1,6-glukanu není do detailu prozkoumána, protože se jedná o polymery velikosti 15-20 monomerních jednotek a jsou zároveň velmi větvené. Manosylované proteiny buněčné stěny *C. albicans* lze rozdělit na nejpočetnější GPI-kotvené proteiny a dále Pir proteiny s tzv. vnitřním opakováním, které jsou *N*-manosylované a jejich vazba na  $\beta$ -1,3-glukan je nestabilní v alkalickém prostředí, ve kterém lze tyto proteiny z buněčné stěny vyluhovat<sup>48</sup>.

Glykosylfosfatidylinositol (GPI) je glykolipid kotvící mnohé proteiny v membránových strukturách a je v rámci jedné z posttranslačních modifikací proteinů eukaryot k nově syntetizovaným proteinům kovalentně připojován. Všechny glykosylfosfatidylinositolové kotvy mají společné jádro, které se skládá z ethanolaminofosfátu, trimanosidu, glukosaminu a glycerolfosfolipidu fosfatidylinositolu (viz Obr. 6). GPI je s proteinem spojen ethanolaminovou hlavou na terminálním C-konci proteinu. U eukaryot probíhá biosyntéza GPI prekurzorů a posttranslační modifikace membránových proteinu pomocí GPI v drsném endoplazmatickém retikulu.



Obrázek 6: Obecné schéma struktury GPI kotveného proteinu do fosfolipidové membrány. Převzato a upraveno<sup>49</sup>.

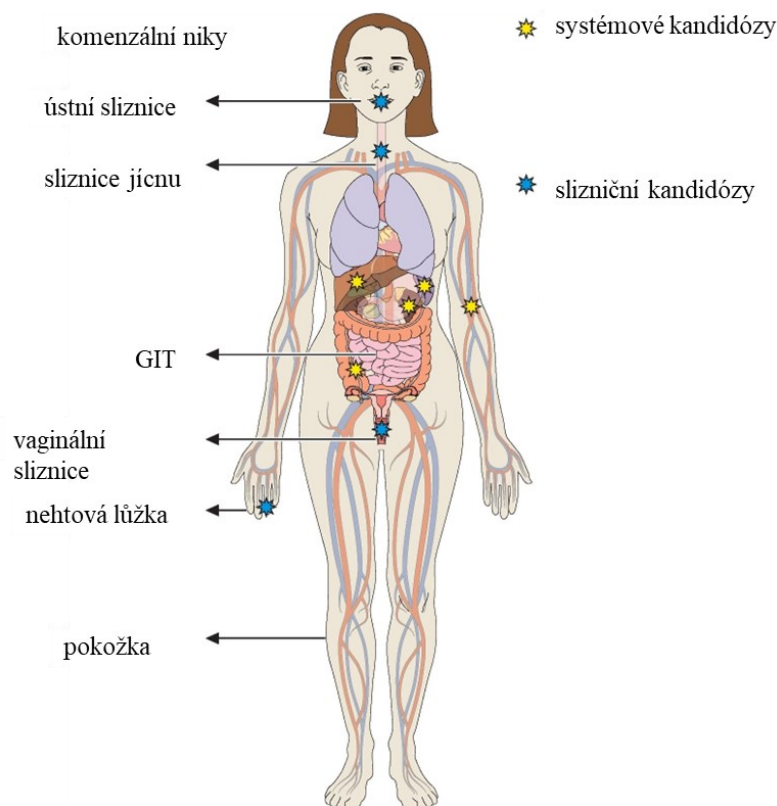
Při GPI posttranslační modifikaci je signální peptid příslušného proteinu odštěpen a nově vzniklý C-konec je napojen peptidovou vazbou k ethanolaminu daného prekurzoru GPI. Procesy štěpení a následného připojení jsou katalyzovány tzv. GPI transamidasovým komplexem<sup>50</sup>. GPI kotvené proteiny zahrnují adheziny, glykosyltransferasy, yapsiny (aspartátové proteasy) a superoxiddismutasy a *C. albicans* obsahuje takových GPI kotvených proteinů podle *in silico* analýz přibližně 115 druhů, což je dvakrát více než *Saccharomyces cerevisiae*<sup>51</sup>.

### 1.3 Kandidózy

*C. albicans* se na rozdíl od většiny houbových patogenů do lidského organismu dostává přenosem z matky na dítě, čímž se stává součástí lidského mikrobiomu. Z tohoto důvodu jsou infekce způsobené *C. albicans* (kandidózy) převážně endogenní. Během ko-evoluce mikroskopických hub a jejich hostitelů došlo v důsledku selekčního tlaku ze strany imunitního systému hostitele na komenzální mikroorganismy k několika adaptacím, které zejména *C. albicans* umožňují obejít antimikrobiální mechanismy adaptivního a vrozeného imunitního systému.

Některé z těchto adaptací jsou známými faktory virulence jako například tvorba biofilmu chránící buňky hub před přímým útokem vrozeného imunitního systému. Dále sem patří například časté změny morfologie kvasinkových buněk a s ní spojené změny ve složení povrchových antigenů buněčné stěny, produkce secernovaných aspartátových proteas degradujících složky komplementu. Tyto adaptace vedou k tomu, že je *C. albicans* schopna imunitnímu systému unikat a v případě jeho oslabení se mu vymanit a způsobovat tak patologická onemocnění.

První linii obrany při propuknutí infekce tvoří akumulace neutrofilů, které odstraňují kvasinky fagocytózou. Obdobné funkce plní monocyty a makrofágy. Pro regulaci fagocytů a účinné likvidace kvasinek hrají při adaptivní antifungální odpovědi výsadní roli pomocné lymfocyty T17 a lymfocyty T1. Lymfocyty B a plazmocytů jsou zodpovědné za produkci protilátek. Medicínsky významné infekce způsobované *C. albicans* mohou být klasifikovány do dvou typů (viz Obr. 7), a to mukosní (slizniční) a systémové. Mukokutánním povrchem, který bývá předně zasažen *C. albicans* je například vaginální povrch při vulvovaginální kandidóze, ústní při orofaryngeální kandidóze, jícnový při esofageální kandidóze a méně časté je i postižení povrchu nehtů při tzv. onychomykóze.



Obrázek 7: Přehled míst obývaných komenzálně žijící *C. albicans* a klinické manifestace jejich infekce. Převzato a upraveno<sup>7</sup>

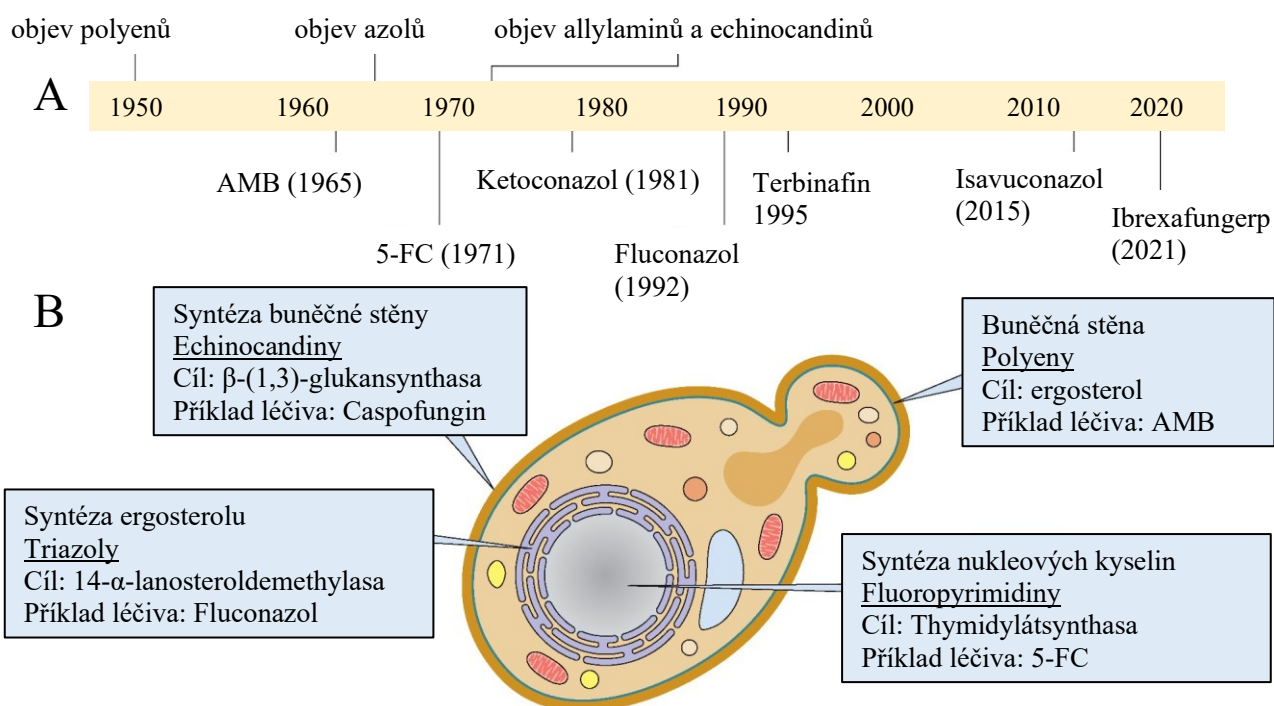
Život ohrožující systémové kandidózy postihují sterilní části těla jako je krevní oběh, přes který se invazivní kvasinky mohou dostat až do důležitých orgánů. Protilátková odpověď může v případě systémových kandidóz sloužit jako diagnostický marker, protože koncentrace lidských specifických protilátek izotypu IgG v séru namířené proti proteinům *C. albicans* se během systémové kandidózy zvyšuje a lze ji stanovit metodou ELISA<sup>7,52,53</sup>.

#### 1.4 Chemoterapie kandidóz

Faktory, které přispívají k vysoké morbiditě a mortalitě systémových kandidóz u léčených pacientů, zahrnují především jejich nedostačující diagnostiku a neoptimální účinnost léčiv *in vivo*<sup>54</sup>. Třídy antifungálních léčiv, které jsou v současnosti dostupné k léčbě onemocnění způsobených kvasinkou *C. albicans*, zahrnují polyeny, fluoropyrimidiny, azoly, echinocandidy a allylaminy<sup>55</sup>.

Terbinafin je allylaminové léčivo, které inhibuje biosyntézu ergosterolu tím, že cílí na enzym skvalenepoxidasu, a tím blokuje chemickou přeměnu skvalenu na jeho epoxid<sup>56</sup>.

Polyeny se váží přímo na membránový sterol ergosterol, který je pro doménu hub unikátní. Po navázání polyenů na ergosterol vytvářejí polyeny póry do houbových buněčných membrán, kterým způsobují osmotickou lysi houbových buněk. Jedním z nejznámějších zástupců polyenových léčiv je Amphotericin B (AMB), jehož působení spočívá nejen v již zmíněné osmotické lysi cílových buněk, ale také v oxidativním ničení hub a dále též ve vyvázání ergosterolu, které následně vede ke vzniku agregátových struktur vně buněk<sup>57,58</sup>.



*Obrázek 8:* Časové milníky vývoje antifungálních léčiv a jejich cílové struktury. V panelu A je časová osa demonstrující objevy prvních antifungálních sloučenin s datem, kdy byla látka schválena americkou federální agenturou FDA pro schvalování bezpečnosti potravin a léčiv. V panelu B jsou schémata cílových struktur některých skupin antifungálních léčiv. Převzato a upraveno<sup>7</sup>.

AMB bývá považován za jedno z nejpotentnějších širokospektrých antifungálních léčiv, které se používá k léčbě jak slizničních, tak i systémových fungálních infekcí.

U AMB je častým a limitujícím nežádoucím účinkem nefrotoxicita i přesto, že lipidové lékové formy AMB způsobují menší poškození renálního traktu<sup>59</sup>. Další ze třídy polyenů s názvem Nystatin je naproti tomu používán výhradně k léčbě orálních kandidóz<sup>60</sup>.

Navzdory široce rozšířenému užívání AMB po desetiletí není rezistence kvasinky *C. albicans* vůči AMB častá, pokud se ale přesto objeví, bývá nejvíce asociována s mutacemi genů *ERG3* nebo *ERG6*, které pak ústí ve snížení koncentrace ergosterolu a AMB se na plazmatickou membránu hub váže v mnohem menší míře<sup>7,61</sup>. Pyrimidinový analog označovaný též jako 5-FC neboli 5-fluorocytosin je kvasinkou *C. albicans* nejprve vstřebán a následně vnitrobuněčně přeměněn účinkem enzymu cytosindeaminasy na 5-fluorouracil, který interferuje při syntéze RNA a DNA.

Vznik rezistence k 5-fluorouracilu bývá spojena s mutacemi genů pro enzym cytosinpermeasu a cytosindeaminasu, čímž je snížen příjem léčiva do buněk hub a zároveň konverze v účinnou látku. Užívání 5-FC je limitováno nežádoucími účinky postihujícími gastrointestinální trakt, játra a je spojeno s kožními problémy. Z těchto důvodů bývá 5-FC podáván v kombinaci s AMB nebo triazololy v závažnějších případech, jako je endokarditida nebo meningitida, kdy je kandidózní onemocnění složitější vyléčit<sup>62</sup>. Azoly, jako je Fluconazol, Itraconazol nebo Voriconazol inhibují, cytochrom P450 s názvem 14- $\alpha$ -lanosteroldemethylasa, který je zodpovědný za 14 $\alpha$ -demethylaci prekursoru ergosterolu lanosterolu, čímž blokují ergosterolovou biosyntézu<sup>61</sup>.

Současně tato inhibice vede k akumulaci toxických sterolových meziproductů na houbových cytoplazmatických membránách. Azolová léčiva se člení do dvou podskupin na základě jejich chemické struktury, kterými jsou imidazolová a triazolová léčiva. K imidazolovým derivátům se řadí například Clotrimazol, Ketoconazol, Miconazol. Druhou podskupinou azolů jsou triazololy, ke kterým patří Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol nebo též například Isavuconazol.

Současné aplikace imidazolů mají význam pro léčbu slizničních kandidóz, zatímco triazoly se běžně používají jak k léčbě sliznic, tak i k systémovým infekcím, ačkoliv jsou limitovány toxicitou specifickou pro triazoly a také je jejich využití omezováno občasnými nežádoucími interakcemi s jinými druhy léčiv<sup>63</sup>.

Vznik azolových rezistencí *C. albicans* má různé molekulární příčiny. Jednou z nich je taková mutace genu *ERG11*, která vede k nadměrné expresi enzymu 14- $\alpha$ -lanosteroldemethylasy, dále například mutace genu *UPC2* pro transkripční faktor Upc2 vedoucí též ke zvýšené expresi 14- $\alpha$ -lanosteroldemethylasy. Dále mutace genů *ERG3* a *ERG6* způsobující kumulace toxických sterolů. Též k rezistencím vůči azolům vedou zvýšené exprese efluxových pump odstraňujících léčiva z houbových buněk, kam spadají ABC (ATP binding cassette) transportéry CDR1 a CDR2 a MFS (major facilitator superfamily) transportér MDR1. Další molekulární podstatou azolové rezistence bývá aneuploidie, trisomie, ztráty heterozygoty, izochromosomové formace nebo enzymatické změny v biosyntetické dráze sfingolipidů<sup>64,65</sup>.

Nejnovější třídou antifungálních léčiv jsou parenterálně podávané echinocandiny, kam patří dobře snášený Caspofungin, dále Micafungin, Anidulafungin, které jsou známé inhibicí  $\beta$ -1,3-glukansynthasy, enzymu, který je zapojen do procesu syntézy  $\beta$ -1,3-glukanu. Pokud ve struktuře buněčné stěny hub  $\beta$ -1,3-glukan chybí, následuje ztráta její tuhosti a lyze<sup>66</sup>. Zvyšující se počty incidence echinocandinových rezistencí u klinicky izolovaných kmenů *C. albicans* se staly v posledních letech značným problémem. Orálně podávané léčivo Ibrexafungerp, který patří k novější skupině inhibitorů glukansynthasy nazývané triterpenoidy, ukázalo významnou protikandidovou aktivitu proti *C. albicans*, ale též proti multirezistentním *C. glabrata* a *C. auris*. Pro účinnost léčiva Ibrexafungerp je optimální kyselé pH, jež je často součástí prostředí vaginální sliznice. Ibrexafungerp byl také schválen úřadem FDA k léčení vaginálních kandidóz (VVC). Dalším slibným antifungálním terapeutikem je Fosmanogepix, který se v současnosti nachází v procesu klinických testů. Jedná se o inhibitor houbového enzymu Hwp1, který je zapojen do biosyntézy glykosylfosfatidylinositolově kotvených manoproteinů v buněčné stěně a plazmatické membráně kvasinek<sup>7</sup>.



S ohledem na omezení antifungální farmakoterapie, jako jsou její náklady, vznik houbových rezistencí, vedlejší účinky léčiv a stále vysoké počty úmrtí v důsledku systémových kandidóz, je třeba věnovat pozornost hledání účinných léčiv proti nemocem způsobeným patogenními kvasinkami. Imunoterapie se přitom jeví jako další možný způsob hledání optimální léčby pro různé typy kvasinkových infekcí<sup>52</sup>.

### 1.5 Aktivní a pasivní imunizace

Aktivní a pasivní imunizace se souhrnně označují jako antigenně specifická imunomodulační léčba, která se nabízí jako jeden z možných přístupů ve snahách o řešení v problematice mnoha onemocnění. Vůči určitému antigenu lze experimentálně navodit jak specifickou imunitní reakci, tak toleranci a v praxi se více daří první způsob, tedy imunizace.

Imunizaci lze provádět aktivně, tedy očkováním, nebo pasivně dodáním specifických protilátek. Aktivní imunizace (vakcinace) je použití antigenu k vyvolání imunitní reakce, která může později chránit před patogenem nesoucím onen antigen (nebo antigen jemu dostatečně podobný). Aktivní imunizace s sebou nese určitá rizika vyvolání infekce při použití oslabených živých mikroorganismů zvláště u jedinců s defekty imunity nebo rizika anafylaktických reakcí. Většina postupů aktivní imunizace (vakcinace) je profylaktických, což znamená, že vakcinace má zabránit možnému budoucímu onemocnění.

K dosažení optimálního imunogenního účinku je obvykle potřeba používat adjuvancia, která napomáhají rozpoznání antigenu antigen prezentujícími buňkami (APC) a která případně napomáhají nespecifické stimulaci úvodních fází imunitní odpovědi. Experimentálně se používají jako adjuvancia emulze minerálních olejů (nekompletní Freundovo adjuvans), popř. ve směsi s usmrcenými mykobakteriemi (kompletní Freundovo adjuvans). Malé kapičky oleje s emulgovaným antigenem jsou dobře pohlcovány APC a složky mykobakteriálních stěn stimulují zánětlivou reakci, produkci cytokinů a zlepšení prezentační funkce APC. V humánní medicíně je nejčastěji používaným adjuvanciem hydroxid hlinitý (alum), na jehož malé částice se antigeny adsorbují a jsou pak dobře pohlcovány APC. Jako další příklad klinicky používaného adjuvancia lze uvést monofosforyl lipid A<sup>67</sup>.

Pro optimální výsledek imunizace je velmi důležitý způsob podání a je potřeba se vyhnout tomu, že antigen namísto aktivní imunitní odpovědi vyvolá spíše toleranci. Tolerogenní bývá například podání rozpustného antigenu v monomerní formě do krve, imunogenní je typicky podání agregovaného antigenu, respektive antigenu adsorbovaného na vhodný nosič subkutánně. Protilátky izolované z imunizovaných experimentálních zvířat se pak používají pro nejrůznější analytické, detekční a jiné účely jako velmi důležité výzkumné, diagnostické a terapeutické nástroje.

Pasivní imunizace se přirozeně uplatňuje při přestupu mateřských protilátek do krve plodu. U lidí se tak děje prenatálně transplacentárně, u některých živočichů se vstřebávají protilátky do oběhu novorozeného mláděte z mateřského mléka. Terapeuticky se zvířecí protilátky používají proti různým toxinům (hadí jed, tetanický toxin, botulotoxin). Vážné nebezpečí představuje možnost anafylaktických reakcí při opakovaném podání nebo vzniku sérové nemoci<sup>68</sup>.

### 1.5.1 Aktivní imunizace proti kvasince *Candida albicans* a její omezení

Primární výzvou vývoje vakcín jsou vysoké incidence skupin pacientů, kteří jsou imunitně oslabeni. Imunitní oslabení těchto lidí zavdává podnět k obavám jak vzhledem k účinnosti, tak i k bezpečnosti takovýchto vakcín.

V kontrastu k antibakteriálním a antivirovým vakcínám, jejichž účinné látky většinou cílí na povrchové struktury patogenů, mají houbové patogeny, jako je rod *Candida*, komplexní struktury buněčných stěn, a chybí jim lehce rozpoznatelné povrchové antigeny. Houby i živočichové patří do domény eukaryota a jedním z mála odlišovacích znaků mezi buňkami patogenních kvasinek a jejich hostitelů je přítomnost buněčné stěny hub, na jejíž komponenty nebo enzymy jejich biosyntézy jsou namířena současná antimykotika. Tytéž struktury by též mohly být cílem potenciální antifungální vakcíny.

Živé vakcíny vyvolávají zpravidla lepší imunitní odezvu, a jsou proto vhodnějšími kandidáty na formu vakcíny. Při použití živých vakcín však hrozí riziko vzniku nežádoucích infekcí u pacientů s oslabenou imunitou.

Neaktivní vakcinační substance celých neživých organismů a jejich strukturních podjednotek jsou považovány za bezpečnější, ale u pacientů s oslabeným imunitním systémem mohou být naopak méně účinné a nemusely by vyvolat dostatečně silnou protektivní odezvu imunitního systému recipienta. Kromě toho různorodost jednotlivých druhů rodu *Candida* ztěžuje vývoj účinné antifungální vakcíny. Jedná se především o často se měnící morfologie a s nimi i složení povrchových struktur buněčné stěny a široké spektrum různých onemocnění, které kvasinky vyvolávají.

Na jedné straně dvou extrémů stojí například systémové kandidózy, při kterých je imunitní systém hostitele příliš oslaben na to, aby kvasinky odstranil zánětlivou odpovědí. Vakcína pro takový typ onemocnění by měla u recipienta poskytnout především navození tvorby protilátek a mediátorů zánětu pro posílení zánětu k likvidaci patogenu. Vakcinační přístup se na straně druhé příliš nehodí pro vulvovaginální kandidózy imunokompetentních žen, kde by bylo vhodné, aby potenciální vakcína cílila na zahubení kvasinek přímo a nespouštěla zánětlivé mechanismy imunitního systému hostitele<sup>69</sup>.

Vakcína proti systémovým kandidózám by dále například musela být testována na dostatečně velkém počtu dobrovolníků, aby mohla být schválena, což s sebou nese velká zdravotní rizika. Nakonec se naskytá otázka, zda by byly účinné antifungální vakcíny vůbec vhodné pro odstranění kvasinkových buněk z organismu, protože by se tím mohla porušit rovnováha lidského mikrobiomu, kde se *C. albicans* nachází též jako komenzál<sup>70</sup>.

### **1.5.2 Pasivní imunizace proti kvasince *Candida albicans* jako možnost účinné imunoterapie pomocí slepičích specifických protilátek IgY**

Ptačí imunoglobuliny jsou koncentrovány ve vaječných žloutcích, čímž poskytují imunitní ochranu ptačím potomkům podobně jako imunoglobuliny v mléce savců. Imunoglobulin označovaný jako IgY (z angl. egg yolk = vaječný žloutek) je v ptačí krvi nejzastoupenější protilátkový izotyp. Izotypy IgA nebo IgM jsou u ptáků též zastoupeny, avšak v mnohem menším množství. Přestože byl přenos ptačích specifických protilátek do vaječných žloutků poprvé popsán v roce 1893 a slepičí imunoglobuliny IgY poprvé charakterizovány již v roce 1969, staly se IgY pro jejich potenciální využití jako alternativa k lidským IgG v medicíně předmětem intenzivního výzkumu teprve během posledních dvou desetiletí.<sup>71</sup>

Vaječné žloutky tak představují relevantní alternativní zdroj protilátek, protože vykazují i některé výhody oproti savčím sérovým imunoglobulinům zejména s ohledem na produktivitu jejich získávání a ochranu zvířat.

IgY mohou být ve zdravotnickém výzkumu široce používány jako terapeutický a diagnostický prostředek a jsou získávány z imunizovaných slepic, zatímco v posledních letech byly pro experimentální a diagnostické účely savčí specifické protilátky získávány především z malých hlodavců. Díky fylogenetické vzdálenosti mezi ptáky a savci identifikuje ptačí imunitní systém většinu savčích proteinů jako tělu cizí. V důsledku toho je po imunizaci slepic savčími antigeny možné dosáhnout mohutnější stimulace jejich adaptivního imunitního systému, která vede k vyšší produkci specifických protilátek v porovnání s imunizovanými hlodavci. Kromě nízké produktivity jsou s takovými přístupy spojeny postupy, které pokusným zvířatům (většinou hlodavcům) přináší bolesti a utrpení, konkrétně se jedná o imunizace, odběry krve či zabíjení. Protože v porovnání s imunizovanými hlodavci produkují slepice větší množství protilátek, je možné redukovat počty zvířat potřebných pro  $\gamma$ -globulinovou produkci<sup>12,72</sup>.

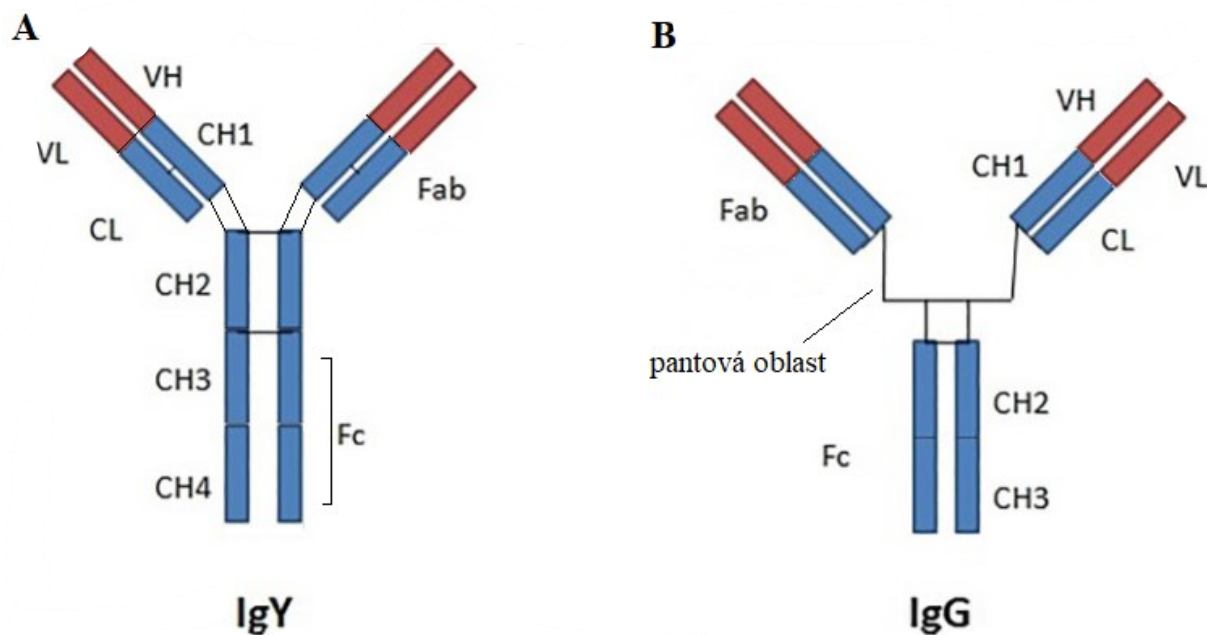
Další výhodou IgY je jejich ekonomický aspekt. Náklady na výživu slepic jsou nižší než náklady spojené s chovem zvířat, jako jsou například myši a králíci. Slepici vyprodukované množství protilátek dokonce odpovídá takovým množstvím, která produkují větší zvířata jako jsou kozy a ovce. Za jeden kalendářní rok snese jedna slepice průměrně kolem 300 vajec, čímž vyprodukuje v průměru 18,25 gramů IgY, přičemž podíl specifických protilátek na celkovém množství všech vyprodukovaných imunoglobulinů zde leží mezi 2 až 10 procenty<sup>73,74</sup>. Zároveň platí, že množství takto vyprodukovaných protilátek je úměrné množství antigenu podaného imunizované slepici, jeho imunogenicitě a molekulové hmotnosti antigenu<sup>75</sup>.

Výzkumná skupina Tekeuchiho testovala připravený gel obsahující IgY proti kvasince *C. albicans*. Ten způsobil redukci CFU v ústní dutině u postarších pacientů během 1 měsíce jako slibný terapeutický nástroj vhodný k profylaxi proti orální kandidóze (v kombinaci se zubní hygienou). Zároveň bylo ukázáno, že anti-*C. albicans* IgY nezpůsobily v ústní dutině významnou redukci *C. auris* a *C. tropicalis*<sup>76</sup>.

Výzkumnou skupinou Fujibayashiho byly získány výsledky o křížové reaktivitě IgY vůči vícero druhům rodu *Candida* a též byla ukázána inhibice tvorby biofilmu *C. albicans* v prostředí bez krevního séra. Dále bylo ukázáno, že specifické IgY jsou schopny inhibovat adhezi *C. albicans* k zubním protézám<sup>77</sup>.

### 1.5.3 Strukturální a biochemické charakteristiky IgY

Izotyp IgY je přítomný nejen v ptačí krvi a vejcích, ale též u plazů, obojživelníků a dvojdyšných. Je evolučním prekursorem savčích protilátkových izotypů IgG a IgE<sup>78</sup>. Molekula IgY má proto podobnou strukturu jako IgG (viz Obr. 9).



Obrázek 9: Izotyp IgY (A), izotyp IgG (B). VH je variabilní N-koncová doména těžkého řetězce imunoglobulinu, VL je variabilní N-koncová doména lehkého řetězce imunoglobulinu. Převzato a upraveno<sup>75</sup>.

Obsahuje dva těžké řetězce (H), každý o molekulové hmotnosti 67 až 70 kDa. Dále IgY sestává ze dvou lehkých řetězců (L), kde každý má přibližnou molekulovou hmotnost 25 kDa. Lehké řetězce IgY mají jednu konstantní doménu (CL) a jednu variabilní doménu (VL) stejně jako IgG. Hlavní rozdíl mezi IgY a IgG je dán strukturou těžkých řetězců. IgG má tři konstantní domény na každém z obou těžkých řetězců (CH1 až CH3), zatímco oba těžké řetězce molekuly IgY mají každý čtyři konstantní domény (CH1 až CH4).

Tato jedna další doména oproti molekule IgG s příslušnými polysacharidovými řetězci (IgY je v porovnání s IgG zhruba dvojnásobně glykosylován<sup>12</sup>) zvyšuje molekulovou hmotnost IgY až na 180 kDa oproti 150 kDa v případě IgG<sup>75</sup>. IgY je méně flexibilní než IgG z důvodu chybějící pantové oblasti mezi CH1 a CH2, čímž se podobá lidské protilátce izotypu IgE<sup>79</sup>. Flexibilitu IgY též omezuje přítomnost glycinových a prolinových zbytků mezi CH1-CH2 a mezi CH2-CH3 doménami<sup>75</sup>. Výhodou této vyšší řetězcové tuhosti (nepružnosti) je vyšší odolnost vůči proteolytickému štěpení a fragmentaci<sup>79</sup>. V porovnání s IgG je IgY navíc hydrofobnější. Izoelektrický bod molekuly IgY leží mezi 6,5 a 7,5<sup>80</sup>.

Poločas čisté protilátky IgY se pohybuje v řádu měsíců, přičemž její aktivita je schopna se udržet při pokojové teplotě po dobu šesti měsíců a při teplotě 37 °C po dobu jednoho měsíce. Afinity purifikované IgY si za skladování při 4 °C udržují svoji aktivitu po dobu až 5 let<sup>75</sup>. Fc část molekuly IgY není schopna aktivovat lidský komplement<sup>76,81</sup>, neváže se na revmatoidní faktory<sup>82</sup>, ani na bakteriální G a A proteiny<sup>79</sup>, neváže se ani na Fc receptory. Tyto výhodné vlastnosti oproti lidskému IgG ho činí též vhodným terapeutikem<sup>12</sup>.

Ačkoliv se jedná o molekulu proteinu, je IgY rezistentní vůči vysoké teplotě a vlivům pH, je stabilní mezi 30 až 70 °C a aktivní v pH rozmezí od 3,5 do 11 jednotek. Se zvyšující se teplotou je však možné pozorovat úbytek reaktivity IgY vůči antigenu. Přídavek sacharosy, maltosy, glycinu nebo glycerolu chrání IgY před tepelnou denaturací, sorbitol při kyselém pH IgY stabilizuje. Izotyp IgY podléhá hydrolytickému štěpení trypsinem, chymotrypsinem nebo pepsinem<sup>83</sup>. Trávení molekul IgY působením papainu vede jako u molekul IgG ke vzniku jednoho Fc fragmentu a dvou monovalentních Fab fragmentů. Štěpení molekul IgY působením pepsinu vede k vytvoření jednoho pFc<sup>\*</sup> a dvou monovalentních Fab fragmentů na rozdíl od savčích protilátek, které působením pepsinu vytvářejí jeden bivalentní fragment F(ab)<sub>2</sub><sup>75</sup>.

#### 1.5.4 Další možnosti aplikace slepičích IgY

Díky strukturním rozdílům a fylogenetické vzdálenosti jsou IgY specifitější pro diagnostické užití a vykazují vyšší aviditu pro savčí proteiny než IgG, což IgY činí důležitou alternativou v hledání efektivnějších diagnostických prostředků a terapeutik.

Z pohledu schopnosti IgY neutralizovat mikroorganismy reprezentují tyto protilátky důležitý terapeutický nástroj v dobách rostoucích antibiotických rezistencí a rozvoje virových onemocnění, pro která zatím neexistují žádná terapeutika. Při použití v detekčních metodách (např. ELISA) jsou schopny odhalit přítomnost rozličných antigenů jako jsou patogenní mikroorganismy nebo tumorové markery.

IgY namířené například proti bakterii *Listeria monocytogenes* vykazují značený inhibiční efekt na růst této bakterie v tekutých médiích a vzorcích ryb skladovaných při 0 až 6 °C, a to v závislosti na dávce protilátek, což naznačuje, že anti-*L. monocytogenes* IgY mají antimikrobiální potenciál pro užití v potravinářském průmyslu. Dalším příkladem je využití IgY jako antibioteroristického prostředku. Le Clair a spol. ukázali, že IgY připravené proti stafylokokovému enterotoxinu B (zkr. SEB), který je zneužitelný jako biologická zbraň, může po podání osobám zasaženým tímto materiálem zachránit život<sup>76,77</sup>.

### 1.5.5 Monoklonální a polyklonální protilátky

Protilátková odpověď i proti nejjednodušším antigenům je většinou polyklonální a výsledkem je směs stovek až tisíců individuálně více či méně odlišných molekul imunoglobulinů, které jsou produkty velkého počtu různých klonů plazmocytů. Výsledkem záměrné imunizace experimentálního zvířete je pak polyklonální antisérum reagující s řadou epitopů na určitém antigenu.

Naproti tomu monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk s unikátní specifitou téhož izotypu. V organismu se vyskytují nepatrná množství jednotlivých monoklonálních protilátek, avšak za patologických stavů mohou převládat. To se děje v případě nádoru z plazmatických buněk, tzv. plazmocyтому (myelomu), při kterém se nádorově změněný plazmocyt vymkne regulaci, ale zachovává si schopnost produkovat protilátky (jednoho izotypu, jedné náhodné, obvykle neznámé specifity). *In vitro* lze homogenní monoklonální protilátky získat izolací klonů lymfocytů B, které produkují protilátky žádané specifity, a jejich pěstováním v buněčné kultuře. Problém je, že lymfocyty B mají krátkou životnost, a proto se musí immortalizovat.

Nejobvyklejším způsobem je fúze s vhodnou myelomovou buněčnou linií, která roste dobře a neomezeně ve tkáňové kultuře. Výsledkem fúze mezi specifickým B lymfocytom a myelomem je tzv. hybridom, hybridní buňka, která roste v kultuře a produkuje stejné protilátky jako původní B lymfocyt.<sup>84</sup> Pro léčebné použití se stejně jako pro diagnostické účely používaly nejprve myší monoklonální protilátky. Po jejich podání pacientům však docházelo k imunitní reakci na cizorodou bílkovinu a k produkci protilátek označovaných jako HAMA (human anti-mouse antibodies). Tyto protilátky nejen že znemožňují navázání monoklonální protilátky na cílový antigen, ale mohou také způsobit anafylaktické reakce.

Z tohoto důvodu bylo věnováno velké úsilí rozvoji technologií, které by umožnily snížit imunogenicitu monoklonálních protilátek, a výsledkem byly protilátky chimérické, ve kterých jsou variabilní části zvířecí a konstantní části nahrazeny metodami genového inženýrství lidskými konstantními úseky, nebo humanizované, které mají většinu částí (metodami genového inženýrství) nahrazenou lidskými úseky až na hypervariabilní úseky, které tvoří vazebné místo pro antigen.

V případě chimérických protilátek jsou ponechány z původní myší protilátky pouze části odpovídající fragmentu Fv, u humanizovaných protilátek je pak strukturami z lidského imunoglobulinu nahrazeno vše kromě krátkých úseků vytvářejících vazebné místo (tzv. CDR oblasti neboli complementary determining regions). Existují metody přípravy plně lidských monoklonálních protilátek a lze připravit i tzv. bispecifické monoklonální protilátky, jež mají vazebná místa o různé antigenní specifitě, nebo konjugáty protilátek, kde je konjugovanou účinnou látkou například toxin, cytostatikum, enzym, viz níže<sup>68</sup>.

### **1.5.6 Imunochemické stanovení specifických protilátek pomocí ELISA**

Metody EIA (z angl. „Enzyme Immunoassay“) byly popsány na začátku sedmdesátých let 20. století a jsou rutinně používány k detekci a ke kvantifikaci protilátek (nebo antigenů) přítomných i ve velmi malém množství. Specifikem EIA je jejich vysoká senzitivita. Imunodetekce založené na molekulách značených enzymy byly vyvinuty v návaznosti na předešlé imunodetekce s radioizotopy. Výhodou imunoglobulinových konjugátů s enzymy je delší doba jejich možného uchování, bezpečná manipulace a méně náročné detekční vybavení.



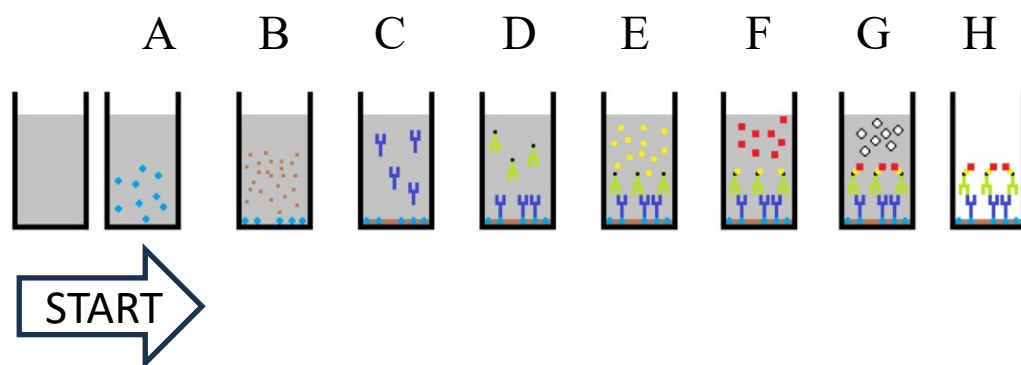
Jedním z typů EIA je ELISA<sup>85</sup> (z angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“). Metodu ELISA lze použít v různém provedení. Je možné pracovat buď s protilátkou v nadbytku, s antigenem v nadbytku, při kompetici protilátek nebo při kompetici antigenů. Při přípravě soupravy pro konkrétní stanovení je nutné vybrat vhodnou pevnou fázi, na kterou bude možné antigen (nebo protilátku – v závislosti na stanovované substanci) imobilizovat. Je nutné zvolit blokovací činidlo, které zajistí úplné pokrytí zbylé vazebné plochy pevné fáze, aby byla minimalizována nespecifická reaktivita pozadí.

Nedostatečné množství blokovacího roztoku může způsobit falešně pozitivní signál pozadí, příliš mnoho blokovacího činidla zase brání interakci mezi protilátkou a antigenem. Nejčastěji používanými blokovacími činidly jsou 1 až 5% (w/v) roztok odtučněného práškového mléka nebo čistého proteinu jako je kasein v pufru. Dále je například možné použít odtučněná zvířecí séra nebo želatinu. Optimální formát provedení ELISA experimentu dále závisí na typu použitých protilátek a homogenitě či heterogenitě použitého antigenu.

Pokud je dostupný čistý nebo téměř čistý antigen, přítomnost a množství specifických protilátek lze určit pomocí nepřímého ELISA experimentu, kde jsou specifické protilátky v terciárním komplexu na pozici mezi imobilizovaným antigenem a značenou specifickou protilátkou připravenou proti stanovované protilátce. V takovém provedení je čistý nebo částečně čištěný antigen zachycen k pevné fázi. Testovaný roztok obsahující neznámé množství požadovaných protilátek je ponechán inkubovat s antigenem, aby se na něj hledané specifické protilátky navázaly. Nepřímé ELISA stanovení (viz *Obr. 10*) využívá značené sekundární protilátky pro detekci primárních protilátek.

Tyto sekundární konjugáty jsou komerčně dostupné a mohou být upraveny tak, aby reagovaly výhradně s protilátkami, proti kterým jsou připraveny tak, aby byla minimalizována jejich křížová reaktivita. Toho se dosahuje křížovou adsorpcí. Specifity k primárním protilátkám je dosaženo tím, že sekundární protilátky pochází z jiných živočišných druhů. Jako pevná fáze se používají mikrotitrační destičky, jejichž hydrofobicita a hydrofilita závisí na jejich materiálu, a jejich volba závisí na charakteru imobilizovaného materiálu.

Mezi jednotlivými inkubačními kroky je nutné destičku promývat roztokem detergentu, který minimalizuje nespecifickou vazbu protilátek k antigenu. Po vymytí nenavázaného konjugátu je přidán roztok chromogenního nebo luminiscenčního substrátu, v závislosti na použitém konjugátu. Použité enzymy nesmí být přítomny v biologickém vzorku, který je analyzován.



Obrázek 10: Obecné schéma stanovení množství specifických protilátek pomocí nepřímého typu experimentu ELISA. Antigen (*světle modře*, A) je inkubován a adsorbován na komůrku mikrotitrační destičky. Po promytí inkubace blokovacího činidla (*hnědě*, B). Aplikace a inkubace s analyzovanou protilátkovou frakcí (*tmavě modře*, C). Po promytí aplikace a inkubace se sekundární protilátkou (*zeleně*, D) značenou enzymem (*žlutě*, E). Zahájení detekční reakce přidáním roztoku chromogenního substrátu (*červeně*, F). Zastavení reakce (*bíle*, G). Spektrofotometrické stanovení aktivity specifických protilátek změřením absorbance barevného produktu (H). Převzato a upraveno<sup>86</sup>.

Většinou je využito alkalické fosfatasy z bakterie *E. coli* nebo například peroxidasy z křenu jako detekčních enzymů. Metody ELISA používají různé kombinace enzymů a substrátů. Křenová peroxidasa a její substrát peroxid vodíku, která v přítomnosti chromogenu tetramethylbenzidinu dává po okyselení měřitelný žlutooranžový produkt. Dále  $\beta$ -D-galaktosidasa a její substrát o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, který poskytuje žlutý nitrofenolátový produkt, nebo kombinace alkalické fosfatasy a jejího substrátu p-nitrofenylfosfátu, který je konvertován na nitrofenolát. Zastavujícím činidlem peroxidasové reakce metod ELISA bývá kyselina sírová, která zároveň stabilizuje konečný barevný produkt enzymové reakce. U souprav ELISA s alkalickou fosfatasou se enzymová reakce zastavuje roztokem hydroxidu<sup>86-88</sup>.

## 2. Cíle práce

Cíle mé bakalářské práce byly následující:

1. Izolovat protilátky z vaječných žloutků imunizovaných slepic
2. Charakterizovat protilátky z hlediska jejich reaktivity vůči buněčným stěnám a buňkám *C. albicans* metodou ELISA a CELISA
3. Charakterizovat protilátky z hlediska jejich reaktivity vůči celým buňkám *C. albicans* metodami založenými na centrifugační nebo filtrační separaci buněk

### 3. Materiály a metody

#### 3.1 Použitý materiál

- lyofilizovaný ovalbumin („řidký bílek“) (poskytnuto prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.)
- imunizovaná vejce (poskytnuto Ing. Pavlem Trefilem, DrSc.)
- buněčná stěna a celé buňky *C. albicans* SC5314 (z České sbírky mikroorganismů)

#### **Diagnovum** (Nizozemsko)

- hovězí sérový albumin

#### **Invitrogen** (Spojené státy americké)

- urea

#### **Chemopol** (Česká republika)

- glukosa

#### **Lachema** (Česká republika)

- para-nitrofenylfosfát

#### **Lachner** (Česká republika)

- kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, azid sodný, glycerol, urea, ethanol, uhličitan sodný, hydrogen uhličitan sodný, chlorid hořečnatý, kyselina mléčná, kyselina octová

#### **Penta** (Česká republika)

- hydroxid draselný, hydroxid sodný, hydroxid vápenatý

#### **Serva** (Německo)

- Tween 20

#### **Sigma-Aldrich** (Spojené státy americké)

- sekundární protilátka, králičí konjugát IgG proti slepičím IgY značený alkalickou fosfátasou
- p-nitrofenylfosfát

### **Merck Millipore KGaA (Německo)**

- YPD (10 g/l kvasinkový extrakt, 20 g/l pepton, 20 g/l dextrosa)
- sterilní stříkačkový filtr

### **Roche (Spojené státy americké)**

- koktejl inhibitorů proteas, cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail

### **Whatman (Velká Británie)**

- filtrační papír
- mikrofiltr ze skleněných vláken

## **3.2 Přístroje**

### **Analytické váhy**

- OHAUS Discovery (Švýcarsko)
- Electrical Balance, AND Company (Japonsko)

### **Autokláv**

- Microjet (Velká Británie)

### **Automatické pipety**

- Eppendorf Reference (Německo)
- Eppendorf Reference 2 (Německo)
- Eppendorf Research Plus (Německo)

### **Centrifugy**

- Eppendorf Centrifuge 5418 (Spojené státy americké)
- Janetzki K23 (Německo)
- HERMLE Labortechnik GmbH Z 383 K (Německo)

### **Filtrační aparát**

- MILLIPORE, Swinnex®, SX0002500, Merck (Německo)

### **Laminární box**

- Labox, ISO 9001(Česká republika)

### **Laboratorní rotátor**

- Chemos CZ, LR-03 (Česká republika)

### **Míchačky**

- D-LAB, M-H-S (Francie)
- IKA<sup>®</sup> RH basic, Vitrum (Německo)

### **Mikrotitrační destičky**

- F16 MAXISORP LOOSE, Nunc (Dánsko)
- Corning CellBind Surface (Spojené státy americké)

### **Spektrofotometry**

- Spektromom 195 D (Maďarsko)
- Sunrise Absorbance Reader, Tecan (Švýcarsko)
- METASH V-5000
- SPECORD 250 PLUS, Analytikjena (Německo)

### **pH-metr**

- pH/ORP metr HI 2211, Hanna Instruments (Spojené státy americké)

### **Předvážky**

- KERN EMS (Německo)

### **Třepačky**

- Yellow line OS 2 basic (Německo)
- Schoeller, Infors HT Multitron Pro (Švýcarsko)

### **Vortexer**

- Maxi Mix II, Thermoline (Spojené státy americké)

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Příprava VSF média

Nejprve byla příslušná množství chemických individuí kromě hovězího albuminu a mléčné kyseliny (viz *Tab. 1*) odvážena a rozpuštěna ve 150 ml destilované vody. Hodnota pH takto vzniklé směsi byla upravena na 4,2 pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl sterilizován pomocí autoklávu (Microjet) po dobu 30 minut.

Dále bylo odváženo dané množství hovězího albuminu a mléčné kyseliny (viz *Tab. 1*) a rozpuštěno ve 3 ml destilované vody. Následně bylo v laminárním boxu (Labox, ISO 9001) přes sterilní stříkačkový mikrofiltr (0,44  $\mu\text{m}$ ) pomocí stříkačky přeneseno rozpuštěné množství hovězího albuminu a mléčné kyseliny (viz *Tab. 1*) ke zbytku média do Erlenmeyerovy baňky.

*Tabulka 1:* Složení VSF média

složka	koncentrace [g/l]
chlorid sodný	3,51
hydroxid draselný	1,40
hydroxid vápenatý	0,22
glycerol	0,16
octová kyselina	1,00
močovina	0,40
glukosa	5,00
hovězí albumin	0,018
mléčná kyselina	2,00

### 3.3.2 Kultivace kvasinek

Pomocí pinzety sterilizované plamenem a párátko bylo v laminárním boxu přeneseno malé množství kvasinek *C. albicans* (vypěstovaných laboratoří paní docentky Heidingsfeld na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy) do média, a tím byla zahájena vždy čtyřdenní až šestidenní kultivace na třepačce (Schoeller, Infors HT Multitron Pro) při 37 °C a 180 RPM.

Při vlnové délce 600 nm byla na spektrofotometru (METASH V-5000) změřena absorbance neboli optická hustota suspenze. Poté byla vždy tato suspenze buněk centrifugována (HERMLE Labortechnik GmbH Z 383 K, výkyvný rotor 4× 250 ml) po dobu 15 minut při 5000 RPM při 5 °C. Postupným odléváním supernatantu zbyl z celého objemu původní suspenze buněk sediment, který byl vždy resuspendován v nadbytku 500 µl 0,1% (w/v) roztoku azidu v pufru PBS. Z takto vzniklé suspenze byl pokaždé ještě odebrán alikvot 10 µl a zředěn 10 ml PBS s azidem proto, aby bylo možné suspenzi charakterizovat hodnotou optické hustoty.

### 3.3.3 Imunizace slepice buněčnou stěnou a celými buňkami kvasinky *Candida albicans*

Nejprve byla izolována buněčná stěna a hrubá plazmatická membrána *C. albicans* analogicky podle protokolu z bakalářské práce Bc. Lucie Konečné<sup>89</sup> s pozměněnými centrifugačními podmínkami. Dezintegrováný materiál buněk *C. albicans* poskytnutý doc. RNDr. Olgou Heidingsfeld, CSc. byl centrifugován po dobu 10 minut s chlazením na 5 °C při 9000 RPM po dobu 20 minut (HERMLE Labortechnik GmbH Z 383 K, výkyvný rotor 4× 250 ml). Supernatant byl odstraněn pipetou. Sediment byl promýván pomocí roztoků chloridu sodného a jak sediment, tak roztoky byly uchovávány v chladu. Po přidání příslušného roztoku byla směs vždy nejprve vortexována do úplného rozpuštění sedimentu. Následně byla směs vždy centrifugována za stejných podmínek po dobu 5 minut za stejných podmínek. Proces byl opakován vždy pětkrát s 5%, 2% a 1% roztokem chloridu sodného.

Imunizace slepic (kur domácí white Leghorn) byly provedeny Ing. Pavlem Trefilem. Slepice A byla imunizována buněčnou stěnou kvasinek vypěstovaných na VSF mediu a slepice B celými buňkami *C. albicans* vypěstovaných na VSF médiu. Slepice byly imunizovány celkem třemi dávkami příslušného antigenu vždy ve stejný den, a to 18.8., 29.8. a 13.9. roku 2023. Pro imunizaci bylo použito jen nekompletní Freundovo adjuvans. Mísilo se vždy 0,25 ml vzorku (s obsahem antigenu) s 0,25 ml adjuvans a 0,5 ml této směsi bylo injikováno na více míst, bližší detaily imunizace nebylo možné zjistit.



### 3.3.4 Izolace polyklonálních protilátek ze slepičích vajec

Bylo postupováno podle publikovaného protokolu pana prof. RNDr. Petra Hodka, CSc<sup>12</sup>.

Použitým roztokem byl pufr PBS s azidem (0,1M NaCl, 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub>, pH 7,2).

V této studii bylo použito celkem 9 kusů slepičích preimunních vajec (viz *Tab. 2*, str. 50). Pomocí plastového separátoru byly odděleny žloutky od bílků a současně pomocí mírného proudu studené vody byly odseparované žloutky očištěny od zbytku bílku a cheláz, žloutky byly postupně přes plastovou nálevku přenášeny do plastového odměrného válce. Podle zjištěného objemu žloutků byl dopočítán objem kohoutkové vody, kterým byly žloutky ředěny tak, aby byly právě osmkrát naředěny.

Po naředění bylo pH upraveno pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové z hodnoty 6,5 na hodnotu 5,0. Suspenze žloutků byla následně v konické nádobě přes noc ponechána zamrznout při -20 °C. Následně byla sestavena filtrační aparatura sestávající z drátěného konického propustného límce, do něj vystřiženého filtračního papíru a pod něj postavené plastové odměrné nádoby pro jímání filtrátu.

Zmražená suspenze byla pomocí horké vody dopadající na konickou nádobu z vnější strany vyproštěna z konické nádoby a opatrně vložena do filtrační aparatury tak, aby nedošlo k protržení filtračního papíru, a byla v něm ponechána do druhého dne volně rozmrazat. Po získání bezbarvého filtrátu byl zjištěn jeho objem a byla vypočtena hmotnost soli (chloridu sodného), která byla přidána do filtrátu, aby vznikl 8,76% (w/v) roztok soli. Po úplném rozpuštění soli bylo upraveno pH roztoku pomocí 0,5M kyseliny chlorovodíkové z hodnoty 5,0 na hodnotu 4,0.

Srážení IgY probíhalo do druhého dne za laboratorní teploty. Vzniklý precipitát byl nejprve rozmíchán na magnetické míchačce a následně byla suspenze rovnoměrně rozdělena do centrifugačních kyvet. Byla provedena centrifugace (HERMLE Labortechnik GmbH Z 383 K, výkyvný rotor 4× 250 ml) s chlazením na 5 °C při 9000 RPM po dobu 20 minut.

Po odstranění supernatantu bylo k získanému sedimentu do každé centrifugační kyvety přidáno 7,5 ml pufru izolačního PBS s azidem. Kyvety byly umístěny na třepačku (Yellow line OS 2 basic) a pro rychlejší rozpuštění sedimentu bylo postupně do každé kyvety přidáno 100 µl 1M hydroxidu sodného. Takto připravené roztoky izolované protilátky z kontrolní frakce byly spojeny, označeny KA a uloženy do lednice. Dále byla vybrána vejce pro dvě specifické frakce od téže slepice A (viz *Tab. 3*). Připravené specifické frakce byly označeny SPA1 a SPA2 a uschovány při 5 °C v lednici. Slepice B ze stejného období nesnesla žádná vejce, proto byla z experimentu vyřazena.

*Tabulka 2: Data snesení kontrolních vajec před imunizací v roce 2023*

kontrolní frakce slepice A	kontrolní frakce slepice B
14.8.	10.8.
15.8.	12.8.
16.8.	13.8.
17.8.	15.8.
-	17.8.

*Tabulka 3: Data snesení vajec po imunizaci v roce 2023*

specifická frakce č. 1 od slepice A	specifická frakce č. 2 od slepice A
21.9.	15.10.
22.9.	16.10.
23.9.	18.10.
24.9.	20.10.
25.9.	22.10.
26.9.	23.10.

*Specifická frakce č.1 (SPA1) byla vybrána týden od poslední (třetí) imunizační dávky, u které byl očekáván vyšší obsah specifických protilátek než u následné specifické frakce č.2 (SPA2)<sup>90</sup>.*

### 3.3.5 Fotometrické měření hmotnostní koncentrace izolovaných polyklonálních protilátek

Před měřením byly alikvoty (300  $\mu$ l) zásobních roztoků izolovaných protilátek z každé frakce centrifugovány (Eppendorf 5418, úhlový rotor 18 $\times$  2 ml) při 12523 RPM po dobu 3 minut. Spektrofotometr (Spektromom 195 D) byl vynulován při 280 nm na slepý vzorek, kterým bylo 2,5 ml pufru izolačního PBS s azidem v křemenné kyvetě (optická dráha 1 cm). K těmto 2,5 ml bylo přidáno 50  $\mu$ l supernatantu frakce protilátek a vždy třikrát změřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Průměry absorbancí byly použity pro výpočet hmotnostní koncentrace protilátek v jednotkách [mg/ml] podle vzorce:

$$c_g = A_{280 \text{ nm}} (\text{průměr}) \cdot \text{ředění} \cdot 1,094 \quad (1)$$

kde  $c_g$  je hmotnostní koncentrace,  $A_{280 \text{ nm}}$  absorbance při vlnové délce 280 nm a ředění (2500  $\mu$ l/50  $\mu$ l) = 51krát a číselná hodnota 1,094 je experimentálně zjištěný faktor<sup>12</sup>.

### 3.3.6 ELISA

Imunoreaktivita protilátek vůči buněčné stěně kvasinek *C. albicans* kultivovaných na VSF médiu byla měřena pomocí ELISA metody s příslušnými roztoky (viz Tab. 4) podle protokolu Bc. Matúše Vodeckého<sup>90</sup>. Jako antigen byl použit zásobní preparát suspenze buněčné stěny, který po naředění 12,5krát vykazoval při vlnové délce 280 nm absorbanci 0,68.

Tabulka 4: Použité roztoky při ELISA a CELISA experimentech.

složení roztoku	označení roztoku
13,4mM NaCl, 1,8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2	PBS ELISA
0,1% (v/v) roztok Tweenu v PBS ELISA	promývací roztok
2% (w/v) roztok „řídkeho bílku“ v promývacím roztoku	blokovací roztok
13 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 25 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,6	imobilizační pufr
1,1 ml 0,2M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1,4 ml 0,2M NaHCO <sub>3</sub> , 10 $\mu$ l 1M MgCl <sub>2</sub> , 7,5 ml destilované H <sub>2</sub> O, 10 mg p-nitrofenylfosfátu	vyvolávací roztok

Suspenze antigenu pro aplikaci do jamek mikrotitrační destičky MaxiSorp byla připravena z 12,5krát naředěné suspenze buněčné dalším ředěním, kdy 100  $\mu$ l bylo aplikováno do 10 ml imobilizačního pufru.

Po aplikaci 100  $\mu\text{l}$  roztoku antigenu proběhla inkubace po dobu 17 hodin při teplotě 4 °C ve vlhké komůrce. Následně byl přítomný roztok antigenu z destičky odstraněn švihem a bylo provedeno promývání komůrek trojnásobnou aplikací 220  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku. Po každé aplikaci byl obsah komůrek vždy švihem vylit z destičky a následně byl ještě zbylý obsah vyklepnut proti filtračnímu papíru, aby došlo k odstranění posledních zbytků tekutiny. Blokovací roztok byl připraven filtrací rozpuštěného „řidkého bílku“ v 0,1% (v/v) roztoku Tweenu v PBS ELISA a posléze byl aplikován do všech komůrek po 150  $\mu\text{l}$  a v nich ponechán ve vlhké komůrce po dobu 1 hodiny při 37 °C.

Poté byl opět roztok odstraněn vyklepnutím a komůrky byly trojnásobně promyty promývacím roztokem. Postupným ředěním vycházejícím z hmotnostní koncentrace 1 mg/ml byly zásobní roztoky izolovaných protilátek naředěny na koncentrace 90, 30, 10 a 3,3  $\mu\text{g/ml}$  a byly aplikovány v duplikátech vždy do dvou sousedních jamek stejným způsobem v objemu 100  $\mu\text{l}$ . Destička byla inkubována ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 2 hodin. Pak následovalo trojnásobné mytí a ředění konjugátu králičí protilátky izotypu IgY s alkalickou fosfatase pomocí pufru PBS ELISA v poměru 1 : 1500.

Tento roztok sekundární protilátky byl vzápětí aplikován v objemu 100  $\mu\text{l}$  do každé jamky a destička byla inkubována po dobu 1 hodiny ve vlhké komůrce při 37 °C. Jamky byly opět třikrát promyty. Následovala aplikace vyvolávacího roztoku do všech jamek v objemu 100  $\mu\text{l}$ . Po 10 minutách byla reakce zastavena přidáním 3M hydroxidu sodného do všech jamek v objemu 100  $\mu\text{l}$ . Při vlnové délce 405 nm byla měřena absorbance (Sunrise Absorbance Reader, Tecan) a hodnoty duplikátů byly jako průměry vyneseny do grafů.

### 3.3.7 CELISA

Experiment CELISA byl proveden analogicky jako ELISA s tou změnou, že antigenem nebyla buněčná stěna, ale celé buňky, které bylo třeba nejprve imobilizovat podle protokolu z práce Bc. Matúše Vodeckého<sup>90</sup>. V předkládané práci byly použity buňky *C. albicans* kultivované ve VSF médiu. Buňky byly před nanesením na destičku Maxisorp resuspendovány v médiu YPD (z angl. „yeast extract peptone dextrose“) na optickou hustotu 0,25 a inkubovány za laboratorní teploty 2 hodiny.

Cílem bylo napomoci adhezi buněk k danému povrchu mikrotitrační destičky. Aplikovaný objem do každé jamky činil 100  $\mu$ l. Následně byl do jamek aplikován 96% ethanol v objemu 100  $\mu$ l, který byl společně s antigeny inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl obsah ze všech jamek odstraněn. Dále byl do každé jamky aplikován 96 % ethanol v objemu 100  $\mu$ l. Po 20 minutách byl ethanol odstraněn a destička ponechána přes noc při laboratorní teplotě, aby došlo k vysušení jamek a efektivnímu přilnutí antigenu k materiálu destičky.

Další postup provedení CELISA probíhal dle protokolu k experimentu ELISA (Kapitola 3.3.8), ovšem s obměnou v ředění, kdy byly použity protilátky jen ve dvou koncentracích 90 a 30  $\mu$ g/ml, a vše v triplicátech. Dále bylo oproti ELISA experimentu při testování imunoreaktivity protilátek využito jejich vysycení buňkami *C. albicans*. S ohledem na denaturační vlastnosti ethanolu a možné omezení vazby specifických protilátek k jejich antigenům byl postup dále obměněn výměnou ethanolu za tabletu cComplete™ „Protease Inhibitor Cocktail“ od firmy Roche (1 tableta na 50 ml roztoku) pro inhibici aspartátových proteas.

### 3.3.8 Další techniky imunochemická detekce specifických protilátek

#### *Centrifugační provedení*

Nejprve byly tři skleněné zkumavky naplněny 1,6 ml suspenze buněk *C. albicans* vypěstovaných v živném médiu VSF o optické hustotě 0,401 a centrifugovány při 5000 RPM, 5 °C a po dobu 10 minut (HERMLE Labortechnik GmbH Z 383 K, výkyvný rotor 4× 250 ml). Sedimenty byly resuspendovány v 900  $\mu$ l izolačního pufru PBS (viz Tab. 5) a za stejných podmínek centrifugací buňky promyty od média. Následně byl sediment v každé zkumavce resuspendován ve 2 ml 2% roztoku řídkého bílku v 0,1% roztoku Tweenu v pufru PBS ELISA (viz Tab. 5) a ponechán přes noc při 5 °C míchat na laboratorním rotátoru (Chemos CZ, LR-03). Následně byla provedena centrifugace za výše uvedených podmínek. Po oddělení supernatantu byl sediment v každé ze tří zkumavek resuspendován v 1 ml roztoku izolovaných slepičích protilátek (preimunních KA a specifických SPA1 a SPA2) naředěných na koncentraci 90  $\mu$ g/ml v 0,1% (v/v) roztoku Tweenu v PBS s azidem a tabletou cComplete™ „Protease Inhibitor Cocktail“ od firmy Roche (1 tableta na 50 ml roztoku).

Tabulka 5: Použité roztoky.

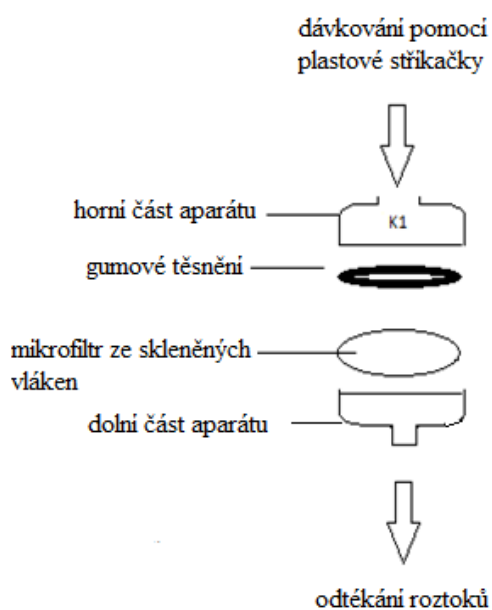
složení roztoku	označení roztoku
13,4 mM NaCl, 1,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS ELISA
0,1% (v/v) roztok Tweenu v PBS ELISA	promývací roztok
0,1M NaCl, 1,8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , pH 7,2	izolační PBS = PBS s azidem
roztok značené králičí protilátky proti slepičím ředěn izolačním PBS v poměru 1 : 1000	ředěno izolačním PBS v poměru 1 : 1000
1,1 ml 0,2M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1,4 ml 0,2M NaHCO <sub>3</sub> , 10 µl 1M MgCl <sub>2</sub> , 7,5 ml destilované H <sub>2</sub> O, 10 mg p-nitrofenylfosfátu	vyvolávací roztok

Vzniklá suspenze byla míchána přes noc na laboratorním rotátoru (Chemos CZ, LR-03) při 5 °C. Následovalo dvojnásobné promytí od nezachycené primární protilátky vždy centrifugací za výše uvedených podmínek pomocí přídatku 2 ml izolačního 0,1% roztoku Tweenu v PBS pufru (viz Tab. 5). Po dvojnásobném mytí byly sedimenty resuspendovány v roztoku králičí sekundární protilátky IgY a ponechány na laboratorním rotátoru (Chemos CZ, LR-03). Následovalo dvojnásobné promytí buněk centrifugací za výše uvedených podmínek pomocí 0,1% roztoku Tweenu v PBS ELISA.

Dále, než byl zahájen totožný centrifugační krok, byl z resuspendovaného sedimentu z každé frakce odebrán 1 ml materiálu do příslušných 1,5ml mikrozkušavek. Obsah mikrozkušavek byl centrifugován při 12523 RPM po dobu 10 minut (Eppendorf 5418, úhlový rotor 18× 2 ml). Sedimenty byly resuspendovány ve 150 µl vyvolávacího roztoku (viz Tab. 5). Po uplynutí 10 minut vyvolávání byla reakce zastavena přidáním 150 µl 3M hydroxidu sodného. Následovalo protřepání a centrifugace (Eppendorf 5418, úhlový rotor 18× 2 ml) při 12523 RPM po dobu 10 minut. Míra zabarvení byla fotometricky vyhodnocena na spektrofotometru při vlnové délce 405 nm (Sunrise Absorbance Reader, Tecan).

### Filtrační provedení

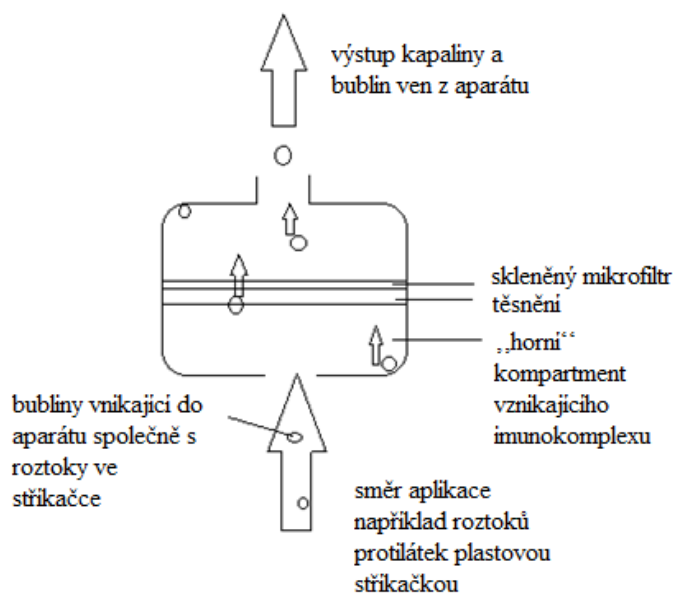
Nejprve bylo před začátkem experimentu ověřeno, že se buňky kvasinek zachytávají na použitém filtru (GF filtr, Whatman) tím, že po přefiltrování zakalené suspenze buněk byl obdržen čirý filtrát. Dále byl stanoven vnitřní objem aparátu (Swinnex<sup>®</sup>, SX0002500), tedy objem vnesené kapaliny, který právě naplní celý prostor aparátu (viz *Obr. 11*).



*Obrázek 11:* Schéma složení filtrační aparatury a směr proudění kapaliny.

Pomocí destilované vody a stříkačky bylo zjištěno, že tento objem činí 1,8 ml. K provedení experimentu bylo připraveno pět roztoků o složení uvedeném v *Tabulce 5* (str. 54). Zásobní suspenze buněk *C. albicans* (optická hustota při vlnové délce 600 nm činila 0,182) byla naředěna tak, že 150  $\mu$ l rozmražené suspenze buněk bylo smíseno s 11 ml izolačního pufru PBS s azidem.

Do dvou filtračních aparátů byly vloženy filtry ze skleněných vláken a pomocí 5ml plastové stříkačky bylo do každé aparatury vneseno 5 ml z naředěné suspenze buněk ve směru zespoda nahoru (viz *Obr. 12*), aby došlo k vytlačení případných bublin, které by způsobily nerovnoměrnou distribuci materiálu na ploše kruhového filtru.



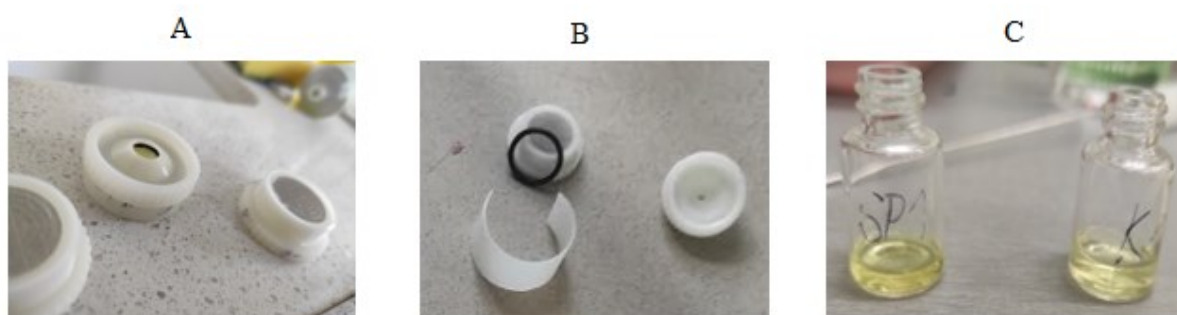
Obrázek 12: Způsob dávkování za účelem odstranění nežádoucích bublin pro každý roztok kromě promývacího.

Následně byla provedena centrifugace na centrifuze (typu Janetzki K23, výkyvný rotor 4× 70 ml), kterou byla odstraněna kapalina po aplikaci vzorku po dobu 20 sekund při 3000 RPM. Kapalina byla jímána do kyvety, v níž byl filtrační aparát umístěn. Dále byly dávkovány 2 ml blokovacího roztoku do obou aparátů a aparatura byla po uzavření zátkami ponechána inkubovat po dobu 30 minut tak, aby obsah zachycený na filtru zůstal ve stabilní poloze, tj. nad filtrem. Během 30minutové inkubace s blokovacím roztokem byly připraveny roztoky protilátek SPA1 a KA o hmotnostní koncentraci 10 µg/ml a objemu 3 ml.

Po aplikaci protilátek byly oba aparáty z obou stran uzavřeny a ponechány 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Po inkubaci primárních protilátek byla provedena centrifugace se stejnými parametry. Následně bylo provedeno promytí aparatury pomocí 10 ml promývacího roztoku pomocí stříkačky, pozvolna během 1 minuty tak, že do naplnění vnitřního objemu byl aparát držen nad úrovní stříkačky, aby byl umožněn únik bublin. Byla provedena opětová centrifugace se stejnými parametry. Promytí aparatury bylo ještě jednou opakováno. Roztok sekundární protilátky byl aplikován po 2 ml do každého aparátu a aparatury byly ponechány inkubovat přes noc při 5 °C.



Následovalo promytí 10 ml pro každý aparát a byla provedena centrifugace se stejnými parametry. Byl připraven vyvolávací roztok o stejném složení jako v provedení ELISA experimentu (oddíl 3.3.8), který byl aplikován po 2 ml do každého aparátu. Po deseti minutách průběhu reakce byl pomocí centrifugace vyvolávací roztok oddělen a jímán do malých lahviček vložených do centrifugačních vložek. Získaný žlutě zabarvený filtrát (viz Obr. 13) byl z obou aparátů v objemu 100  $\mu$ l přenesen do jamek mikrotitrační destičky, bylo přidáno 100  $\mu$ l 3M hydroxidu sodného a změřena absorbance při 405 nm (Sunrise Absorbance Reader, Tecan).



Obrázek 13: Fotografie aparatury s mikrofiltrem uvnitř (A), s černým gumovým těsněním a plastovou vložkou do centrifugační kyvety (B), barevný produkt z aparátu pro specifickou a kontrolní frakci (C).

V případě hodnot vyšších než 3 byl roztok před měřením 10krát zředěn. Pro vyloučení interference možnou přítomností aktivity alkalické fosfatasy asociované s buňkami *C. albicans* byl výše uvedený postup proveden bez přítomnosti primární a sekundární protilátky pouze s buňkami kvasinek. Obdobně s vyloučením primární protilátky byla sledována nespecifická vazba sekundární protilátky na buňky kvasinek. Též bylo sledováno, zda samotný skleněný filtr nezpůsobuje defosforylaci chromogenního substrátu. Následně byl způsob aplikace roztoků (viz Obr. 12, str. 56) pozměněn. Obměna spočívala ve zvětšení průměru horního otvoru aparátu z 0,4 cm na 0,8 cm (viz Obr. 13 A). Dávkování roztoků bylo zpomaleno na dobu 1 minuty, a to pouze způsobem aplikace stříkačkou po kapkách. To mělo zabránit vzniku bublin a též zajistit šetrnější zacházení s aparátem vzhledem k zachycenému retenátu (*C. albicans*) a vznikajícímu imunokomplexu na téže straně mikrofiltru.

## 4. Výsledky

### 4.1 Izolace a charakterizace protilátek

Slepice A byla imunizována třemi dávkami buněčné stěny *C. albicans*, slepice B třemi dávkami buněk *C. albicans* kultivované na VSF médiu.

Tabulka 6: Hodnoty absorbancí při vlnové délce 280 nm pro výpočet hmotnostní koncentrace izolovaných protilátek.

frakce	počty vajec	$A_{280\text{ nm}}$ 1.měření	$A_{280\text{ nm}}$ 2.měření	$A_{280\text{ nm}}$ 3.měření	průměr $A_{280\text{ nm}}$	$c_g$ [mg/ml]
SPA1	6	0,699	0,696	0,665	0,6867	38,31
SPA2	6	0,770	0,778	0,744	0,7640	42,63
KA	9	0,758	0,735	0,739	0,7440	41,51

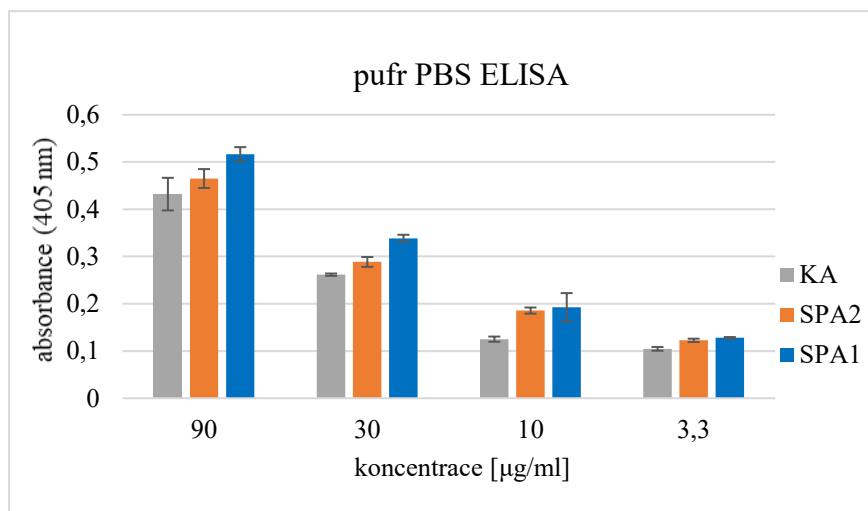
KA označuje směšnou frakci připravenou ze 4 preimunních vajec od slepice A snesených 14.8., 15.8., 16.8., 17.8. a 5 preimunních vajec od slepice B snesených 10.8., 12.8., 13.8., 15.8. a 17.8. roku 2023. SPA1 označuje první specifickou frakci, SPA2 označuje druhou specifickou frakci od slepice A. Absorbance při vlnové délce 280 nm odpovídají 51krát naředěným zásobním roztokům izolovaných IgY.

### 4.2 Imunoreaktivita protilátek

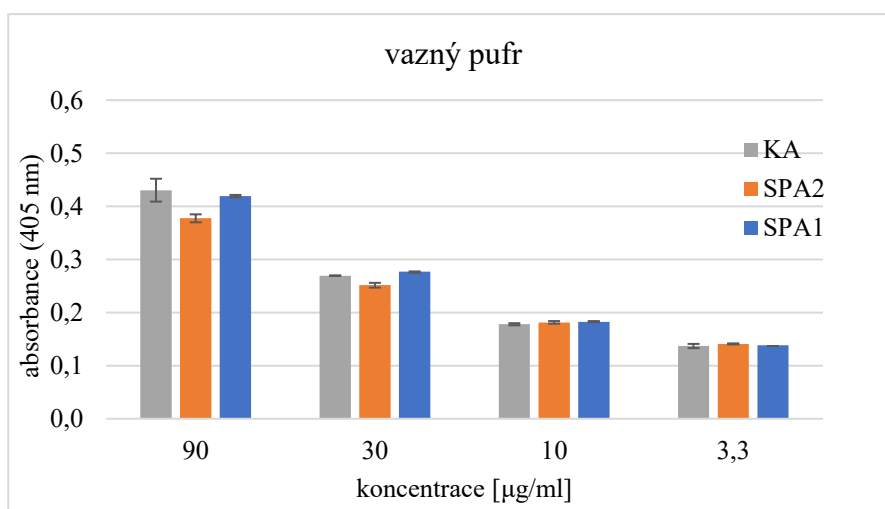
V návaznosti na práci Bc. Matúše Vodeckého<sup>90</sup> byl experiment ELISA použit pro následující experimenty, kde bylo snahou najít významný rozdíl mezi specifickou a kontrolní frakcí pro důkaz specifických protilátek.

#### 4.2.1 ELISA

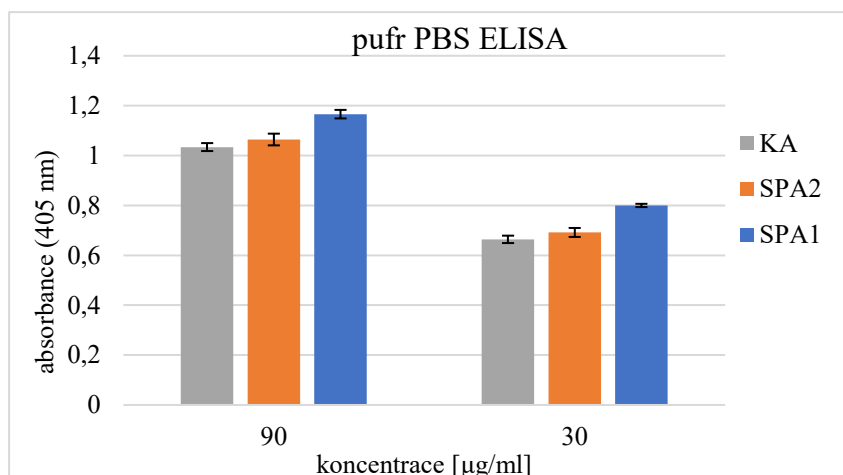
Na Obrázku 14, 15 a 16 jsou výsledky metody ELISA, kdy byl testován vliv pufrů na vazbu antigenu (buněčnou stěnu) na jamky mikrotitrační destičky. Porovnával se vazný pufr a pufr PBS ELISA.



Obrázek 14: Vliv vazby antigenů buněčné stěny v prostředí pufru PBS ELISA na imunoreaktivitu protilátek vůči *C. albicans* v ELISA experimentu. Specifické frakce (od slepice A) SPA1, SPA2 a preimunní frakce KA (kontrola) byly testovány v ředění 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.



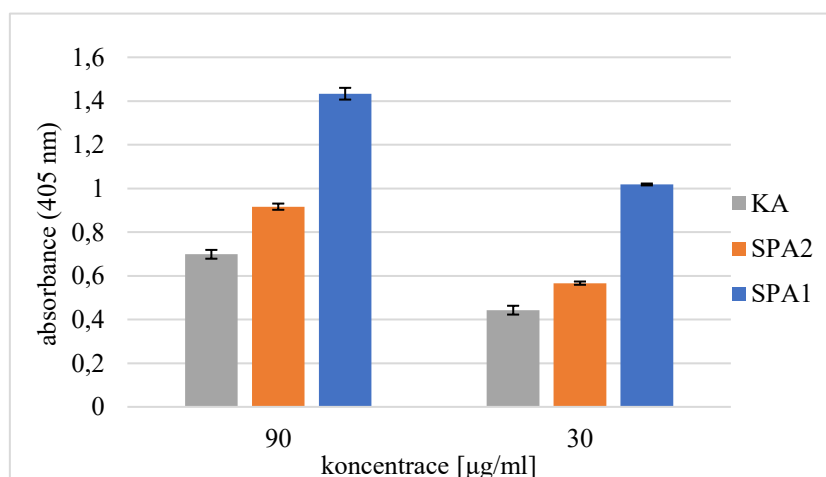
Obrázek 15: Vliv vazby antigenů buněčné stěny v prostředí vazného pufru na imunoreaktivitu protilátek vůči *C. albicans* v ELISA experimentu. Specifické frakce (od slepice A) SPA1, SPA2 a preimunní frakce KA (kontrola) byly testovány v ředění 90, 30, 10 a 3,3 µg/ml. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.



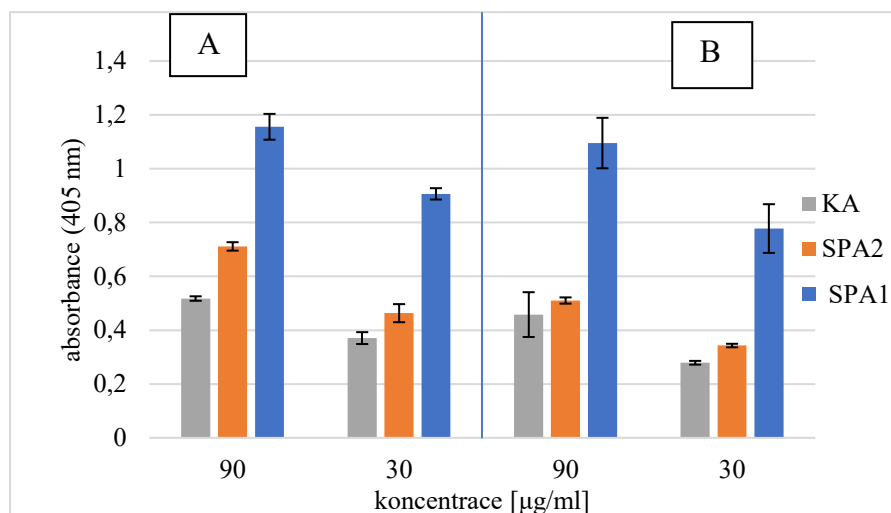
Obrázek 16: Vliv vazby antigenů buněčné stěny v prostředí pufru PBS ELISA na imunoreaktivitu protilátek vůči *C. albicans* v ELISA. Specifické frakce (od slepice A) SPA1, SPA2 a preimunní frakce KA (kontrola) byly testovány v ředění 90 a 30 µg/ml. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.

#### 4.2.2 CELISA

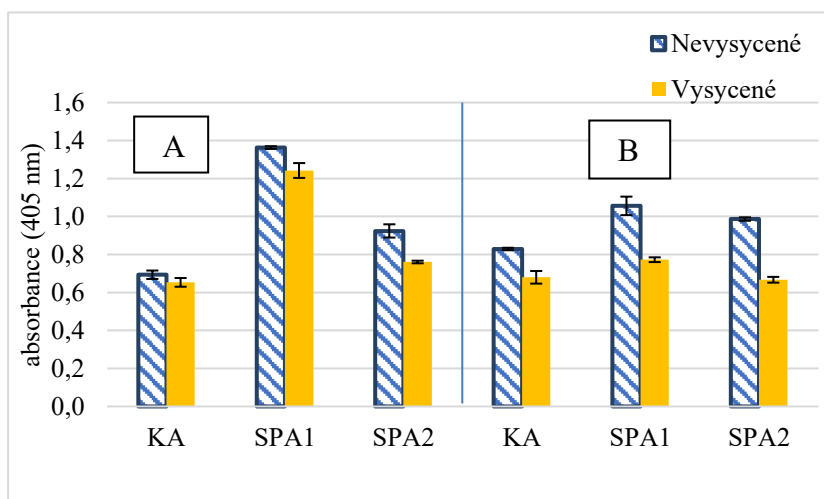
Na Obrázku 17, 18 a 19 jsou výsledky z experimentu CELISA, kde byly použity celé buňky *C. albicans* jako antigenní struktury na rozdíl od buněčných stěn *C. albicans* v případě ELISA experimentů. Imunoreaktivita protilátek byla dále testována pomocí vysycení protilátek buněčnou stěnou (viz Obr. 18) a celými buňkami (viz Obr. 19).



Obrázek 17: Imunoreaktivita protilátek vůči buňkám *C. albicans* v provedení CELISA. Preimunní frakce KA (kontrola) a specifické frakce (od slepice A) SPA1, SPA2 byly testovány na specifickou reaktivitu s použitým ředěním 90 a 30 µg/ml. Jako antigen byly použity ethanolem imobilizované buňky *C. albicans* kultivované ve VSF médiu a následně inkubované v YPD médiu. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.



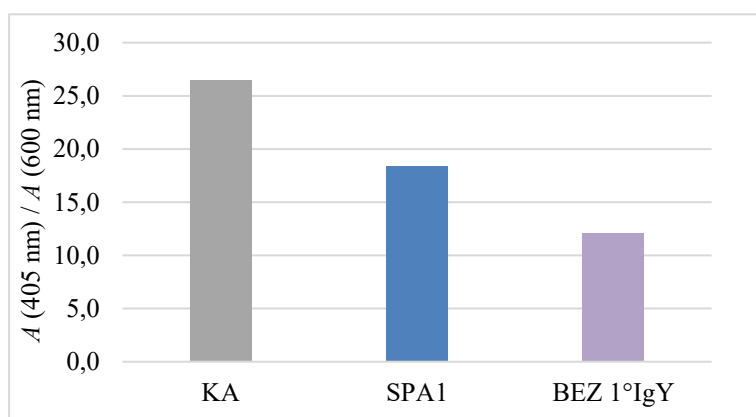
Obrázek 18: Vliv vysycení protilátek buňkami *C. albicans* na jejich imunoreaktivitu v provedení CELISA. Byla porovnáována vazba preimunní frakce KA (kontrola) a specifických frakcí (od slepice A) SPA1, SPA2 v ředění 90 a 30 µg/ml bez ovlivnění (A) a po preinkubaci (B) s buňkami *C. albicans* (po vysycení). Jako antigen byly použity ethanolem imobilizované buňky *C. albicans* kultivované ve VSF médiu a následně inkubované v YPD médiu. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.



Obrázek 19: Vliv vysycení protilátek buňkami *C. albicans* na jejich imunoreaktivitu v provedení CELISA. Byla porovnáována vazba preimunní frakce KA (kontrola) a specifických frakcí (od slepice A) SPA1, SPA2 v ředění 90 a 30 µg/ml bez ovlivnění (šrafované) a po preinkubaci (žlutě) s buňkami *C. albicans* (po vysycení). Jako antigen byla použita buněčná stěna *C. albicans* kultivované ve VSF médiu a inkubované v pufru PBS ELISA (B) a ethanolem imobilizované buňky *C. albicans* kultivované ve VSF médiu a následně inkubované v YPD médiu (A). Protilátky byly vysyceny ředěním PBS ELISA s azidem s tabletou Complete. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí hodnot.

### 4.2.3 Centrifugační postup

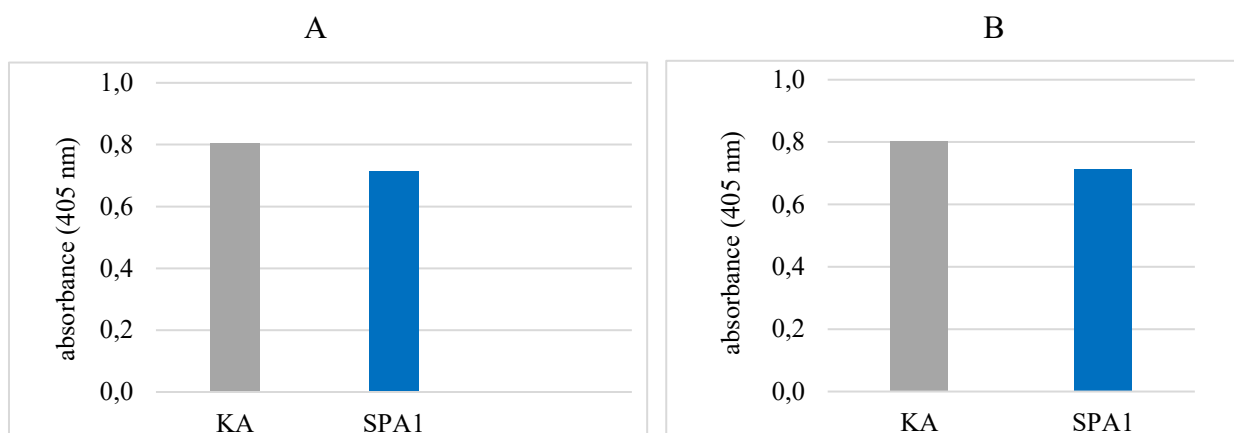
Na *Obrázku 20* jsou výsledky z centrifugačního postupu, kde byla testována imunoreaktivita protilátek vůči buňkám *C. albicans* kultivovaným na VSF médiu. Buňky *C. albicans* byly zachyceny ve skleněných tubách pomocí sedimentace a nebyly na rozdíl od předchozích experimentů chemicky ovlivněny.



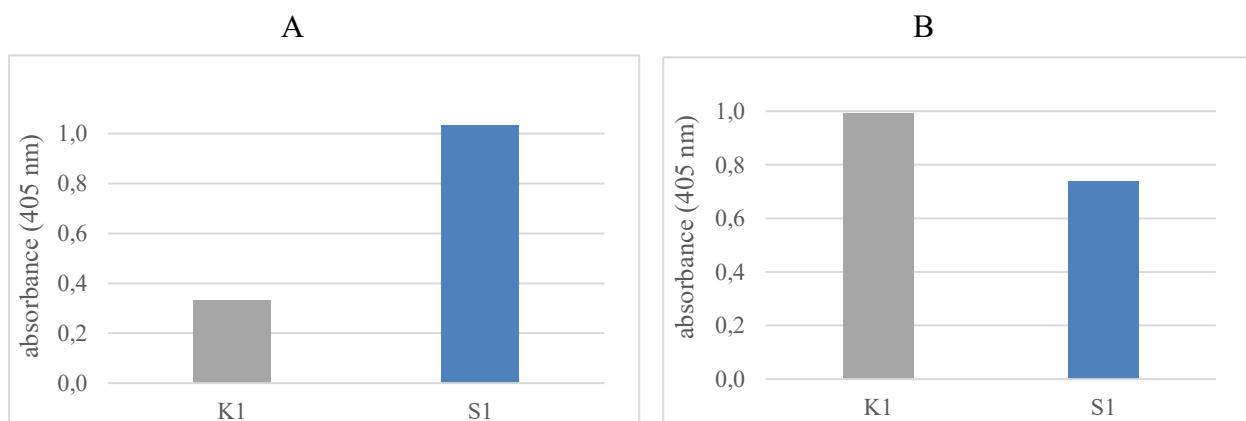
*Obrázek 20:* Imunoreaktivita protilátek vůči buňkám *C. albicans* v sedimentačním provedení ve skleněných tubách. Byla porovnávána vazba preimunní frakce KA (kontrola) a specifické frakce SPA1 v ředění 90  $\mu\text{g/ml}$  s buňkami *C. albicans* kultivovanými ve VSF médiu. Současně byl během experimentu testován vzorek bez primární protilátky (BEZ 1°IgY). Před přidavkem vyvolávacího roztoku byla spektrofotometricky změřena optická hustota vzorků o objemu 1,5 ml při vlnové délce 600 nm. Po ukončení experimentu byla změřena optická hustota vzorků o objemu 0,2 ml při vlnové délce 405 nm. Podíl získaných hodnot optických hustot byl vynesena na osu závisle proměnné s ohledem na možné ztráty materiálu při centrifugačních krocích. *A* značí absorbanci.

### 4.2.4 Filtrační protokol

Výsledky z centrifugačního protokolu vedly na přechod k filtračnímu provedení imunodetekce specifické reaktivity protilátek, kde byla testována imunoreaktivita frakce KA (kontroly) a specifické frakce SPA1 (viz *Obr. 21*). Dále byla touto metodou ve stejném provedení testována imunoreaktivita protilátek izolovaných Bc. Matúšem Vodeckým<sup>90</sup> (viz *Obr. 22*).



Obrázek 21: Imunoreaktivita protilátek vůči buňkám *C. albicans* ve filtračním provedení. Preimunní frakce KA (kontrola) a specifické frakce (od slepice A) SPA1 byly testovány na specifickou reaktivitu s použitým ředěním 10 µg/ml (A) a následně ve stejném provedení (B). Jako antigeny byly použity zachycené buňky *C. albicans* kultivované ve VSF médiu na skleněném mikrofiltru.



Obrázek 22: Imunoreaktivita protilátek vůči buňkám *C. albicans* ve filtračním provedení. Preimunní frakce K1 (kontrola) a specifická frakce S1 od slepice imunizované buňkami *C. albicans* kultivovanými na VSF médiu byly připraveny Bc. Matúšem Vodeckým<sup>90</sup>. Frakce S1 a K1 byly testovány na specifickou reaktivitu v ředění 10 µg/ml (A) a dále ve stejném provedení (B).

## 5. Diskuze

Pasivní imunizace specifickými protilátkami z vajec imunizovaných slepic se nabízí jako optimální nástroj pro imunoterapii kvasinkových infekcí, jejichž hlavním původcem je *C. albicans*. Takový postup je v souladu s etickými a ekonomickými nároky na produkci protilátek imunizovanými zvířaty<sup>75</sup>. V předkládané bakalářské práci bylo v návaznosti na práci Bc. Lucie Konečné a Bc. Matúše Vodeckého snahou nalézt metodu, kterou by bylo možné detekovat specifické protilátky izotypu IgY, homologu lidského IgG. Složení média pro kultivaci *C. albicans* bylo zvoleno tak, aby simulovalo prostředí ženské vagíny, kde se *C. albicans* běžně jako součást mikrobioty vyskytuje a způsobuje za určitých okolností kandidózy<sup>91</sup>.

Z vypěstovaných buněk byly izolovány buněčné stěny *C. albicans* podle protokolu Bc. Lucie Konečné<sup>89</sup>. Imunizace slepic A a B byla na rozdíl od bakalářské práce Bc. Matúše Vodeckého provedena bez přídavku mykobakterií.<sup>90</sup> Další odlišností od předchozích bakalářských prací byl fakt, že slepice B po imunizaci celými buňkami *C. albicans* přestala vejce snášet ve srovnání s prací Bc. Lucie Konečné a Bc. Matúše Vodeckého, kde nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky u imunizovaných slepic<sup>89,90</sup>.

Imunoreaktivita izolovaných protilátek byla nejprve testována metodou ELISA (viz Obr. 14), kde však nebyla zaznamenána změna v trendu poklesu koncentrace specifických protilátek v čase oproti práci Bc. Matúše Vodeckého<sup>90</sup>. Podle naměřených hodnot absorbancí (viz Obr. 14 a 15) bylo usouzeno, že se buněčná stěna lépe váže na mikrotitrační destičku (MaxiSorp), pokud je aplikována v pufru PBS ELISA (viz Obr. 14), což bylo v souladu s výsledky Bc. Lucie Konečné<sup>89</sup>. Při použití vazného pufru (viz Obr. 15) přestává být patrný rozdíl mezi kontrolní a specifickou frakcí (SPA1), u níž je předpokládáno největší množství specifických protilátek dle výsledků Bc. Matúše Vodeckého<sup>90</sup>. Při použití PBS ELISA je pro každou koncentraci (ředění) zřetelněji vidět očekávaný časový trend úbytku množství specifických protilátek, kde SPA2 je frakce z vajec snesených později, než byly sneseny vejce pro frakci SPA1, z čehož vyplývá, že s časem následně koncentrace specifických protilátek klesala, aktivita specifických IgY je zde vyšší pro SPA1 než pro SPA2.



S cílem zjistit, zda došlo imunizací k produkci většího množství specifických protilátek, než které se při ELISA s buněčnou stěnou jako antigenem daří prokázat, byly v dalších pokusech použity místo buněčné stěny celé buňky *C. albicans*. Předpokládali jsme, že by v tomto uspořádání bylo možné prokázat, že se specifická frakce významněji liší od kontrolní frakce. Z porovnání výsledků s buněčnou stěnou a celými buňkami (viz Obr. 16 a 19) vyplývá, že buněčná stěna se jako antigen pro detekci specifických protilátek příliš nehodí.

Při použití celých buněk kultivovaných ve VSF médiu a následně inkubovaných v YPD médiu jako antigenu (viz Obr. 17) je vidět větší odlišnost mezi specifickou frakcí SPA1 a kontrolní frakcí KA za použití hmotnostní koncentrace protilátek 90 µg/ml. Pro koncentraci 30 µg/ml bylo dokonce dosaženo více než 50% odlišnosti specifické frakce SPA1 oproti kontrolní frakci, což poukazovalo na skutečnost, že při použití menší koncentrace protilátky bylo možné vidět větší rozdíl ve specifické aktivitě jednotlivých frakcí.

Při vyšších koncentracích protilátek již rozdíly absorbancí mezi specifickými frakcemi protilátek zanikaly v důsledku postupného přesycování antigenních struktur. Odtud vyplynulo, že kombinace kultivace buněk ve VSF médiu s inkubací 1,5 hodiny v YPD vede k přípravě vhodnějšího antigenu pro detekci specifických protilátek oproti experimentu za použití buněčné stěny. Další pokus, který měl pomoci prokázat specifitu protilátek, spočíval ve vysycení (viz Obr. 18) frakcí protilátek antigenem (buňkami *C. albicans*). Očekávalo se, že kdyby ve specifických frakcích byly specifické protilátky přítomny, tak vysycením, tj. kontaktem s antigenem realizovaným ko-inkubací s *C. albicans*, by měly následně po oddělení buněk ubýt. V CELISA by absorbance vysycených specifických frakcí měly teoreticky klesnout na absorbanci kontrolní frakce. Výsledky ukazují (viz Obr. 18), že absorbance specifické frakce na úroveň hodnoty absorbance kontroly u vysycených frakcí neklesla, dokonce je podle směrodatných odchylek možné prohlásit, že aktivita byla v obou případech srovnatelná.

K očekávanému zásadnímu poklesu reaktivity specifických protilátek tedy nedošlo, což vedlo k domněnce, že se při CELISA (viz Obr. 17) podařilo detekovat pouze jakousi nespecifickou reaktivitu protilátek. Vysvětlení může spočívat v tom, že před vysycením byly kvasinky

usmrceny ethanolem, čímž se mohlo stát, že došlo k denaturaci konformačních epitopů přítomných na buňkách (které jsou specifickými protilátkami rozeznatelné pouze v nativní formě), a tím k omezení vazby specifických protilátek. Následující obměna experimentu (viz Obr. 19) proto spočívala v tom, že bylo pro vysycení protilátek využito jejich naředění roztokem tablety cOmplete™ „Protease Inhibitor Cocktail od firmy Roche“ (1 tableta na 50 ml roztoku) v pufru PBS s azidem. Tím mělo dojít k inhibici kvasinkových proteas, které by mohly degradovat specifické protilátky a zároveň k zachování antigenních struktur na povrchu kvasinek bez poškození denurací ethanolem. I tato změna ve způsobu vysycení protilátkových frakcí přinesla analogické výsledky.

Použitím buněčné stěny (viz Obr. 19 B) oproti celým buňkám *C. albicans* jako antigenu (viz Obr. 19 A) bylo možné ukázat výraznější efekt vysycení protilátek. Navíc bylo možné konstatovat již zjištěný fakt, že i kontrolní frakce musela obsahovat jisté množství specifických protilátek z důvodu, že byly slepice *C. albicans* v jejich prostředí přirozeně vystaveny, protože i kontrolní frakce vykazovaly nenulovou absorbanci, což bylo v souladu s výsledky z předchozích prací<sup>89,90</sup>.

Lze tedy shrnout, že i vysycení specifických protilátek nativními buňkami *C. albicans* v přítomnosti inhibitorů proteas má jen omezený efekt dosahující maximálně 30 % oproti situaci bez vysycení, a to jen když byl jako antigen při ELISA použit preparát buněčné stěny.

Jako pevná fáze byla v případě metod ELISA a CELISA zvolena mikrotitrační destička (MaxiSorp) podle bakalářské práce Bc. Lucie Konečné.<sup>89</sup> Protože jak v protokolu ELISA, tak CELISA nemusí dojít k reprodukovatelné a efektivní vazbě antigenu na povrch mikrotitrační destičky, byl zvolen přechod k zachycení neovlivněného antigenu (buněk *C. albicans*) jednak centrifugačně sedimentací, jednak filtračně zachycením kvasinek na filtru.

Snaha o detekci specifických protilátek centrifugačním způsobem byla zahájena nejprve pouze orientačním pokusem (nezobrazeno), ovšem rozdíly v absorbancích při vyvolání ternárních komplexů (antigenu, primární protilátky a sekundární protilátky značené alkalickou fosfatou)

nebyly příliš významné. Protože v následných experimentech ani vztažení hodnot absorbancí získaných po inkubaci s chromogenním substrátem u jednotlivých frakcí na hodnoty optických denzit imunokomplexů frakcí před vyvolávacím krokem (tedy normalizace na množství buněk) neposkytovalo reprodukovatelné výsledky (viz Obr. 20), bylo od sedimentační techniky upuštěno. Další možností, jak využít celé buňky *C. albicans* pro detekci specifických protilátek bylo jejich zachycení na filtru ze skleněných mikrovláken. K tomuto účelu byl použit stříkačkový filtrační nástavec a postup obdobný technice ELISA. Při prvním provedení tohoto filtračního protokolu (nezobrazeno) se ukázalo, že v případě kontrolní frakce byla po vyvolání naměřena dokonce vyšší absorbance než u specifické frakce.

V navazujících experimentech byly postupně vylučovány možné zdroje interference, které by mohly způsobit tyto neočekávané výsledky. Pokusem jen s buňkami kvasinek se neprokázalo, že by *C. albicans* exprimovala alkalickou fosfatázu, která by následně vybarvovala chromogenní substrát. Obdobně se nepotvrdila možná nespecifická vazba sekundární protilátky na filtr či vnitřní povrch aparatury a ani rozklad substrátu při styku se skelnými vlákny filtru. Čtvrtá teoretická příčina vyšší reaktivity kontrolní protilátky oproti protilátce specifické by mohla souviset s křížovou reaktivitou sekundární králičí protilátky s povrchovými strukturami kvasinek *C. albicans*, pokud by příslušný králik, ze kterého sekundární protilátka pocházela, byl kvasinkám v průběhu života exponován. Provedené experimenty tento předpoklad nepotvrdily.

Aby bylo možno rozhodnout, zda byly neočekávané výsledky způsobeny provedením filtrační techniky nebo tím, že se nepodařilo připravit specifické protilátky proti *C. albicans*, byly pro další experimenty použity protilátky izolované Bc. Matúšem Vodeckým s prokázanou reaktivitou vůči *C. albicans* kultivované ve VSF médiu. I v tomto případě byly výsledky nejednoznačné, takže položenou otázku nelze zodpovědět.

Před začátkem projektu byla vyslovena otázka, zda je nutné imunizovat slepice kompletním Freundovým adjuvans obsahujícím usmrcené mykobakterie, nebo bude vhodnější použít jen nekompletní Freundovo adjuvans a imunogenní potenciál kvasinky tak bude dostačující.

Získané výsledky ze stanovení ELISA a CELISA naznačují možnost, že se imunizací nepovedlo u experimentálních slepic navodit dostatečně velkou imunitní odezvu. Z porovnání publikovaných studií<sup>12,77,92–95</sup> přípravy slepičích IgY z imunizovaných slepic nebylo možné potvrdit, že by většina úspěšných příprav IgY zahrnovala imunizaci slepic kompletním Freundovým adjuvans, protože příprava IgY se i bez kompletního Freundova adjuvans alespoň jednou vědeckým skupinám podařila<sup>77</sup>.

Použití filtračního a centrifugačního protokolu nepřineslo očekávané výsledky pravděpodobně z důvodu nedokonalé optimalizace nových metod. Při vývoji filtrační metody imunodetekce specifických protilátek bylo třeba zajistit totožné podmínky pro oba aparáty (pro kontrolní a specifickou frakci), které zahrnovaly nepoškození filtrů během centrifugace, odstranění bublin z aparátu, které by znemožnily rovnoměrné rozložení kvasinek a dalších složek na ploše filtru, totožný časový interval mezi zahájením a zastavením detekční reakce. Ukázalo se, že dodržení těchto podmínek by vyžadovalo jak odolnější materiál mikrofiltru, tak automatizaci metody, protože manuální provedení mohlo vést k nepřesnostem a rozdílným podmínkám pro obě aparatury.

Do budoucna by bylo zajímavé provést experimenty ELISA a CELISA v prostředí kyselého pufru například s pH 4 a ověřit tak, za jakých podmínek se antigenní struktury vážou na polystyrenovou mikrotitrační destičku nejlépe jako možnou alternativu imobilizaci buněk *C. albicans* na dno mikrotitrační destičky pomocí ethanolu. Zároveň by též bylo vhodné, aby obě imunizované slepice snášely vejce i po imunizaci. Tak by bylo možné zhodnotit a porovnat imunoreaktivitu protilátek vůči oběma antigenům, kterým byly slepice imunizovány.

Závěrem je třeba konstatovat, že žádnou z používaných technik se nepodařilo jednoznačně prokázat, že se specifické protilátky proti *C. albicans* v této práci podařilo připravit. Těžiště předkládané bakalářské práce je proto v rešerši relevantní literatury.

## 6. Souhrn

V experimentální části bakalářské práce

- byly kultivovány kvasinky *C. albicans* na VSF médiu a izolovány jejich buněčné stěny
- byly izolovány polyklonální protilátky IgY z vaječných žloutků slepic imunizovaných buněčnou stěnou *C. albicans*
- metodou ELISA byla testována imunoreaktivita izolovaných protilátek od slepice imunizované buněčnou stěnou vůči antigenům, kterými byly buněčná stěna *C. albicans* kultivované ve VSF médiu
- metodou CELISA byla testována imunoreaktivita izolovaných protilátek od slepice imunizované buněčnou stěnou vůči celým buňkám *C. albicans*
- metodami ELISA a CELISA nebyly získány reprodukovatelné výsledky
- postupy centrifugace a filtrace pro testování imunoreaktivity protilátek vůči neovlivněným buňkám *C. albicans* též neposkytly reprodukovatelné výsledků

V rešeršní části bakalářské práce

- byly demonstrovány údaje o závažnosti současné problematiky kvasinkových onemocnění
- byly popsány některé typické znaky oportunně-patogenní kvasinky *C. albicans*
- bylo pojednáno o známých virulentních faktorech *C. albicans* zodpovědných za patogenní působení *C. albicans*
- byl vysvětlen význam slepičích specifických protilátek izolovatelných z vaječných žloutků jako potenciálního nástroje imunoterapie a profylaxe některých typů kvasinkových infekcí způsobených *C. albicans*

## Použitá literatura

- (1) O'Brien, H. E.; Parrent, J. L.; Jackson, J. A.; Moncalvo, J.-M.; Vilgalys, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (9), 5544–5550. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005>.
- (2) Hawksworth, D. L. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species Estimate Revisited. *Mycol. Res.* **2001**, *105* (12), 1422–1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>.
- (3) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Levitz, S. M. Tackling Human Fungal Infections. *Science* **2012**, *336* (6082), 647–647. <https://doi.org/10.1126/science.1222236>.
- (4) Turner, S. A.; Butler, G. The Candida Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>.
- (5) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- (6) Schindler, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*; Grada, 2009.
- (7) Lopes, J. P.; Lionakis, M. S. Pathogenesis and Virulence of *Candida Albicans*. *Virulence* **2022**, *13* (1), 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>.
- (8) Willems, H. M. E.; Ahmed, S. S.; Liu, J.; Xu, Z.; Peters, B. M. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J. Fungi* **2020**, *6* (1), 27. <https://doi.org/10.3390/jof6010027>.
- (9) Sarma, S.; Kumar, N.; Sharma, S.; Govil, D.; Ali, T.; Mehta, Y.; Rattan, A. Candidemia Caused by Amphotericin B and Fluconazole Resistant *Candida Auris*. *Indian J. Med. Microbiol.* **2013**, *31* (1), 90–91. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.108746>.
- (10) Kim, M.; Shin, J. H.; Sung, H.; Lee, K.; Kim, E.; Ryoo, N.; Lee, J.; Jung, S.; Park, K. H.; Kee, S. J.; Kim, S. H.; Shin, M. G.; Suh, S. P.; Ryang, D. W. *Candida Haemulonii* and Closely Related Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Clinical Features. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (6), e57–e61. <https://doi.org/10.1086/597108>.
- (11) Butts, A.; Reitler, P.; Nishimoto, A. T.; DeJarnette, C.; Estredge, L. R.; Peters, T. L.; Veve, M. P.; Rogers, P. D.; Palmer, G. E. A Systematic Screen Reveals a Diverse Collection of Medications That Induce Antifungal Resistance in *Candida* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63* (5), e00054-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00054-19>.
- (12) Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J.; Stiborova, M. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8* (1), 113–124. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)14006-5](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)14006-5).
- (13) Calderone, R. A.; Fonzi, W. A. Virulence Factors of *Candida Albicans*. *Trends Microbiol.* **2001**, *9* (7), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7).
- (14) Vylkova, S.; Carman, A. J.; Danhof, H. A.; Collette, J. R.; Zhou, H.; Lorenz, M. C. The Fungal Pathogen *Candida Albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. *mBio* **2011**, *2* (3), e00055-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00055-11>.
- (15) Russell, C. M.; Rybak, J. A.; Miao, J.; Peters, B. M.; Barrera, F. N. Candidalysin: Connecting the Pore Forming Mechanism of This Virulence Factor to Its

- Immunostimulatory Properties. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299* (2), 102829. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102829>.
- (16) Moyes, D. L.; Wilson, D.; Richardson, J. P.; Mogavero, S.; Tang, S. X.; Wernecke, J.; Höfs, S.; Gratacap, R. L.; Robbins, J.; Runglall, M.; Murciano, C.; Blagojevic, M.; Thavaraj, S.; Förster, T. M.; Hebecker, B.; Kasper, L.; Vizcay, G.; Iancu, S. I.; Kichik, N.; Häder, A.; Kurzai, O.; Luo, T.; Krüger, T.; Kniemeyer, O.; Cota, E.; Bader, O.; Wheeler, R. T.; Gutschmann, T.; Hube, B.; Naglik, J. R. Candidalysin Is a Fungal Peptide Toxin Critical for Mucosal Infection. *Nature* **2016**, *532* (7597), 64–68. <https://doi.org/10.1038/nature17625>.
- (17) Gulati, M.; Nobile, C. J. Candida Albicans Biofilms: Development, Regulation, and Molecular Mechanisms. *Microbes Infect.* **2016**, *18* (5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>.
- (18) Finkel, J. S.; Mitchell, A. P. Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9* (2), 109–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>.
- (19) Uppuluri, P.; Pierce, C. G.; López-Ribot, J. L. Candida Albicans Biofilm Formation and Its Clinical Consequences. *Future Microbiol.* **2009**, *4* (10), 1235–1237. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.85>.
- (20) Seneviratne, C.; Jin, L.; Samaranyake, L. Biofilm Lifestyle of Candida: A Mini Review. *Oral Dis.* **2008**, *14* (7), 582–590. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x>.
- (21) Cavalheiro, M.; Teixeira, M. C. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front. Med.* **2018**, *5*, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>.
- (22) Ibrahim, A. S.; Mirbod, F.; Filler, S. G.; Banno, Y.; Cole, G. T.; Kitajima, Y.; Edwards, J. E.; Nozawa, Y.; Ghannoum, M. A. Evidence Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of Candida Albicans. *Infect. Immun.* **1995**, *63* (5), 1993–1998. <https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1993-1998.1995>.
- (23) Albrecht, A.; Felk, A.; Pichova, I.; Naglik, J. R.; Schaller, M.; De Groot, P.; MacCallum, D.; Odds, F. C.; Schäfer, W.; Klis, F.; Monod, M.; Hube, B. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteases of Candida Albicans Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (2), 688–694. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509297200>.
- (24) Schaller, M.; Korting, H. C.; Schäfer, W.; Bastert, J.; Chen, W.; Hube, B. Secreted Aspartic Proteinase (Sap) Activity Contributes to Tissue Damage in a Model of Human Oral Candidosis. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34* (1), 169–180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01590.x>.
- (25) Hube, B.; Sanglard, D.; Odds, F. C.; Hess, D.; Monod, M.; Schäfer, W.; Brown, A. J.; Gow, N. A. Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes SAP1, SAP2, and SAP3 of Candida Albicans Attenuates Virulence. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (9), 3529–3538. <https://doi.org/10.1128/iai.65.9.3529-3538.1997>.
- (26) Pericolini, E.; Gabrielli, E.; Amacker, M.; Kasper, L.; Roselletti, E.; Luciano, E.; Sabbatini, S.; Kaeser, M.; Moser, C.; Hube, B.; Vecchiarelli, A.; Cassone, A. Secretory Aspartyl Proteinases Cause Vaginitis and Can Mediate Vaginitis Caused by Candida Albicans in Mice. *mBio* **2015**, *6* (3), e00724-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00724-15>.
- (27) Gabrielli, E.; Sabbatini, S.; Roselletti, E.; Kasper, L.; Perito, S.; Hube, B.; Cassone, A.; Vecchiarelli, A.; Pericolini, E. *In Vivo* Induction of Neutrophil Chemotaxis by Secretory

- Aspartyl Proteinases of *Candida Albicans*. *Virulence* **2016**, 7 (7), 819–825.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1184385>.
- (28) Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H. C.; Hube, B. Hydrolytic Enzymes as Virulence Factors of *Candida Albicans*. *Mycoses* **2005**, 48 (6), 365–377.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>.
- (29) Prasad, P.; Tippana, M. Morphogenic Plasticity: The Pathogenic Attribute of *Candida Albicans*. *Curr. Genet.* **2023**, 69 (2–3), 77–89. <https://doi.org/10.1007/s00294-023-01263-5>.
- (30) Böhm, L.; Torsin, S.; Tint, S. H.; Eckstein, M. T.; Ludwig, T.; Pérez, J. C. The Yeast Form of the Fungus *Candida Albicans* Promotes Persistence in the Gut of Gnotobiotic Mice. *PLOS Pathog.* **2017**, 13 (10), e1006699.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006699>.
- (31) Chin, V.-K.; Foong, K.-J.; Maha, A.; Rusliza, B.; Norhafizah, M.; Chong, P. Multi-Step Pathogenesis and Induction of Local Immune Response by Systemic *Candida Albicans* Infection in an Intravenous Challenge Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15 (8), 14848–14867. <https://doi.org/10.3390/ijms150814848>.
- (32) Flanagan, P. R.; Liu, N.-N.; Fitzpatrick, D. J.; Hokamp, K.; Köhler, J. R.; Moran, G. P. The *Candida Albicans* TOR-Activating GTPases Gtr1 and Rhb1 Coregulate Starvation Responses and Biofilm Formation. *mSphere* **2017**, 2 (6), e00477-17.  
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00477-17>.
- (33) Lindsay, A. K.; Deveau, A.; Piispanen, A. E.; Hogan, D. A. Farnesol and Cyclic AMP Signaling Effects on the Hypha-to-Yeast Transition in *Candida Albicans*. *Eukaryot. Cell* **2012**, 11 (10), 1219–1225. <https://doi.org/10.1128/EC.00144-12>.
- (34) Lo, H.-J.; Köhler, J. R.; DiDomenico, B.; Loebenberg, D.; Cacciapuoti, A.; Fink, G. R. Nonfilamentous *C. Albicans* Mutants Are Avirulent. *Cell* **1997**, 90 (5), 939–949.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80358-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80358-X).
- (35) Murad, A. M. A. NRG1 Represses Yeast–Hypha Morphogenesis and Hypha-Specific Gene Expression in *Candida Albicans*. *The EMBO Journal* **2001** (20), 4742–4752.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4742>.
- (36) Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. The Distinct Morphogenic States of *Candida Albicans*. *Trends Microbiol.* **2004**, 12 (7), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.
- (37) Huang, G. Regulation of Phenotypic Transitions in the Fungal Pathogen *Candida Albicans*. *Virulence* **2012**, 3 (3), 251–261. <https://doi.org/10.4161/viru.20010>.
- (38) Carlisle, P. L.; Banerjee, M.; Lazzell, A.; Monteagudo, C.; López-Ribot, J. L.; Kadosh, D. Expression Levels of a Filament-Specific Transcriptional Regulator Are Sufficient to Determine *Candida Albicans* Morphology and Virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (2), 599–604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804061106>.
- (39) Dunker, C.; Polke, M.; Schulze-Richter, B.; Schubert, K.; Rudolphi, S.; Gressler, A. E.; Pawlik, T.; Prada Salcedo, J. P.; Niemiec, M. J.; Slesiona-Künzel, S.; Swidergall, M.; Martin, R.; Dandekar, T.; Jacobsen, I. D. Rapid Proliferation Due to Better Metabolic Adaptation Results in Full Virulence of a Filament-Deficient *Candida Albicans* Strain. *Nat. Commun.* **2021**, 12 (1), 3899. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24095-8>.
- (40) Biswas, K.; Morschhäuser, J. The Mep2p Ammonium Permease Controls Nitrogen Starvation-induced Filamentous Growth in *Candida Albicans*. *Mol. Microbiol.* **2005**, 56 (3), 649–669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04576.x>.



- (41) Tao, L.; Du, H.; Guan, G.; Dai, Y.; Nobile, C. J.; Liang, W.; Cao, C.; Zhang, Q.; Zhong, J.; Huang, G. Discovery of a “White-Gray-Opaque” Tristable Phenotypic Switching System in *Candida Albicans*: Roles of Non-Genetic Diversity in Host Adaptation. *PLoS Biol.* **2014**, *12* (4), e1001830. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001830>.
- (42) Pande, K.; Chen, C.; Noble, S. M. Passage through the Mammalian Gut Triggers a Phenotypic Switch That Promotes *Candida Albicans* Commensalism. *Nat. Genet.* **2013**, *45* (9), 1088–1091. <https://doi.org/10.1038/ng.2710>.
- (43) Garcia-Rubio, R.; De Oliveira, H. C.; Rivera, J.; Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>.
- (44) Román, E.; Correia, I.; Salazin, A.; Fradin, C.; Jouault, T.; Poulain, D.; Liu, F.-T.; Pla, J. The Cek1-mediated MAP Kinase Pathway Regulates Exposure of A-1,2 and B-1,2-mannosides in the Cell Wall of *Candida Albicans* Modulating Immune Recognition. *Virulence* **2016**, *7* (5), 558–577. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1163458>.
- (45) de Nadal, E.; Posas, F. The HOG Pathway and the Regulation of Osmoadaptive Responses in Yeast. *FEMS Yeast Res.* **2022**, *22* (1), foac013. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foac013>.
- (46) Le, M. H.; Do, H. D.; Tran Thi, H. H.; Dung, L. V.; Nguyen, H. N.; Tran Thi, H. N.; Nguyen, L. D.; Hoang, C. K.; Le, H. C.; Le Thi, T. H.; Trinh, H. T.; Ha, P. T. The Dual Effect of Curcumin Nanoparticles Encapsulated by 1-3/1-6  $\beta$ -Glucan from Medicinal Mushrooms *Hericium Erinaceus* and *Ganoderma Lucidum*. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *7* (4), 045019. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045019>.
- (47) Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- (48) Lenardon, M. D.; Sood, P.; Dorfmueller, H. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Scalar Nanostructure of the *Candida Albicans* Cell Wall; a Molecular, Cellular and Ultrastructural Analysis and Interpretation. *Cell Surf.* **2020**, *6*, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2020.100047>.
- (49) Swarts, B. M.; Guo, Z. Chemical Synthesis and Functionalization of Clickable Glycosylphosphatidylinositol Anchors. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (12), 2342. <https://doi.org/10.1039/c1sc00440a>.
- (50) Ikezawa, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **2002** (25), 409–417. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.409>.
- (51) Plaine, A.; Walker, L.; Da Costa, G.; Mora-Montes, H. M.; McKinnon, A.; Gow, N. A. R.; Gaillardin, C.; Munro, C. A.; Richard, M. L. Functional Analysis of *Candida Albicans* GPI-Anchored Proteins: Roles in Cell Wall Integrity and Caspofungin Sensitivity. *Fungal Genet. Biol.* **2008**, *45* (10), 1404–1414. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.08.003>.
- (52) Datta, K.; Hamad, M. Immunotherapy of Fungal Infections. *Immunol. Invest.* **2015**, *44* (8), 738–776. <https://doi.org/10.3109/08820139.2015.1093913>.
- (53) Wich, M.; Greim, S.; Ferreira-Gomes, M.; Krüger, T.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A. A.; Jacobsen, I. D.; Hube, B.; Jungnickel, B. Functionality of the Human Antibody

- Response to *Candida Albicans*. *Virulence* **2021**, *12* (1), 3137–3148.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2015116>.
- (54) Arvanitis, M.; Anagnostou, T.; Fuchs, B. B.; Caliendo, A. M.; Mylonakis, E. Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27* (3), 490–526. <https://doi.org/10.1128/CMR.00091-13>.
- (55) Roemer, T.; Krysan, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (5), a019703–a019703. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019703>.
- (56) Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Antifungal Agents: Mechanisms of Action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11* (6), 272–279. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00117-3).
- (57) Kobayashi, D.; Kondo, K.; Uehara, N.; Otokozawa, S.; Tsuji, N.; Yagihashi, A.; Watanabe, N. Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (10), 3113–3117. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3113-3117.2002>.
- (58) Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieuwkoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. Amphotericin Forms an Extramembranous and Fungicidal Sterol Sponge. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (5), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1496>.
- (59) Cavassin, F. B.; Baú-Carneiro, J. L.; Vilas-Boas, R. R.; Queiroz-Telles, F. Sixty Years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect. Dis. Ther.* **2021**, *10* (1), 115–147. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00382-7>.
- (60) Rai, A.; Misra, S. R.; Panda, S.; Sokolowski, G.; Mishra, L.; Das, R.; Lapinska, B. Nystatin Effectiveness in Oral Candidiasis Treatment: A Systematic Review & Meta-Analysis of Clinical Trials. *Life* **2022**, *12* (11), 1677. <https://doi.org/10.3390/life12111677>.
- (61) Sanglard, D.; Ischer, F.; Parkinson, T.; Falconer, D.; Bille, J. *Candida Albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47* (8), 2404–2412. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2404-2412.2003>.
- (62) Vermes, A. Flucytosine: A Review of Its Pharmacology, Clinical Indications, Pharmacokinetics, Toxicity and Drug Interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46* (2), 171–179. <https://doi.org/10.1093/jac/46.2.171>.
- (63) Nett, J. E.; Andes, D. R. Antifungal Agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (1), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>.
- (64) Gao, J.; Wang, H.; Li, Z.; Wong, A. H.-H.; Wang, Y.-Z.; Guo, Y.; Lin, X.; Zeng, G.; Liu, H.; Wang, Y.; Wang, J. *Candida Albicans* Gains Azole Resistance by Altering Sphingolipid Composition. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4495. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06944-1>.
- (65) Bhattacharya, S.; Sae-Tia, S.; Fries, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics* **2020**, *9* (6), 312. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>.
- (66) Onishi, J.; Meinz, M.; Thompson, J.; Curotto, J.; Dreikorn, S.; Rosenbach, M.; Douglas, C.; Abruzzo, G.; Flattery, A.; Kong, L.; Cabello, A.; Vicente, F.; Pelaez, F.; Diez, M. T.;

- Martin, I.; Bills, G.; Giacobbe, R.; Dombrowski, A.; Schwartz, R.; Morris, S.; Harris, G.; Tsipouras, A.; Wilson, K.; Kurtz, M. B. Discovery of Novel Antifungal (1,3)-b-D-Glucan Synthase Inhibitors. **2000**, *44* (2), 368–377. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.368-377.2000>.
- (67) De Becker, G.; Moulin, V.; Pajak, B.; Bruck, C.; Francotte, M.; Thiriart, C.; Urbain, J.; Moser, M. The Adjuvant Monophosphoryl Lipid A Increases the Function of Antigen-Presenting Cells. *Int. Immunol.* **2000**, *12* (6), 807–815. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.6.807>.
- (68) Hořejší, V. *Základy imunologie*, 6.; Triton: Praha, 2017.
- (69) Casadevall, A.; Pirofski, L. A Therapeutic Vaccine for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66* (12), 1937–1939. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy188>.
- (70) Oliveira, L. V. N.; Wang, R.; Specht, C. A.; Levitz, S. M. Vaccines for Human Fungal Diseases: Close but Still a Long Way to Go. *Npj Vaccines* **2021**, *6* (1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00294-8>.
- (71) Leslie, G. A.; Clem, L. W. PHYLOGENY OF IMMUNOGLOBULIN STRUCTURE AND FUNCTION. *J. Exp. Med.* **1969**, *130* (6), 1337–1352. <https://doi.org/10.1084/jem.130.6.1337>.
- (72) Narat, M. Production of Antibodies in Chickens. **2003**, *41* (3), 259–267.
- (73) Schade, R.; Staak, C.; Hendriksen, C.; Erhard, M.; Hugl, H.; Koch, G.; Larsson, A.; Pollmann, W.; Van Regenmortel, M.; Rijke, E.; Spielmann, H.; Steinbusch, H.; Straughan, D. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21<sup>1,2</sup>. *Altern. Lab. Anim.* **1996**, *24* (6), 925–934. <https://doi.org/10.1177/026119299602400607>.
- (74) Pauly, D.; Chacana, P. A.; Calzado, E. G.; Brembs, B.; Schade, R. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *J. Vis. Exp.* **2011**, No. 51, 3084. <https://doi.org/10.3791/3084>.
- (75) Pereira, E. P. V.; Van Tilburg, M. F.; Florean, E. O. P. T.; Guedes, M. I. F. Egg Yolk Antibodies (IgY) and Their Applications in Human and Veterinary Health: A Review. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *73*, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>.
- (76) Takeuchi, S.; Motohashi, J.; Kimori, H.; Nakagawa, Y.; Tsurumoto, A. Effects of Oral Moisturising Gel Containing Egg Yolk Antibodies against *Candida Albicans* in Older People. *Gerodontology* **2016**, *33* (1), 128–134. <https://doi.org/10.1111/ger.12139>.
- (77) Kamikawa, Y.; Fujisaki, J.; Nagayama, T.; Kawasaki, K.; Hirabayashi, D.; Hamada, T.; Sakamoto, R.; Mukai, H.; Sugihara, K. Use of Candida-specific Chicken Egg Yolk Antibodies to Inhibit the Adhering of *Candida* to Denture Base Materials: Prevention of Denture Stomatitis. *Gerodontology* **2016**, *33* (3), 342–347. <https://doi.org/10.1111/ger.12163>.
- (78) Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. A. IgY: Clues to the Origins of Modern Antibodies. *Immunol. Today* **1995**, *16* (8), 392–398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5).
- (79) Spillner, E.; Braren, I.; Greunke, K.; Seismann, H.; Blank, S.; Du Plessis, D. Avian IgY Antibodies and Their Recombinant Equivalents in Research, Diagnostics and Therapy. *Biologicals* **2012**, *40* (5), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>.

- (80) Gee, S. C.; Bate, I. M.; Thomas, T. M.; Rylatt, D. B. The Purification of IgY from Chicken Egg Yolk by Preparative Electrophoresis. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *30* (2), 151–155. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00076-7).
- (81) El-Kafrawy, S. A.; Abbas, A. T.; Oelkrug, C.; Tahoon, M.; Ezzat, S.; Zumla, A.; Azhar, E. I. IgY Antibodies: The Promising Potential to Overcome Antibiotic Resistance. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1065353. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1065353>.
- (82) León-Núñez, D.; Vizcaíno-López, M. F.; Escorcía, M.; Correa, D.; Pérez-Hernández, E.; Gómez-Chávez, F. IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. *Antibodies* **2022**, *11* (4), 62. <https://doi.org/10.3390/antib11040062>.
- (83) Rahman, S.; Van Nguyen, S.; Icatlo Jr., F. C.; Umeda, K.; Kodama, Y. Oral Passive IgY-Based Immunotherapeutics: A Novel Solution for Prevention and Treatment of Alimentary Tract Diseases. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9* (5), 1039–1048. <https://doi.org/10.4161/hv.23383>.
- (84) Nishinaka, S.; Matsuda, H.; Murata, M. Establishment of a Chicken × Chicken Hybridoma Secreting Specific Antibody. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1989**, *89* (4), 416–419. <https://doi.org/10.1159/000234985>.
- (85) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X).
- (86) Aydın, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, *72*, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- (87) Novák, F. *Úvod do klinické biochemie*; Karolinum: Praha, 2002.
- (88) Gan, S. D.; Patel, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133* (9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>.
- (89) Konečná, L. Slepíčí protilátky proti patogenní kvasince *Candida albicans*. bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2023. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/181763>.
- (90) Vodecký, M. Příprava a charakterizace slepičích protilátek proti patogenní kvasince *Candida albicans*. bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2023. <http://hdl.handle.net/20.500.11956/185637>.
- (91) Tietz, K.; Klein, S. Simulated Genital Tract Fluids and Their Applicability in Drug Release/Dissolution Testing of Vaginal Dosage Forms. *Dissolution Technol.* **2018**, *25* (3), 40–51. <https://doi.org/10.14227/DT250318P40>.
- (92) De Souza, P. C.; Corrêa, A. E. D. N.; Gameiro, J. G.; De Oliveira Júnior, A. G.; Panagio, L. A.; Venancio, E. J.; Almeida, R. S. Production of IgY against Iron Permease Ftr1 from *Candida Albicans* and Evaluation of Its Antifungal Activity Using *Galleria Mellonella* as a Model of Systemic Infection. *Microb. Pathog.* **2023**, *181*, 106166. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106166>.
- (93) Fujibayashi, T.; Nakamura, M.; Tominaga, A.; Satoh, N.; Kawarai, T.; Narisawa, N.; Shinozuka, O.; Watanabe, H.; Yamazaki, T.; Senpuku, H. Effects of IgY against *Candida Albicans* and *Candida* Spp. Adherence and Biofilm Formation. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2009**, *62* (5), 337–342. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2009.337>.
- (94) Ziglari, T.; Khosravi, A. R.; Tadjbdkhsh, H.; Asadi, F.; Modirsaneii, M.; Shokri, H.; Nikbakhtborojeni, G. R.; Rostamibeshman, M. Evaluation of the IgY Production against

Hsp90 of *Candida Albicans*. *J. Mycol. Médicale* **2009**, *19* (2), 87–93.

<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.01.004>.

- (95) Wang, X. Z.; Fan, B.; Liu, L. G.; Hu, X. Y.; Li, R. Y.; Wei, Y.; Wan, Z.; Deng, X. L. In Vitro Inhibition of Oral *Candida Albicans* by Chicken Egg Yolk Antibody (IgY). *Mycopathologia* **2008**, *165* (6), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9097-0>.