

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VZTAH MEZI HOMEOSTÁZÍ KATIONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ A REZISTENCÍ
K ANTIMYKOTIKŮM U KVASINEK RODU *CANDIDA***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce specialista: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Hradec Králové 2010

Hana Elicharová

PROHLÁŠENÍ

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

místo a datum

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat oběma vedoucím diplomové práce. Panu Doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi za cenné rady a poskytnuté zázemí na Katedře biochemických věd a paní RNDr. Haně Sychrové, DrSc. nejen za příkladné vedení diplomové práce, ale i za možnost čtyři roky systematicky pracovat v kolektivu Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AVČR v.v.i., kde diplomová práce vznikala. Poděkování patří též všem kolegům za všestrannou pomoc, Mgr. Pavlu Srbovi a rodičům za podporu při studiu.

TATO DIPLOMOVÁ PRÁCE VZNIKALA V RÁMCI GRANTOVÝCH PROJEKTŮ:

- MŠMT LC 531 (2005– 2010) Centrum molekulární biologie a fyziologie společenstev kvasinek
- EU MRTN-CT-2004-512481 (2005-2009) Host-pathogen interaction systems as tools to identify antifungal targets in *C. albicans* and *C. dubliniensis*

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd

Kandidát: Hana Elicharová

Školitel: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D; *Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze*

Školitel specialista: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.; *Oddělení membránového transportu, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.*

Název práce: Vztah mezi homeostází kationů alkalických kovů a rezistencí k antimykotikům u kvasinek rodu *Candida*

Rod *Candida* zahrnuje asi 200 druhů jednobuněčných kvasinkových organismů, z nichž několik desítek druhů je potenciálně patogenních. *Candidy* jsou běžnou součástí přirozené lidské mikroflóry, avšak při oslabení imunity mohou vyvolat lokální záněty i život ohrožující systémové infekce. Mezi nejčastější původce infekcí patří druhy *Candida albicans*, *C. glabrata* a *C. parapsilosis* – právě tyto druhy a patogenní druh *C. dubliniensis* byly v centru zájmu naší práce. Tyto druhy se významně liší halotolerancí i rezistencí k azolovým antimykotikům.

Nejpoužívanější antimykotika v léčbě candidos i candidemií jsou azolová antimykotika, která inhibují syntézu ergosterolu a tím poškozují plasmatickou membránu *Candid*. Jedna z esenciálních funkcí plasmatické membrány je regulace a udržování iontové homeostáze. Je známo, že subinhibiční koncentrace flukonazolu a NaCl způsobují výraznou inhibici růstu flukonazol rezistentního i flukonazol senzitivního kmene *C. albicans*.

Výsledky naší práce ukazují, že zatímco tolerance různých druhů *Candid* k azolům či solím je poměrně vysoká, kombinace subinhibičních koncentrací flukonazolu a chloridu sodného silně inhibuje růst všech námi zkoumaných patogenních druhů *Candid*. Stejný efekt jsme pozorovali při použití dalších azolových antimykotik, calcofluor white a dodecylsírany sodného. Antimykotická aktivita těchto látek byla nejsilněji potencována účinky toxických sodných iontů. Vyšší koncentrace draselných iontů či sorbitolem zvýšený osmotický tlak výrazně zvýšily citlivost ke všem jmenovaným látkám jen u druhu *C. dubliniensis*. Nejvyšší schopnost kompenzovat stres indukovaný solemi a antimykotiky měl druh *C. glabrata*.

Projekt směřuje k lepšímu porozumění mechanismu účinku azolových antimykotik a vzniku rezistence u jednotlivých druhů *Candid*.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Biochemical Sciences

Candidate: Hana Elicharová

Supervisor: PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.; *Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague*

Supervisor specialist: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.; *Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, v.v.i.*

Title of diploma thesis: Relation between alkali-metal-cation homeostasis and resistance to antimycotics in *Candida* species

The family of *Candida species*, normally a harmless human commensal of the gastrointestinal and genitourinary tract, can become a human pathogen under certain circumstances. Mainly in immunocompromised patients, *Candida* cause a wide range of infections and are the most prevalent pathogenic yeast. In this work we have focused on the most common *Candida species* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*) and we included *C. dubliniensis* as well. *Candida species* differ in their resistance to azole-antimycotics and their halotolerance.

Azoles form the most important group of drugs with antifungal activity. They destabilise plasma membrane of *Candida* cells. The essential function of plasma membrane is regulation of cation homeostasis. The combination of subinhibition concentrations of fluconazole and NaCl is known to inhibit the growth of both fluconazole-sensitive and fluconazole-resistant) *C. albicans* strains.

We have found that all tested *Candida* species can generally tolerate high concentrations of fluconazole or salts separately, but the combination of both compounds inhibits their growth effectively. Subinhibition concentrations of salts amplified sensitivity to another cell barriers disrupting drugs (other azoles, calcofluor white, sodium dodecylsulfate). Toxic sodium cations potentiated the activity of all antimycotics very strongly. The higher concentration of potassium cations and higher sorbitol-mediated osmotic pressure affected only the resistance to antimycotics of *C. dubliniensis*. The species *C. glabrata* was able to compensate salt- and toxic-stress the most effectively.

Project aims to deeper understand the mechanism of action of antifungal agents and the development of resistance to antimycotics.

Obsah

1	Úvod a cíle práce	10
2	Teorie	12
2.1	Rod <i>Candida</i>	12
2.1.1	<i>Candida albicans</i>	16
2.1.2	<i>Candida dubliniensis</i>	16
2.1.3	<i>Candida parapsilosis</i>	17
2.1.4	<i>Candida glabrata</i>	18
2.2	Homeostáze iontů alkalických kovů	19
2.2.1	Membránové transportéry	20
2.2.2	Iontová homeostáze a osmotický stres.....	22
2.3	Antimykoticky aktivní látky	23
2.3.1	Azolová antimykotika	23
2.3.2	Ostatní antimykotika	26
2.3.3	Jiné antimykoticky aktivní látky	27
2.4	Rezistence <i>candid</i> k azolovým antimykotikům	31
3	Materiál a metody.....	34
3.1	Materiál.....	34
3.1.1	Kultivační média	34
3.1.2	Kmeny kvasinek.....	34
3.1.3	Chemikálie	35
3.1.4	Přístrojové vybavení.....	36
3.1.5	Ostatní materiál	37

3.2	Metody.....	38
3.2.1	Stanovení optické hustoty (OD ₆₀₀) buněk	38
3.2.2	Příprava kultivačních médií.....	38
3.2.3	Roztoky antimykotik.....	39
3.2.4	Sterilizace materiálu a likvidace buněčných kultur	40
3.2.5	Uchovávání buněk.....	40
3.2.6	Pěstování buněk	40
4	Výsledky	43
4.1	<i>Candidy</i> a sole alkalických kovů	43
4.1.1	Tolerance k solím alkalických kovů	43
4.1.2	Subinhibiční koncentrace solí alkalických kovů a sorbitolu	45
4.2	Flukonazol	48
4.2.1	Rezistence <i>candid</i> k flukonazolu	48
4.2.2	Stanovení subinhibiční koncentrace flukonazolu.....	48
4.2.3	Vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci <i>Candid</i> k flukonazolu	51
4.2.4	Souhrn	57
4.3	Itrakonazol a klotrimazol.....	58
4.3.1	Citlivost <i>Candid</i> k itrakonazolu a klotrimazolu.....	58
4.3.2	Vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci <i>Candid</i> k Itrakonazolu.....	59
4.3.3	Vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci <i>Candid</i> ke klotrimazolu.....	63
4.3.4	Souhrn	66
4.4	Calcofluor white a dodecylsírán sodný	67
4.4.1	Stanovení subinhibičních koncentrací cfw a sds.....	67

4.4.2	Vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci <i>Candid</i> vůči calcofluor white	68
4.4.3	Vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci <i>Candid</i> k dodecylsíranu sodnému.	71
4.4.4	Souhrn	74
4.5	Rezistence <i>Candid</i> k antimykotikům v prostředí s minimální koncentrací draselných iontů....	75
4.5.1	Růst <i>Candid</i> v prostředí s minimální koncentrací draselných iontů.....	75
4.5.2	Vliv limitně nízké koncentrace draselných iontů na rezistenci <i>Candid</i> k antimykotikům	77
4.5.3	Souhrn	80
4.6	Amiodaron a phenytoin	81
4.6.1	Stanovení subinhibičních koncentrací amiodaronu a phenytoinu.....	81
4.6.2	Vliv solí alkalických kovů na rezistenci <i>Candid</i> k amiodaronu a phenytoinu	82
4.6.3	Souhrn	83
5	Diskuze	84
5.1	Vztah mezi homeostází iontů alkalických kovů a rezistencí <i>candid</i> k flukonazolu	84
1.1.1	<i>Candida albicans</i>	84
1.1.2	<i>Candida dubliniensis</i>	85
1.1.3	<i>Candida parapsilosis</i>	86
1.1.4	<i>Candida glabrata</i>	86
5.2	Vztah mezi homeostází iontů alkalických kovů a rezistencí <i>Candid</i> k itrakonazolu a klotrimazolu	87
5.3	Vztah mezi homeostází iontů alkalických kovů a rezistencí <i>Candid</i> k calcofluor white a dodecylsíranu sodnému	88

5.4	Rezistence <i>Candid</i> k antimykoticky aktivním látkám v prostředí s minimální koncentrací draselných iontů.....	89
5.5	Vztah mezi homeostází iontů alkalických kovů a rezistencí <i>Candid</i> k amiodaronu	91
6	Závěry.....	92
7	Seznam zkratek	93
8	Seznam použité literatury	94

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se zabývá vztahem mezi homeostází iontů alkalických kovů a rezistencí kvasinek rodu *Candida* k různým antimykotikům. Rod *Candida* zahrnuje asi 200 druhů, z nichž několik desítek je považováno za potenciální patogeny. *Candidy* jsou běžnou součástí lidské mikroflóry, ale často vyvolávají záněty sliznic - candidosy. U imunokompromitovaných pacientů mohou způsobit systémové, život ohrožující infekce - candidémie. Nejčastějším původcem kvasinkových infekcí je *Candida albicans*. Dalšími významnými patogeny jsou druhy *C. glabrata* a *C. parapsilosis*, jejichž význam stoupá v posledních desetiletích. Do práce byl zařazen také *C. albicans* blízký, ale méně patogenní druh *C. dubliniensis*. U všech druhů *Candid* zahrnutých v této práci je známá sekvence genomu, což umožňuje v budoucnu studovat pozorované jevy na molekulární úrovni.

Nejčastěji používaná léčiva v terapii candidos i candidémií jsou azolová antimykotika. Nejrozšířenějším systémovým azolovým antimykotikem je flukonazol, který vyniká především výhodnými farmakokinetickými vlastnostmi a nízkou toxicitou. Nevýhodou flukonazolu je častý výskyt rezistentních druhů *Candid*. Mechanismus účinku flukonazolu i mechanismy vzniku rezistence jsou dnes dobře známé. Flukonazol stejně jako ostatní azolová antimykotika inhibuje 14 α -demethylasu Erg11, která se účastní syntézy ergosterolu – významného stavebního prvku plasmatické membrány houbových organismů. Rezistence k flukonazolu vzniká využitím alternativní syntetické dráhy, změnou struktury cílového enzymu díky bodové mutaci genu *ERG 11*, zvýšenou expresí tohoto genu, nebo účinným exportem flukonazolu z buňky. Jednotlivé druhy *Candid* zahrnuté v do této práce se velmi liší rezistencí k flukonazolu.

Pro všechny buňky je esenciální udržovat homeostázi iontů alkalických kovů. Draselné ionty se účastní v buňce řady fyziologických procesů a proto musí buňka udržovat jejich vnitrobuněčnou koncentraci relativně vysokou. Na druhé straně se každá buňka snaží mít co nejnižší vnitrobuněčnou koncentraci sodných iontů, které jsou pro ni toxické. K dispozici má buňka tři základní strategie – selektivně importovat draselné ionty, účinně exportovat ionty sodné nebo je sekvestrovat do vakuol. K tomu slouží buňce různé membránové a vnitrobuněčné exportéry. Tyto exportéry jsou hlavním předmětem zájmu Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i., na jehož půdě tato diplomová práce vznikla.

Cíle diplomové práce vycházejí z výsledků získaných na témže oddělení (Kolecka et al. 2009), které prokazují, že kombinace subinhibičních koncentrací NaCl a FLC způsobuje silnou inhibici růstu FLC-rezistentního i FLC-senzitivního kmene *Candidy albicans*.

Cílem naší diplomové práce bylo:

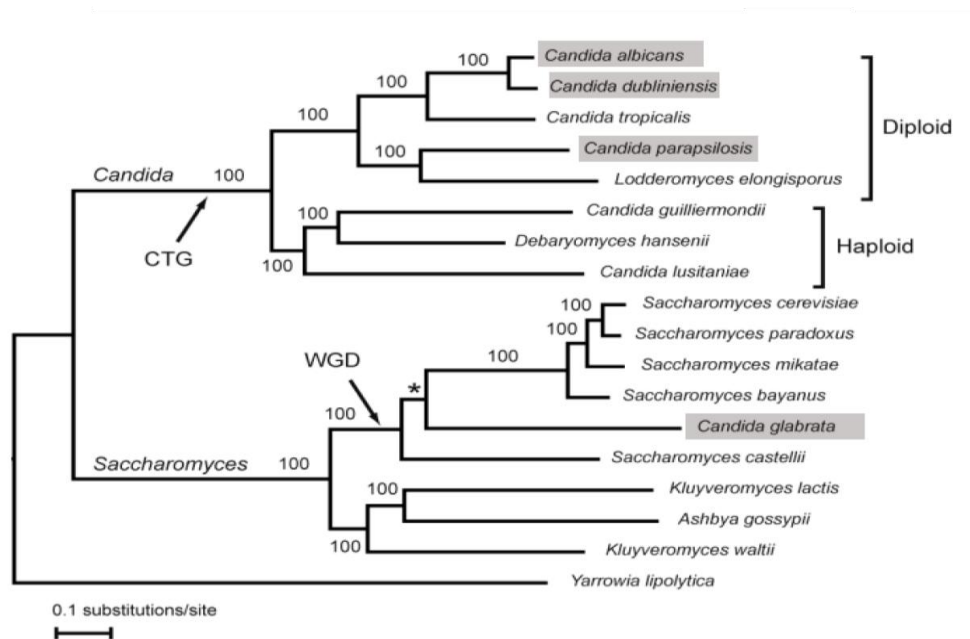
1. Zjistit, zda kombinace subinhibičních koncentrací flukonazolu a chloridu sodného inhibuje růst nejen *C. albicans*, ale i dalších patogenních druhů rodu *Candida*.
2. Ověřit, zda popsaný efekt způsobuje společně s NaCl jen flukonazol, nebo jestli jej můžeme pozorovat i při použití subinhibičních koncentrací jiných antimykoticky aktivních látek.
3. Objasnit zda je mechanismus účinku výše popsané inhibice založen na toxicitě sodných iontů, nebo jestli je spíše spojen s vyšší koncentrací iontů či jej způsobuje obecně zvýšený osmotický tlak.

2 TEORIE

2.1 ROD *CANDIDA*

Organismy patřící do rodu *Candida* jsou jednobuněčné houbové mikroorganismy. K základním znakům všech kvasinek a tedy i *Candida* patří: buněčná stěna tvořená chitinem, fermentace a schopnost rozmnožovat se pučením (Soll 1992). Rod *Candida* patří do říše *Fungi*, která zahrnuje asi 1,5 milionu druhů, dále do oddělení *Eumycota* a třídy *Hemiascomycetes* ve které nalezneme všechny důležité zástupce kvasinkových organismů. Tato třída se dále dělí na několik řádů, z nichž nejdůležitější jsou: řád *Schizosaccharomycetales* a řád *Saccharomycetales*. Druhý jmenovaný řád zahrnuje významný rod *Saccharomyces* i rod *Candida*.

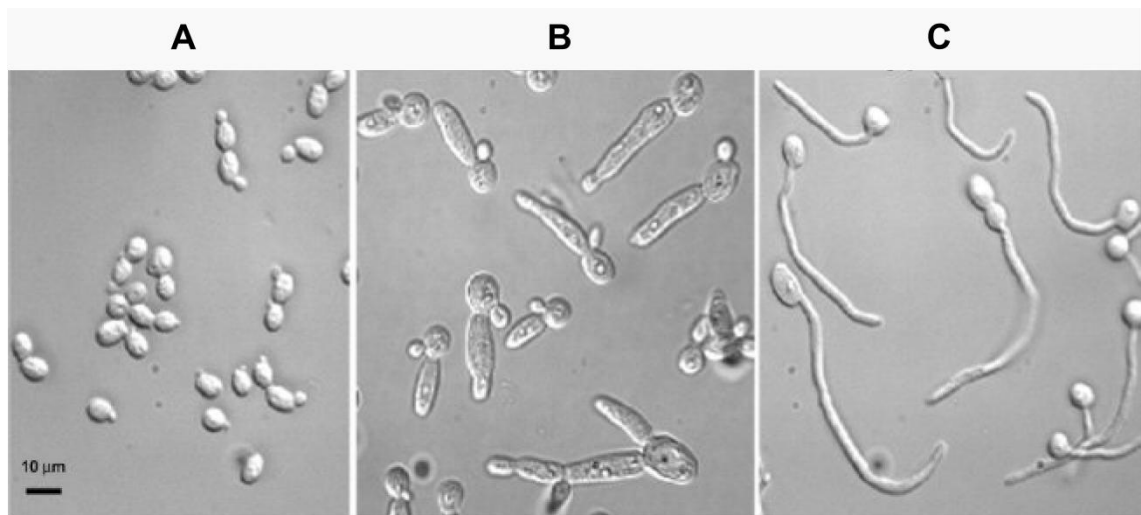
Do rodu *Candida* patří asi 200 druhů, přičemž několik desítek z nich jsou potenciálními patogeny. Komparativní genomika vedla k odhalení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy rodu *Candida* a *Saccharomyces* (Butler et al. 2009). Většina druhů rodu *Candida* patří do skupiny CTG, ve které je kodon CUG translatován jako serin. U zástupců druhé skupiny (WGD), kam patří všechny druhy rodu *Saccharomyces* je tento kodon čten jako leucin. Tři patogenní druhy (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*), které byly použity v této práci, patří do CUG skupiny a jsou diploidní. Čtvrtý patogen *C. glabrata* patří do WGD, má haploidní genom a fylogeneticky je bližší *S. cerevisiae* než *C. albicans* (Butler et al. 2009), (Obr. 1).



Obr. 1 Fylogenetický strom rodů *Candida* a *Saccharomyces*. Druhy označené šedým podkladem byly použity v této práci. Upraveno podle Butler et al. (2009)

Některé *Candidy* se vyskytují ve dvou nebo třech odlišných morfologických formách. Tento jev se nazývá dimorfismus a je např. pro *C. albicans* typický. Buňky některých druhů *Candid* rostou ve formě kvasinkové buňky, pseudomycelia nebo pravého mycelia (Obr. 2). *Candidy* mohou během růstu přejít z kvasinky do pseudomycelia, nebo mycelia. Schopnost změny morfologie je klíčová pro virulenci *Candid*. Ve stádiu kvasinky jednotlivé buňky vegetují na sliznicích nebo kůži hostitele a nevykazují známky virulence. Při porušení imunity přilnou kvasinkové buňky k epitelu a změní morfologii na pseudomycelium či mycelium – obě morfologie lépe adherují ke sliznici a jsou více invazivní k okolní tkáni (Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Pseudomycelium je tvořeno buňkami, u kterých se po rozdělení vytvoří přepážka, ale buňky se od sebe neoddělí. Pseudomycelium může být tvořeno pouze několika spojenými buňkami, nebo může zahrnovat stovky buněk a být bohatě větveno. Vlákna tvořená pseudomyceliem s nazývají pseudohyfy. Další morfologickou formou je mycelium. Vlákno mycelia (hyfa) je tubulární mnohobuněčný útvar, kde jednotlivé buňky mají zachovaná jádra, ale nejsou mezi nimi vytvořené přepážky. Mycelium může tvořit rozsáhlé, bohatě větvené struktury (Soll 1992).



Obr. 2 Morfologické formy *Candida*.(A) kvasinková buňka, (B) pseudomycelium, (C) mycelium. Upraveno podle <http://www.usask.ca/biology/kaminskyj/collab.html>

Změna morfologie z kvasinkové formy na pseudomycelium či mycelium a tedy i virulence je ovlivněna mnoha faktory např. zvýšenou teplotou prostředí na 37°C, hodnota pH okolního prostředí větší nebo rovno 7, pokles koncentrace CO₂ pod 5 % aj. (Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Na sliznicích a na povrchu medicínálních prostředků umístěných uvnitř těla (katétrů, umělé chlopně, dreny aj.) mohou *Candidy* tvořit biofilm. Vznik biofilmu probíhá ve čtyřech fázích: adherence buněk v kvasinkové formě na sliznici, proliferace, změna morfologie na mycelium nebo pseudomycelium (zahájení invaze) a maturace (produkce extracelulární matrix). Biofilm tvoří kompaktní soustava buněk různých morfologií a extracelulární matrix. Skutečnost, že biofilm je velmi odolný vůči antimykotikům, výrazně stěžuje terapii candidemií (Blankenship & Mitchell 2006).

Zástupci rodu *Candida* se běžně vyskytují jako součást lidské mikroflóry kůže, sliznic dutiny ústní a urogenitálního traktu. Při oslabení imunity hostitele způsobují *Candidy* různé druhy lokálních infekcí souhrnně nazývané candidosy. Faktory zvyšující prevalenci candidos jsou např.: dětský věk, diabetes mellitus, léčba širokospektrými antibiotiky či dieta vedoucí ke změnám v bakteriální mikroflóře (Trofa et al. 2008).

Při silném porušení imunity mohou *Candidy* vyvolat systémové onemocnění (candidémii), při kterém dochází k invazi *Candid* do tělního oběhu a rychlému rozvoji život ohrožující infekce. Výskyt candidemií v posledním desetiletí výrazně stoupl. Vzestup výskytu candidemií koreluje

se zvýšenou prevalencí imunodeficiency, která je způsobena především imunomodulační či antineoplastickou léčbou. Candidémie jsou také jedny z nejčastějších fatálních komplikací při transplantacích a léčbě onkologických onemocnění (Ruhnke 2006).

Ještě před třiceti lety byl zcela dominantním původcem lokálních i systémových infekcí druh *C. albicans*. Od začátku používání azolových antimykotik v 80. letech minulého století došlo vlivem pozitivní selekce k nárůstu počtu infekcí vyvolaných tzv. non-albicans původci. Označení non-albicans zahrnuje zástupce dalších druhů rodu *Candida* mimo druhu *C. albicans*. Původci non-albicans byly často rezistentní vůči azolům a brzy se u nich vyvinula rezistence i k dalším antimykotikům (Ruhnke 2006). Dnes je *Candida albicans* zodpovědná za 40-60 % candidemií. Na druhém místě v závislosti na regionu jsou druhy *Candida glabrata* a *Candida tropicalis*, které jsou identifikovány jako původci infekcí v 20-30 % z celkového počtu případů. Následuje *Candida parapsilosis* s 10-20 % výskytů. Další klinicky významné patogenní druhy jsou např. *C. dubliniensis*, *C. krusei* a *C. lusitaniae* (De Rosa et al. 2009).

U všech druhů *Candida* zahrnutých do této práce byla dokončena sekvenace genomu (Jones et al. 2004, Jackson et al. 2009, Butler et al. 2009, Dujon et al. 2004), což umožnilo charakterizaci vybraných genů pomocí heterologní exprese v *S. cerevisiae* a vývoj nástrojů genové manipulace (deleční kazety, auxotrofní a deleční mutanti).

2.1.1 CANDIDA ALBICANS

C. albicans je nejrozšířenějším a nejlépe prostudovaným druhem rodu *Candida*. Tento druh objevili mezi léty 1839-1844 nezávisle na sobě tři vědci: Fredrik Berg ve Stockholmu, David Gruby v Paříži a John Bennet v Edinburghu. Všichni tři označili nový druh za původce zánětu sliznice dutiny ústní u dětí. Fredrik Berg popsal *C. albicans* jako vlákna rostoucí mezi epitelem sliznice (Barnett 2008).

C. albicans je běžnou součástí mikroflóry kůže a sliznic zdravé populace. Při oslabení organismu hostitele vyvolává záněty sliznic a také je nejčastějším původcem systémových invazivních candidos.

Ve středu naší pozornosti stojí dva kmeny *C. albicans* – laboratorní kmen SC5314 a kmen 1173 získaný z klinického izolátu. Kmen SC5314 patří k nejvíce používaným laboratorním kmenům. V roce 2004 byla dokončena sekvenace genomu tohoto diploidního kmene (Jones et al. 2004). Velikost genomu tohoto kmene má velikost 14,3 Mb a jeho sekvence je dostupná na adrese:

<http://www.candidagenome.org/>

Kmen 1173 byl získán v Bratislavě z klinického izolátu od pacienta trpícího alergií (Melkusová et al. 2004).

Další dva kmeny, které se objevili v naší práci, jsou BWP17 a BWOZ13-81. Kmen BWP17 je derivát kmene SC5314 s auxotrofními mutacemi *his⁻ arg⁻ ura⁻* (Wilson et al. 1999). Z kmene BWP17 je pak odvozen kmen BWOZ13-81. Tento kmen je homozygotní mutant s delecí genu *cnh1/cnh1*. Tento kóduje Cnh1 Na⁺/H⁺ antiporter, který se podílí na regulaci homeostáze draselných iontů *C. albicans* (Kinclová-Zimmermanová & Sychrová 2007).

2.1.2 CANDIDA DUBLINIENSIS

C. dubliniensis byla objevena v roce 1995 v izolátu z dutiny ústní pacienta s AIDS. Její druhové jméno „dubliniensis“ souvisí s místem objevu – Dublínem (Sullivan et al. 1995). *C. dubliniensis* se vyskytuje jako součást lidské mikroflóry. Nejčastěji byl tento druh izolován z dutiny ústní zdravých i imunokompromitovaných pacientů. Právě záněty sliznic dutiny ústní vyvolává *C. dubliniensis* nejčastěji. Jen vzácně tento druh způsobuje záněty urogenitálního traktu a

candidémie (Sullivan et al. 2005). Většina klinických izolátů *C. dubliniensis* je *in vitro* rezistentní vůči azolovým antimykotikům (Moran et al. 1998).

C. dubliniensis je druh velmi fylogeneticky blízký *C. albicans*. Oproti *C. albicans* je však *C. dubliniensis* méně virulentní (Stokes et al. 2007) a méně halotolerantní (Krauke & Sychrová 2008). *C. dubliniensis* je schopna tvořit pravé mycelium i biofilm.

Kompletní sekvenace genomu *C. dubliniensis* byla dokončena v roce 2009. Pro sekvenaci byl vybrán kmen CD36, který jsme zařadili i do naší práce. *C. dubliniensis* je diploidní organismus, velikost genomu je 14,6 Mb, počet chromozomů 13 (Jackson et al. 2009).

Databáze genomu *C. dubliniensis* je dostupná na adrese:

<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>

2.1.3 CANDIDA PARAPSILOSIS

Poprvé byl druh *Candida parapsilosis* izolován v roce 1928 v Portoriku ze stolice pacienta trpícího katarom gastrointestinálního traktu. Od tehdy již známého druhu *Monilia psilosis* (dnes *C. albicans*) se nově objevený druh lišil neschopností fermentovat maltosu. Tato odlišnost mu dala i druhové jméno (Ashford 1928). *C. parapsilosis* je přirozenou součástí lidské mikroflóry kůže a sliznic, ale vyskytuje se i ve volném prostředí např. v mořské vodě (Butinar et al. 2005).

Do roku 1940 byla *C. parapsilosis* považována za nepatogenní druh. V tomto roce byla *C. parapsilosis* označena jako původce fatální endocarditidy u pacienta s porušenou imunitou vlivem toxikomanie. Výskyt klinických izolátů tohoto druhu rezistentních k azolovým antimykotikům je velmi vzácný, přesto počet případů candidémií způsobených *C. parapsilosis* roste. *C. parapsilosis* prosperuje i v emulzích určených pro totální parenterální výživu, což činí z tohoto druhu nebezpečného původce nosokomiálních infekcí. (Trofa et al. 2008).

C. parapsilosis není na rozdíl od jiných druhů *Candida* schopna tvořit pravé mycelium. Roste pouze ve formě kvasinek nebo pseudomycelia. Absence pravého mycelia má za následek menší pevnost a objem biofilmu tohoto druhu ve srovnání s *C. albicans* (Kuhn et al. 2002).

C. parapsilosis je diploidní organismus, genom kmene *C. parapsilosis* CBS604, který byl zařazen do této práce, byl již kompletně sekvenován. Velikost genomu *C. parapsilosis* činí 13,1 Mb a je rozdělen do 8 chromozomů (Butler et al. 2009). Příslušná databáze je dostupná na adrese:

<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>

2.1.4 CANDIDA GLABRATA

Také *C. glabrata* je běžnou součástí mikroflóry lidské kůže i sliznic dutiny ústní a urogenitálního traktu. Ještě v polovině minulého století nebyl tento druh považován za významného patogena. Dnes je v závislosti na oblasti *C. glabrata* druhým až třetím nejvýznamnějším původcem lokálních candidos i candidemií (Csank & Haynes 2000). K nárůstu počtu výskytů tohoto druhu pravděpodobně vedl selekční tlak vyvolaný azolovými antimykotiky, ke kterým je *C. glabrata* rezistentní (Fidel et al. 1999).

C. glabrata, obdobně jako *C. parapsilosis*, nevytváří pravé mycelium. Roste pouze ve formě kvasinek, nebo pseudomycelia. *C. glabrata* je schopna tvořit biofilm, avšak její virulence je v porovnání s *C. albicans* menší (Li et al. 2007).

Kmen *C. glabrata* ATCC2001 používaný i v naší práci byl kompletně sekvenován v rámci projektu Génolevures. Velikost haploidního genomu *C. glabrata* je 12,3 Mb. Genom je rozdělen do 13 chromozomů (Dujon et al. 2004). Analýza genomu tohoto druhu dokázala, že *C. glabrata* je více příbuzná se *Saccharomyces cerevisiae* než s *C. albicans*, a je tedy fylogeneticky nejbližším patogenním druhem rodu *Candida* (Fitzpatrick et al. 2006). V porovnání se *S. cerevisiae* nacházíme u *C. glabrata* méně genů spojených s metabolismem živin. Tento projev regresivní evoluce pravděpodobně souvisí adaptací *C. glabrata* na komensalismus (Kaur et al. 2005). Na druhou stranu byly u tohoto druhu objeveny geny související s virulencí, které se vyskytují i u dalších patogenních druhů *Candida* (Butler et al. 2009).

Databáze genomu *C. glabrata* je k dispozici na adrese:

<http://www.genolevures.org/cagl.html>

2.2 HOMEOSTÁZE IONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ

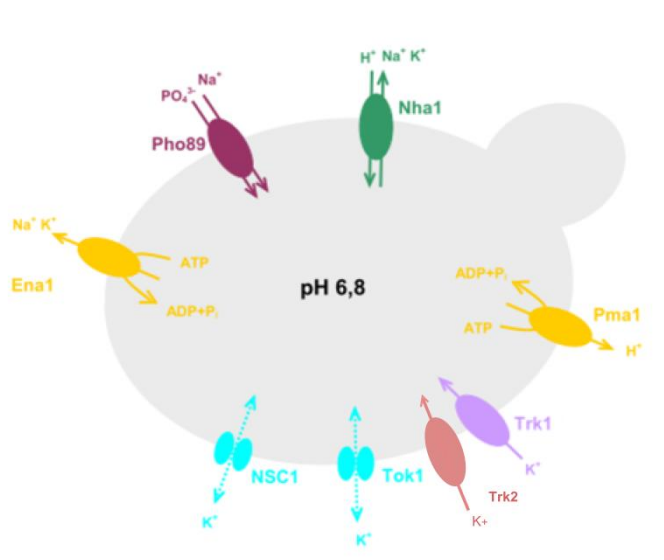
Jednou ze základních podmínek života všech organismů je udržování stálých koncentrací iontů uvnitř buněk. Vnitrobuněčné anorganické kationty a anionty se účastní mnoha fyziologických procesů, včetně adaptace buněk ke změnám ve vnějším prostředí. Všechny buňky vynakládají velké množství energie na udržování iontové homeostáze. Klíčovou roli v iontové homeostázi hrají sodné a draselné kationty. Všechny buňky udržují nízkou intracelulární koncentraci sodných iontů, které jsou pro buňky toxické, a naopak se snaží koncentrovat uvnitř buňky ionty draselné. Optimální intracelulární koncentrace draselných iontů v kvasinkách leží v intervalu 200-300 mM, přičemž extracelulární koncentrace draselných iontů je většinou v řádech μM (Sychrová 2004). Draselné ionty se zapojují do mnoha fyziologických procesů - účastní se regulace objemu a pH buňky, vyrovnávají negativní náboj mnoha makromolekul, jsou důležité pro udržení membránového potenciálu, syntézu proteinů aj. (Arino et al 2010).

Studium iontové homeostáze na molekulární úrovni umožnil rozvoj metod molekulární biologie. Sekvence genomu kvasinek umožnila popsat vlastnosti jednotlivých genů účastnících se iontové homeostáze. Nejlépe jsou principy regulace homeostáze prozkoumané u *Saccharomyces cerevisiae*.

K udržení fyziologického poměru koncentrací draselných a sodných iontů využívají kvasinky tři různé strategie. (1) Regulace vstupu kationtů do buňky - zde se uplatňují transportéry, které mají výrazně vyšší afinitu k draselným iontům, (2) účinný export nežádoucích kationtů z buňky a (3) sekvestrace iontů do buněčných kompartmentů (Arino et al. 2010). Ve všech těchto procesech hrají důležitou roli transportní systémy.

2.2.1 MEMBRÁNOVÉ TRANSPORTÉRY

V plasmatické membráně *Saccharomyces cerevisiae* bylo popsáno 6 transportních systémů podílejících se na udržení iontové homeostáze (Obr. 3), (Sychrová 2004).



Obr. 3 Transportní systémy cytoplasmatické membrány *S. cerevisiae* upraveno podle Sychrové (2004)

H^+ -ATPasa

Esenciální roli v iontové homeostáze u *S. cerevisiae* hraje H^+ -ATPasa s názvem Pma1. Tento transportér využívá energii hydrolytického štěpení ATP k aktivnímu transportu H^+ ven z buňky. Generuje tím gradient koncentrace H^+ , který je podmínkou pro funkci mnoha dalších transportérů a pro tvorbu membránového potenciálu. Gen *PMA1* je pro *S. cerevisiae* esenciální (Arino et al. 2010).

Na^+/H^+ antiporter

Jedním ze systémů využívající protonový gradient je Na^+/H^+ antiporter, který exportuje sodné a draselné kationty ven z buňky výměnou za protony. Podílí se tedy nejen na regulaci koncentrace iontů alkalických kovů, ale i vnitrobuněčného pH. Antiporter Nha1 v *S. cerevisiae* disponuje širokou substrátovou specifitou. Je schopen přenášet sodné, draselné, lithné i rubidné ionty. (Banuelos et al. 1998, Kinclová et al. 2001).

Na^+/H^+ antiporter *C. albicans* nese jméno Cnh1. Stejně jako Nha1 může Cnh1 disponovat širokou substrátovou specifitou (Kinclova et al. 2002), nicméně ve fyziologii *C. albicans* je

zapojen především do regulace homeostáze draselných iontů. V regulaci koncentrace iontů sodných hraje Cnh1 jen okrajovou úlohu (Kinclova-Zimmermanova & Sychrova 2007).

Na^+/H^+ antiportery druhů *C. dubliniensis* (CdCnh1) a *C. parapsilosis* (CpCnh1) byly charakterizovány pomocí heterologní exprese v *S. cerevisiae*. CdCnh1 i CpCnh1 byly schopny transportovat sodné, draselné, lithné i rubidné ionty. Měřením výstupů Na^+ a K^+ byla odhalena rozdílná aktivita obou antiporterů. Větší aktivitu vykazoval transportér CpCnh1 halotolerantního druhu *C. parapsilos*. Naopak antiporter CdCnh1 halosenzitivního druhu *C. dubliniensis* vykazoval aktivitu nižší. Aktivita Na^+/H^+ antiporteru může být jedním z důležitých faktorů ovlivňující halotoleranci různých druhů *Candida* (Krauke & Sychrová 2008).

Na^+ -ATPasa

ATPasy plasmatické membrány *S. cerevisiae* (Ena1-4) exportují z buňky nadbytečné kationty s využitím energie získané štěpením ATP. Obdobně jako Na^+/H^+ antiporter disponuje i Na^+ -ATPasa Ena1 v *S. cerevisiae* širokou substrátovou specifikou a přenáší sodné, draselné, lithné i rubidné ionty (Banuelose et al. 1998). V *S. cerevisiae* jsou Na^+ -ATPasy kódovány repeticí několika téměř identických genů a jsou to hlavní systémy pro detoxifikaci Na^+ (Garcia-deblás et al. 1993, Wieland et al. 1995).

Funkce Na^+ -ATPasy a Na^+/H^+ antiporteru se navzájem v *S. cerevisiae* doplňují. Na^+ -ATPasa je aktivní v prostředí s vyšším pH, naopak Na^+/H^+ antiporter umožňuje exportovat kationty v prostředí s nižším pH a tudíž s větším gradientem protonů přes membránu (Banuelos et al. 1998).

Trk1, Trk2

Pro aktivní vstup kationtů draslíku do buněk slouží u *S. cerevisiae* proteiny Trk1 a Trk2. Oba transportéry se liší svou aktivitou. V přítomnosti obou funkčních genů převažuje exprese genu *TRK1*, který je považován za hlavní transportér umožňující vstup K^+ do buňky (Arino et al. 2010).

Tok1, NSC1

Tok1p je napětově řízený kanál plasmatické membrány *S. cerevisiae* pro draselné kationty. Hlavní úlohou Tok1 je exportovat draselné ionty z buňky a podílet se na regulaci

membránového potenciálu. Za určitých podmínek se však tok iontů může obrátit (Fairman et al., 1999). Delece genu kódujícího Tok1 vede k depolarizaci membrány (Marešová et al. 2006). NSC1 (non-selective cation channel) je neselektivní nízkoafinní iontový kanál schopný transportovat do buněk širokou škálu kationtů včetně K^+ , Li^+ a NH_4^+ (Bihler et al. 2002). Přestože byla aktivita tohoto kanálu detailně elektrofyziologicky popsána, nepodařilo se dosud nalézt gen kódující tento transportér.

2.2.2 IONTOVÁ HOMEOSTÁZE A OSMOTICKÝ STRES

V centru naší pozornosti je schopnost *Candida* vyrovnat se stresem vyvolaný nadbytkem iontů či elektroneutrálních solutů (sorbitol) v médiu, neboli schopnost reagovat na osmotický stres. *Candida* obdobně jako ostatní jednobuněčné organismy se musí neustále přizpůsobovat změnám osmotického tlaku vnějšího prostředí.

Osmotický tlak je definován jako tlak toku rozpouštědla pronikajícího přes semipermeabilní membránu do roztoku, ve kterém je vyšší koncentrace rozpuštěných molekul nebo iontů. Pokud se buňka dostane do prostředí s nízkou koncentrací solutů, začne proudit voda do buňky a buňka praskne. Tento jev je známý jako hypoosmotický šok. Naopak v prostředí s vysokou koncentrací iontů, nebo jiných solutů začne voda z buňky unikat a dochází k smrštění buňky - nastává hyperosmotický šok.

Ke kompenzaci hyperosmotického šoku využívají kvasinky glycerol, který snadno syntetizují a následně kumulují uvnitř buňky. Produkce glycerolu a další mechanismy kompenzace osmotického stresu jsou řízeny signální dráhou HOG (high-osmolarity glycerol pathway). HOG kaskáda je jednou z nejlépe prostudovaných signálních drah spojených s MAP kinasami. Tyto dráhy se účastní regulace růstu buňky, proliferace, morfogeneze a odpovědi na stres pravděpodobně u všech eukaryotních buněk (Hohmann 2007).

Klíčový prvkem dráhy HOG je Map kinasa Hog1, která po aktivaci vstupuje do jádra buňky a zde ovlivňuje expresi stovek genů. K aktivaci kinasy Hog1 dochází až po dvou předcházejících fosforylacích, které mohou být odpovědí na různé podněty. Po vstupu kinasy Hog1 do jádra začíná buňka produkovat glycerol, který je kumulován a pomáhá vyrovnat vnější osmotický tlak. Po dobu hyperosmotického stresu se také uzavírá porin exportující glycerol Fps 1 (Hohmann 2007). Kinasa Hog1 také reguluje aktivitu Na^+/H^+ antiporteru, Na^+ -ATPasy a dalších transportérů, tak aby buňka byla schopná udržet iontovou homeostázi (Arino et al. 2010).

2.3 ANTIMYKOTICKY AKTIVNÍ LÁTKY

Antimykotika jsou látky, které usmrcují houbové organismy, zpomalují jejich růst nebo působí preventivně proti jejich rozšíření (Rozsypal 2008). Všechny buňky hub včetně kvasinek jsou eukaryotické a ve srovnání s bakteriemi a viry jsou velmi podobné buňkám lidským. Nejvíce rozdílné jsou u lidských a houbových buněk buněčné bariéry. Houbové buňky na rozdíl od lidských jsou obklopené buněčnou stěnou, jejímž základním stavebním kamenem je chitin. Rozdílné je i složení a struktura cytoplasmatické membrány. Buněčná stěna a cytoplasmatická membrána jsou proto cílové struktury většiny antimykotik. Zacílení antimykotik na buněčné bariéry zajišťuje selektivitu antimykotické aktivity. Nejvýznamnějšími skupinami antimykotik poškozující buněčné bariéry používané ve farmakoterapii jsou polyenová antimykotika, echinokandiny, allylaminy a azolová antimykotika.

Antimykotickou aktivitou se vyznačuje celá řada látek, které nejsou využity ve farmakoterapii mykoinfekcí. Patří k nim např. různé desinfekční prostředky, látky využívané ve farmaceutické technologii, fluorescenční barviva. V neposlední řadě může být odhalena antimykotická aktivita u látek s původně odlišnou indikací. Příkladem takové látky je amiodaron (Courchesne 2002).

2.3.1 AZOLOVÁ ANTIMYKOTIKA

Azolová antimykotika jsou nejpoužívanější léčiva v terapii a profylaxi systémových mykoinfekcí. První azolové antimykotikum mikonazol bylo uvedeno do praxe v roce 1967. Od 80. let minulého století se začaly prosazovat azoly, zejména ketokonazol, v terapii systémových mykoinfekcí. Od této doby také začíná stoupat výskyt kmenů rezistentních vůči azolovým antimykotikům (Rozsypal 2008).

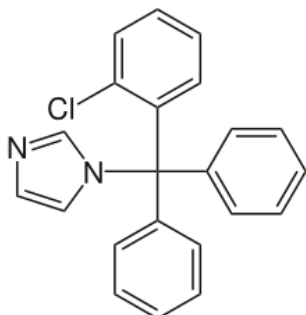
Všechny azoly mají shodný mechanismus účinku, jehož princip spočívá v inhibici syntézy ergosterolu – důležité složky cytoplasmatické membrány hub. Koncentrace ergosterolu ovlivňuje fluiditu a integritu cytoplasmatické membrány. Azolová antimykotika inhibují enzym 14 α -demethylasu, která je spojena s cytochromem P450. U kvasinek azoly blokují aktivní centrum enzymu vazbou mezi dusíkem imidazolového nebo triazolového kruhu a atomem železa cytochromu P450 (Odds et al. 2003). Výsledkem je kumulace nefunkčních methylovaných prekurzorů v membráně a deplece ergosterolu, která vede k zastavení růstu buňky (Sheehan et al. 1999).

Azolová antimykotika interagují nejen s cytochromem P450 buněk hub, ale i s lidskými cytochromy P450 podílejících se na metabolismu xenobiotik (osatních léčiv). Tato interakce může vést ke změnám farmakokinetiky léčiv, na jejichž metabolismu se cytochromy P450 podílejí.

Indikace azolových antimykotik se liší podle jejich chemické struktury. Starší imidazolové deriváty nacházejí uplatnění v terapii dermálních mykoinfekcí. Triazoly jsou pak určeny k léčbě a prevenci systémových onemocnění.

2.3.1.1 IMIDAZOLY

Do této skupiny patří azolová antimykotika s imidazolovým kruhem ve struktuře. Látky první generace jsou nejstaršími azolovými antimykotiky vůbec. Předlohou strukturou pro další vývoj azolů se stal mikonazol. Mikonazol byl již překonán triazolovými deriváty a dnes se nevyrábí. Někteří zástupci první generace imidazolů však nacházejí dodnes uplatnění v léčbě lokálních candidos. Jedná se především o klotrimazol (Obr. 4) a ekonazol. Klotrimazol je v ČR vůbec nejpoužívanějším topickým antimykotikem. (SÚKL: spotřeba léčiv v ČR za rok 2009).



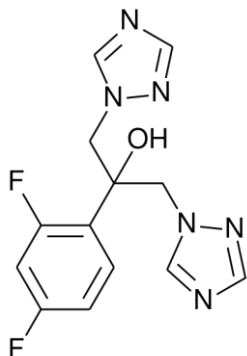
Obr. 4 Chemická struktura klotrimazolu (Hartl et al. 2006)

Mezi nejvýznamnější zástupce imidazolových antimykotik druhé generace patří ketokonazol. Tato látka byla použita jako první perorální systémové antimykotikum a znamenala průlom v léčbě i profylaxi systémových mykoinfekcí (Rozsypal 2008).

2.3.1.2 TRIAZOLY

Výměnou imidazolového kruhu za triazolový byla získána v polovině 80. let minulého století nová skupina syntetických systémových antimykotik. Dnes nejrozšířenější systémová antimykotika v ČR (flukonazol, itrakonazol) patří právě mezi triazoly, (SÚKL: spotřeba léčiv v ČR

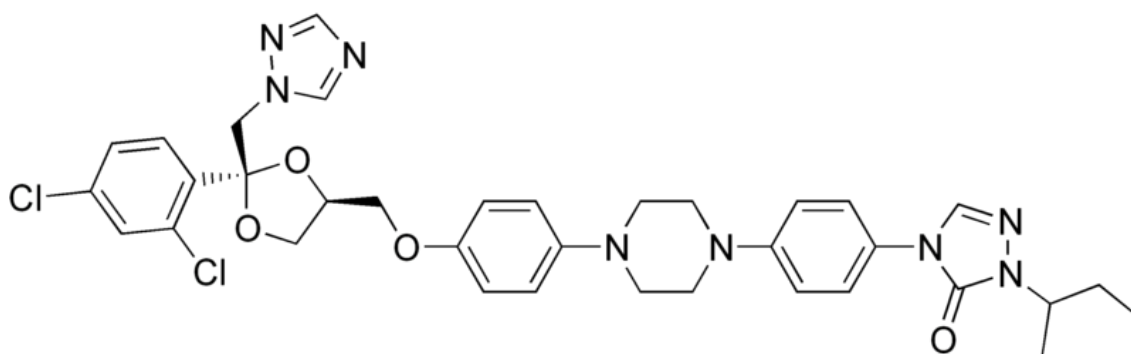
za rok 2009). Flukonazol je odvozen o struktury klotrimazolu, ale atom chloru byl nahrazen dvěma atomy fluoru a ve struktuře se již vyskytují dva triazolové kruhy (Obr. 5).



Obr. 5 Chemická struktura flukonazolu upraveno podle Hartla et al. (2006)

Od ostatních azolů se flukonazol liší farmakokinetikou. Díky své hydrofilitě má největší terapeutický index, nejméně nežádoucích účinků a nejnižší interakční potenciál. Flukonazol se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu a proniká do všech tkání a tekutin. Nežádoucí účinky flukonazolu jsou většinou mírné a zahrnují exantém, dyspepsie a bolesti hlavy (Lincová et al. 2007)

Itrakonazol má ve srovnání s flukonazolem větší molekulu, což výrazně ovlivňuje jeho farmakokinetické vlastnosti (Obr. 6). Itrakonazol je ve vodě nerozpustný. Jeho absorpci významně ovlivňuje pH žaludku a je proto velmi nestabilní (Doležal & Buchta 2006). Itrakonazol disponuje silnější antimykotickou aktivitou a širším spektrem účinnosti než flukonazol (Maertens & Boogaerts 2005).



Obr. 6 Chemická struktura itrakonazolu (Hartl et al. 2006)

Nejnovější triazolovými deriváty jsou vorikonazol a posakonazol. Velmi perspektivní látkou je vorikonazol. Spektrum účinku této látky se podobá itrakonazolu, ale farmakokinetické parametry se naopak blíží flukonazolu. Posakonazol je hydroxylovaný derivát itrakonazolu s vystupňovanou antivykotickou aktivitou (Doležal & Buchta 2006).

2.3.2 OSTATNÍ ANTIMYKOTIKA

Polyenová antimykotika jsou produkty metabolismu některých druhů bakterií a plísní. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě polyenů na ergosterol s následnou desintegrací plasmatické membrány (Chen & Sorell 2007). Charakteristickým znakem struktury polyenů je 26-40 členný makrocyclický laktonový kruh (Hartl et al. 2006). Nejvýznamnějším zástupcem polyenů je systémové antimykotikum amfotericin B. Přednostmi amfotericinu B je silná antimykotická aktivita proti širokému spektru patogenů a nízký výskyt rezistencí. Nevýhodou amfotericinu B je především jeho silná toxicita. Amfotericin B indukuje produkci prostaglandinů a interleukinů, které jsou zodpovědné za projevy akutní toxicity (horečka, bolesti hlavy, svalů a kloubů, nauzea, alergické reakce). Amfotericin B se dále vyznačuje silnou nefrotoxicitou. Zástupci topických polyenových antimykotik jsou nystatin a natamycin (Lincová et al. 2007).

Echinokandiny patří mezi nejnovější antimykotika. Podstatou jejich fungicidního účinku je blokáda syntézy 1,3 β -D glukanu vedoucí k porušení buněčné stěny hub. Nežádoucí účinky nejsou díky vysoké antimykotické specifitě účinku časté. Echinokandiny jsou indikovány při systémových mykoinfekcích v kombinaci s amfotericinem B nebo azoly. Zároveň jsou echinokandiny také lékem volby při intoleranci amfotericinu B. Ze zástupců echinokandinů jmenujme kaspofungin a mikafungin (Espinel-Ingroff 2009).

Nejvýznamnějším zástupcem allylaminů je terbinafin. Terbinafin inhibuje enzym skvalen epoxidasu, čímž blokuje syntézu ergosterolu (Odds et al. 2003). Terbinafin je silně lipofilní a keratofilní, což vede k jeho kumulaci v tukové tkáni, v kůži a jejích adnexech (vlasový folikul, nehet). Tyto vlastnosti ho předurčují k léčbě závažných onychomykos, tineí a lokálních infekcí způsobených *Candidami* (Lincová et al. 2007).

Antifungální aktivitu vykazují i látky, jejichž mechanismus účinku nespočívá v napadání buněčných bariér. Do praxe se prosadil antimetabolit flucytosin, který je indikován v kombinaci s amfotericinem nebo azoly k léčbě systémových mykoinfekcí. Dalším zástupcem antimykotik

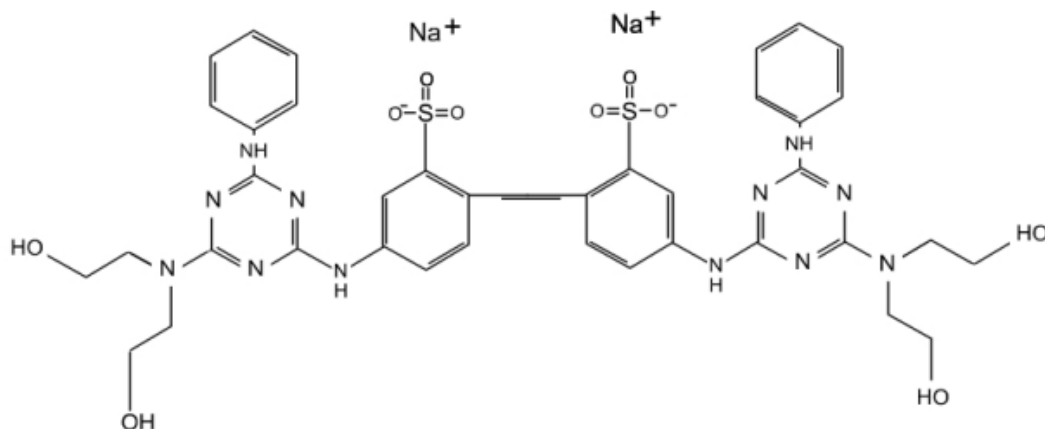
využívaných ve farmakoterapii je griseofulvin, který způsobuje denaturaci mikrotubulů (Lincová et al. 2007).

2.3.3 JINÉ ANTIMYKOTICKY AKTIVNÍ LÁTKY

Do naší práce jsme zařadili i antimykoticky aktivní látky, které však nejsou využity v terapii infekcí vyvolaných houbovými organismy. Jedná se o fluorescenční barvivo calcofluor white, široce využívaný detergent dodecylsírán sodný a antiarytmikum amiodaron. Poslední látka, u které nás zajímala antimykotická aktivita, je phenytoin. Postavení phenytoinu mezi ostatními látkami zařazenými do této práce je výjimečné, protože u něj doposud nebyla prokázána antimykotická aktivita.

2.3.3.1 CALCOFLUOR WHITE

Calcofluor white (CFW) patří mezi fluorescenční barviva. Jeho emisní vlnová délka je 455 nm. Specificky se váže na chitin a celulosu, čímž umožňuje jejich vizualizaci. Chemická struktura CFW obsahuje rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb, které jsou zodpovědné za fluorescenci CFW (Obr. 7), (Konířová 2008).



Obr. 7 Chemická struktura calcofluor white

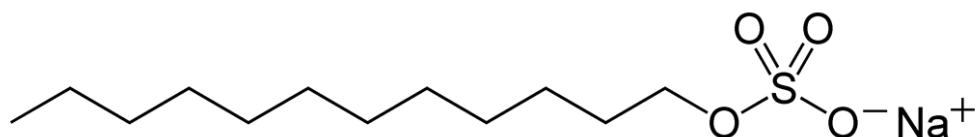
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/ChemInfo.jsp?calledFrom=lite&type= formulas>

Antimykotická aktivita CFW spočívá v blokádě polymerace chitinu – základní stavební složky buněčné stěny hub. CFW se díky této vlastnosti nepoužívá jen ke zobrazení chitinových či

celulosových struktur, ale i jako stresor poškozující buněčnou stěnu. CFW neprochází cytoplasmatickou membránou. Protoplasty pěstované v izotonickém roztoku nebyly vůči CFW citlivé (Roncero & Duran 1985).

2.3.3.2 DODECYLSÍRAN SODNÝ

Dodecylsírán sodný (laurylsírán sodný, SDS) je látka široce využívaná ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Patří mezi aniontové tenzidy, které ve vodném prostředí disociují na objemný, povrchově aktivní aniont a menší kationt tvořený většinou alkalickým kovem. Ve struktuře aniontu rozeznáváme dlouhý alifatický řetězec tvořící nepolární část molekuly a silně polární strukturu síranu (Obr. 8).



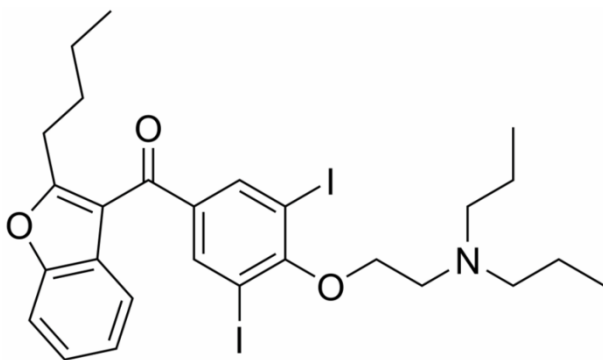
Obr. 8 Chemická struktura dodecylsíránu sodného (Komárek et al. 2006)

Díky amfifilní povaze má tato látka schopnost hromadit se na rozhraní fází (voda – olej, voda – vzduch), což ve výsledku vede ke snížení povrchového napětí. Tento mechanismus se uplatňuje v technologii léků i kosmetiky zejména při smáčení a stabilizaci emulzí či suspenzí (Komárek et al. 2006).

Antimykotický, ale i antibakteriální a antivirotický účinek SDS souvisí se schopností kumulovat se na rozhraní fází. SDS se koncentruje na buněčných bariérách a mění energetické poměry na jejich povrchu, což má za následek destabilizaci buněčné stěny i cytoplasmatické membrány. Druhým mechanismem účinku SDS je iniciace denaturace membránových proteinů (Piret et al. 2000).

2.3.3.3 AMIODARON

Amiodaron je významné antiarytmikum III. třídy. Mechanismus účinku amiodaronu na myokard spočívá v blokádě draselných kanálů. Blokáda výstupu draselných kationtů vede k prodloužení akčního potenciálu buněk myokardu. Amiodaron je indikován u komorových i supraventrikulárních tachyarytmií. Vyznačuje se mimořádně dlouhým eliminacíním poločasem, který se pohybuje v intervalu 30 – 50 dnů. Díky vysoké lipofilitě molekuly (Obr. 9) se amiodaron kumuluje v tukových tkání, kde persistuje ještě desítky dnů po ukončení terapie. Nevýhodou amiodaronu jsou četné nežádoucí účinky. Mezi nejzávažnější patří poškození štítné žlázy, plicní fibrosa a hepatotoxicita. Dalším rizikovým faktorem léčby amiodaronem je jeho vysoký interakční potenciál na úrovni jaterních cytochromů P 450, které se podílejí na eliminaci amiodaronu (Lincová et al. 2007).



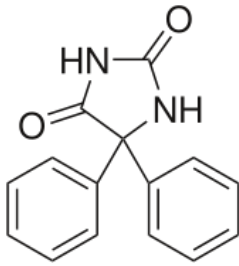
Obr. 9 Chemická struktura amiodaronu upraveno podle <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01118>

Antimykotická aktivita amiodaronu byla objevena v roce 2001 (Courchesne 2002). Mechanismus účinku amiodaronu u houbových buněk spočívá v narušení homeostáze vápníku. Amiodaron indukuje v závislosti na dávce hyperpolarizaci cytoplasmatické membrány a následně vtok vápenatých a výtok draselných iontů, což vede k iontovému rozvratu a smrti (Gupta et al 2003, Marešová et al. 2008).

2.3.3.4 PHENYTOIN

Phenytoin (Obr. 10) patří mezi antikonvulsiva. Je účinný především proti tonicko-klonickým křečím. Hlavní mechanismus účinku phenytoinu spočívá v blokádě sodíkových kanálů neuronu. Phenytoin brání vysokofrekvenčním změnám polarity v neuronech, jež jsou typické pro epileptické záchvaty. Riziko léčby phenytoinem spočívá v jeho interakčním potenciálu. Tato

látku je silným induktorem jaterních cytochromů P450, což vede k ovlivnění plasmatických hladin léčiv podávaných současně s phenytoinem.



Obr. 10 Chemická struktura phenytoinu upraveno podle Hartla et al. (2006)

V 70. letech minulého století byl phenytoin používán v terapii arytmií. Podobně jako lidocain zkracuje phenytoin trvání akčního potenciálu a refrakterní fáze (Rozen & Hoffman 1973). Byla zkoumána také antimykotická aktivita phenytoinu (Esiobu & Hoosein 2003), ale nebylo prokázáno, že přítomnost phenytoinu má vliv na růst houbových mikroorganismů. Do naší práce jsme zařadili phenytoin kvůli jeho schopnosti blokovat sodné kanály buněk myokardu a neuronů. Předpokládali jsem, že pokud má phenytoin afinitu i ke k transportérům sodných kationtů *Candida*, mohl by se jeho antimykotický účinek projevit v prostředí s vyšší koncentrací sodných, či draselných kationtů.

2.4 REZISTENCE *CANDID* K AZOLOVÝM ANTIMYKOTIKŮM

Jak již bylo zmíněné výše, s nástupem ketokonazolu do praxe v 80. letech začal narůstat počet izolovaných kmenů *Candida* rezistentních k azolovým antimykotikům (Rozsypal 2008, Ruhnke 2006). Vlivem pozitivní selekce se stále častěji vyskytují infekce způsobené tzv. non-albicans druhy, které vynikají právě rezistencí k azolům. Azolová antimykotika jsou přitom v současnosti nejpoužívanější prostředky v terapii povrchových i systémových onemocnění vyvolaných houbovými mikroorganismy (Ruhnke 2006, De Rosa et al. 2009).

Vznik rezistence souvisí s mechanismem účinku, který je společný všem azolovým antimykotikům. Azoly inibují enzym 14 α -demethylasu, kódovanou genem *ERG11*. Reakce katalyzovaná tímto enzymem vede k demethylaci prekursorů ergosterolu (Odds 2003). Dochází k hromadění substrátu lanosterolu a nedostatku ergosterolu, což vede k zastavení růstu buňky (Kelly et al. 1997).

Mechanismů vzniku rezistence k azolovým antimykotikům bylo posáno několik. Jedná se o změnu v syntetické dráze sterolů, změnu struktury cílového enzymu, zvýšení exprese genu *ERG11* a zvýšenou produkce systémů, které umožňují efektivní transport azolů z buňky. Rezistence k azolům může vzniknout jen jedním popsaným mechanismem, ale častěji se uplatňuje kombinace několika z nich (Casalinuovo et al. 2004). Jednotlivé mechanismy budou v následujícím textu popsány podrobněji.

V případě blokády 14 α -demethylasy azolovým antimykotikem mohou *Candidy* využít alternativní cesty metabolismu, což vede ke vzniku rezistence. Takový mechanismus se uplatňuje u kmenů s nefunkčním genem *ERG 3*. Tento kmen kóduje enzym sterol $\Delta^{5,6}$ desaturasu. Pokud je 14 α -demethylasa blokována azolem, dochází k hromadění prekursorů ergosterolu, které inhibují růst buňky. Pokud je však současně nefunkční enzym sterol $\Delta^{5,6}$ desaturasa, buňka produkuje 14 α -methylfekosterol, který inhibičně nepůsobí (Kelly et al. 1997). Příklad, kde se tento mechanismus uplatňuje, je rezistence *C. dubliniensis* k itrakonazolu (Pinjon et al. 2003).

Bodové mutace genu *ERG 11*, který kóduje 14 α -demethylasu, je jednou z nejčastějších příčin rezistence *Candida* k azolům, zejména flukonazolu. Bodové mutace genu *ERG 11* způsobují změnu ve struktuře enzymu 14 α -demethylasy, což vede k oslabení afinity azolů k tomuto

enzymu (Casalino et al. 2004). Bodové mutace genu *ERG 11* jsou příčinou vzniku rezistence mnohých izolátů *C. albicans* a byly popsány i u *C. dubliniensis* (Sullivan 2004).

Další mechanismus vzniku rezistence k azolům u *Candida* je zvýšená exprese genu *ERG 11*. Pomocí tohoto mechanismu se buňky snaží nahradit enzymy zablokované azoly a obnovit syntézu chybějícího ergosterolu (Casalino et al. 2004). U kmenů *C. albicans* rezistentních k flukonazolu byly popsány zmnožené isochromosomy nesoucí gen *ERG 11* (Selmecki et al. 2008). Zvýšená exprese genu *ERG 11* byla pozorována i u druhu *C. dubliniensis* (Pinjon 2003). V přítomnosti flukonazolu se mění exprese nejen genu *ERG 11*, ale i dalších genů, které kódují enzymy účastnící se syntézy ergosterolu. Porovnání exprese různých genů patřících do této skupiny u klinických izolátů *C. albicans* a *C. dubliniensis* odhalilo změny exprese jednotlivých genů vyvolané flukonazolem. Změny exprese genů se u jednotlivých kmenů výrazně lišily. Např. u klinického izolátu *C. albicans* 1173, který je předmětem této práce, došlo v přítomnosti flukonazolu ke zvýšení exprese genů *ERG 11* a *ERG 9*, který kóduje skvalen synthasu. (Borecká-Melkusová et al. 2008)

Čtvrtým mechanismem, který se velmi často podílí na rozvoji rezistence *Candida* k azolovým antimykotikům je exprese transportních mechanismů, které dokážou aktivním transportem účinně snížit vnitrobuněčnou koncentraci cizorodých látek. Transportéry zajišťující detoxifikaci buněk jsou dvojího typu. První se nazývají ATP-Binding Cassette transporters (ABC transportéry), které získávají energii potřebnou k transportu hydrolýzou ATP. Druhou skupinu tvoří Major Facilitators Superfamily (MSF transportéry), kterým jako zdroj energie pro transport slouží protonový gradient (Casalino et al. 2004).

V současné době byly popsány geny kódující tyto transportéry u různých druhů *Candida*. Nejlépe prostudované geny kódující ABC transportéry jsou *CDR1* a *CDR2* (Candida Drug Resistance) u druhu *C. albicans*. Tyto geny se podílejí na vzniku rezistence vůči různým azolovým antimykotikům (Sanglard et al. 1996). Zástupcem genů kódující u *C. albicans* MSF transportéry je gen *MDR1* (Multidrug Resistance). Transportér kódovaný tímto genem je zodpovědný specificky za rezistenci vůči flukonazolu. Jeho exprese neovlivnila rezistenci *C. albicans* k ostatním azolům (Sanglard et al. 1995). Homology výše popsaných genů byly popsány i u druhu *C. dubliniensis*, u kterého podobně jako u *C. albicans* hrají důležitou roli v rezistenci k azolům (Moran et al. 1998). Přítomnost azolových antimykotik indukuje zvýšenou expresi genů kódující ABC nebo MSF transportéry. U druhu *C. glabrata* byly pozorovány

rozsáhlé změny genomu vedoucí k větší produkci ABC a MSF transportérů. U kmenů rezistentních k flukonazolu docházelo k duplikaci rozsáhlých částí chromosomální DNA i k formaci chromosomů nových. Nejčastěji podléhaly změnám chromosomy nesoucí geny související s virulencí tohoto druhu a kódující ABC i MSF transportéry (Poláková et al. 2008).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Pro kultivaci buněk byla použita média se složením:

- YPD: 1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glukosa
- YNB-K⁺: 0,17% yeast nitrogen base bez aminokyselin, 0,5% síran amonný, 2% glukosa, obsah K⁺ max. 15 μM

3.1.2 KMENY KVASINEK

V této práci byly použity následující kmeny rodu *Candida albicans*: laboratorní kmen SC5314, od něj odvozený kmen BWP17 s auxotrofními mutacemi *his⁻ arg⁻ ura⁻*, kmen 13-81 odvozený od kmene BWP17 s delecí genu *cnh1/cnh1* a klinický izolát 1173 rezistentní k flukonazolu. Dále jsme pracovali s divokým kmenem *Candidy dubliniensis* CD36, divokým kmenem *Candidy parapsilosis* CBS604 a divokým kmenem *Candidy glabrata* ATCC2001. Přehled použitých kmenů s genotypy a referencemi uvádí tabulka 1.

Tab. 1 Přehled použitých kmenů kvasinek

kmen:	genotyp:	reference:
<i>Candida albicans</i> SC5314	divoký typ	sbírka CBS (CBS 8758)
<i>Candida albicans</i> 1173	divoký typ	xref(Melkusova a spol., 2004)
<i>Candida albicans</i> BWP17	<i>his⁻ arg⁻ ura⁻</i>	xref(Wilson&Davis,1999)
<i>Candida albicans</i> BWOZ 13-81	BWP17; <i>cnh1::hisG/cnh1Δ::hisG</i>	xref(Zimmermanová&Sychrová, 2007)
<i>Candida dubliniensis</i> CD36	divoký typ	sbírka CBS (CBS 7987)
<i>Candida parapsilosis</i> CBS604	divoký typ	sbírka CBS
<i>Candida glabrata</i> ATCC2001	divoký typ	sbírka ATCC

- CBS (The Centraalbureau voor Schimmelcultures) Sběrka mikroorganismů Akademie věd a umění Nizozemského království <http://www.cbs.knaw.nl/>
- ATCC (American Type Culture Collection) <http://www.atcc.org/>

3.1.3 CHEMIKÁLIE

Použité chemikálie byly v pevném skupenství s čistotou $\geq 99\%$, není-li uvedeno jinak.

5,5-diphenylhydantoin sodium salt (phenytoin)	Sigma
adenin	Sigma
agar	Kulich HK
amiodaron hydrochlorid	Sigma
bacto peptone	Imuna
Canesten roztok 20 ml (klotrimazolium drm sol 1%)	Bayer
D-glukosa	Sigma
Diflucan I.V. (fluconazolium inf sol 100 ml/200 mg)	Pfizer
dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
D-sorbitol	Sigma
ethanol 98% (kapalina)	Lachema
fluorescent brightener 28, (calcofluor white)	Sigma
glycerol čistý (kapalina)	Lachema
chlorid draselný	Lachema
chlorid lithný	Fluka
chlorid sodný	Lachema
chlorid vápenatý bezvodý	Lachema
Prokanazol (itraconazolium por cps dur 4x100 mg)	Pro. Med. CS. Praha a.s.
Savo	Bochemie
yeast extract	Serva
yeast nitrogen base (YNB)	Formedium

3.1.4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

autokláv	2540EL, Tuttnauer
elektromagnetické míchačky	HTR 8068, Hytel Color Squid, IKA MM4, Lavat Chotutice
fotoaparát	CoolPix 4500, Nikon
inkubátory	Gallenkamp, Schoeller, INB 500, Memmert
laminární box	BHSL, Labox
microplate reader	EL808, Bio-Tech Instruments, INC.
spektrofotometr	BioPhotometer, Eppendorf
termoshaker	PST-60HL-4, Biosan
váhy	PM200, Mettler, 440-33N, Kern
váhy analytické	2604, Sartorius
vortex	MS2 Minishaker, IKA
výrobník destilované vody	FIX-O-RAIL IP55-6, Vinckier

3.1.5 OSTATNÍ MATERIÁL

aplikátor typu "ježek"	Sigma
sada automatických pipet	Gilson
Filtry membránové, průměr 2,5 cm, velikost pórů 0,22 μm	Millipore
Mikrotitrační destičky pro imunologické analýzy Elisa s plochým dnem jamek	P-Lab

Jednorázový plastový laboratorní materiál (např. špičky, mikrozkuhavky, Petriho misky atd.) byl většinou od firem Eppendorf a P-Lab.

3.2 METODY

3.2.1 STANOVENÍ OPTICKÉ HUSTOTY (OD_{600}) BUNĚK

Optická hustota (OD_{600}) suspenze buněk byla stanovována při vlnové délce 600 nm spektrofotometrem BioPhotometer od firmy Eppendorf. Vzhledem k tomu, že optická hustota je přímo úměrná koncentraci buněk jen v úzkém rozmezí, byla suspenze buněk před měřením vhodně naředěna tak, aby měřená optická hustota byla v rozsahu $OD_{600} = 0,01 - 0,6$.

3.2.2 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

Používali jsme tekutá a pevná kultivační média. Postup přípravy byl v obou případech obdobný, do pevných médií byl navíc před sterilizací přidáván 2% agar (v případě média s vysokou koncentrací solí 2,5% agar). Při přípravě všech médií byla použita destilovaná voda.

Pro kultivaci byla použita média YPD a YNB- K^+

MÉDIA S PŘÍDAVKEM SOLÍ A SORBITOLU

Některé soli byly přidávány v množství, jehož objemový podíl v médiu nelze zanedbat ani předem odhadnout. Aby byla dodržena výsledná koncentrace soli v daném objemu média, byl na baňku předem vyznačen konečný objem média. Potom byly naváženy všechny složky média včetně soli nebo sorbitolu a byla doplněna destilovaná voda. Napřed množství potřebné pro rozpuštění složek média, potom po rysku (před sterilizací). Ryska na baňce zároveň sloužila pro kontrolu objemu po sterilizaci.

MÉDIA S PŘÍDAVKEM ANTIMYKOTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Antimykoticky aktivní látky byly přidávány k médiu vždy po sterilizaci. Tento postup snižuje riziko rozkladu přidaných látek vlivem působení vysoké teploty během sterilizace. Antimykotika jsme přidávali ze sterilních zásobních roztoků (uchovávaných v -18°C) u tekutých médií po zchladnutí na pokojovou teplotu, u pevných médií co možná nejtěsněji před začátkem tuhnutí média (40°C).

GRADIENTOVÉ MISKY

Na miskách pro gradientové sledování růstu buněk na médiích s gradientem testované látky stoupá v jednom směru koncentrace aditiva od nuly k určité maximální hodnotě (C_{max}). Gradientové misky byly připravovány postupným naléváním dvou vrstev média nestejného složení (Obr. 11). První vrstva média, která obsahovala aditivum (NaCl, KCl, LiCl, sorbitol) o maximální výsledné koncentraci, byla nalita do mírně nakloněné čtvercové Petriho misky. Po ztuhnutí šikmé vrstvy média byla miska položena do vodorovné polohy a nalita vrstva druhá, složením odpovídající, ale bez aditiva.



Obr. 11 Příprava gradientové misky. První vrstva (A) s aditivem o koncentraci C_{max} nalitá do nakloněné misky. Druhá vrstva (B) bez aditiv nalitá ve vodorovné poloze. Schéma hotové misky (C) koncentrace aditiva roste zleva doprava.

3.2.3 ROZTOKY ANTIMYKOTIK

Pro snadnější dávkování antimykotik do médií jsme připravovali sterilní, zásobní roztoky uchovávané při teplotě -18°C . Výchozí surovinou byla čistá látka, nebo léčivý přípravek. Zásobní roztok amiodaronu o koncentraci 20 mM byl připraven rozpuštěním čisté látky v odpovídajícím množství dimethylsulfoxidu (DMSO). Zásobní roztok phenytoinu o koncentraci 2 mg/ml byl připraven rozpuštěním čisté látky v ethanolu.

V případě flukonazolu a klotrimazolu jsme jako zásobní roztok použili léčivý přípravek Diflucan I. V. inf sol 100 ml/200 mg. resp. Canesten roztok 20 ml (klotrimazolium dr. sol 1%) Zásobní roztok itraconazolu o koncentraci 50 mg/ml jsme připravili z léčivého přípravku Prokanazol (itraconazolium por cps dur 4x100 mg). Obsah tobolky jsme resuspendovali v dimethylsulfoxidu, nerozpustný oxid titaničitý jsme odstranili filtrací.

Vliv pomocných látek jsme vzhledem k výsledné velmi nízké koncentraci v médiu zanedbali. Vliv rozpouštědel (DMSO, ethanol) jsme ověřili porovnáním růstu buněk v kontrolním médiu

s růstem buněk v kontrolním médiu s přidavkem čistého rozpouštědla při každém experimentu.

3.2.4 STERILIZACE MATERIÁLU A LIKVIDACE BUNĚČNÝCH KULTUR

Laboratorní nádobí, nesterilní jednorázové plastové pomůcky (například špičky k pipetám) a média byly sterilizovány horkou parou 20 min při 121°C a 120 kPa v autoklávu. Zásobní roztoky flukonazolu, itrakonazolu, klotrimazolu, amiodaronu, phenytoinu, calcofluor white a dodecylsíranu sodného byly sterilizovány filtrací přes membránový filtr s velikostí póru 0,22 µm.

Zbytky použitých kultur z pevných médií byly likvidovány sterilizací horkou parou 20 min při 121°C a 120 kPa v autoklávu. Ke kulturám v tekutém médiu byla nejprve přidána dezinfekce na bázi chlornanu a poté byly tekuté kultury také sterilizovány horkou parou 20 min při 121°C a 120 kPa v autoklávu.

3.2.5 UCHOVÁVÁNÍ BUNĚK

Dlouhodobě jsme buňky uchovávali v roztoku 30 % glycerolu při -70 °C, kdy čerstvě napěstovaná kultura byla z pevného média resuspendována v sterilním roztoku 30 % glycerolu a následně zamražena.

Po rozmrazení jsme kmeny naočkovali na pevné YPD médiu bohatém na živiny a 3 dny inkubovali v termostatu při 30°C. Dále byly misky s kulturami uchovávány při 4°C, a to podobu maximálně jednoho týdne. Poté byly kultury vždy obnoveny zaočkováním buněk uchovávaných při teplotě -70°C na čerstvé misky s médiem YPD.


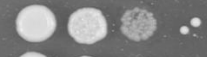



3.2.6 PĚSTOVÁNÍ BUNĚK

Před každým experimentem jsme si připravili čerstvou buněčnou kulturu. Postup přípravy výchozí kultury byl identický pro kapkové testy i pokusy využívající microplate reader. Jako zdroj buněk pro přípravu této kultury jsme použili buňky uchované při 4°C na miskách s YPD médiem. Kmeny z těchto misek byly přeočkovány na čerstvé misky s médiem YPD a inkubovány 24 h při teplotě 30°C. Takto narostlou kulturu jsme použili k vlastním experimentům.

KAPKOVÉ TESTY

Schopnost růstu *Candid* za různých růstových podmínek (přítomnost soli, antimykotika v médiu) jsme testovali pomocí tzv. kapkových testů na pevných médiích YPD, nebo YNB-K⁺ (jak je uvedeno v textu). Buňky testovaných kmenů byly resuspendovány ve vodě na shodnou výchozí OD₆₀₀=1. Ve sterilní mikrotitrační destičce byla připravena série čtyř desetinásobných ředění a kapky (asi 3 µl) byly přeneseny na Petriho misky s médiem pomocí aplikátoru typu „ježek“. V případě gradientových misek nebylo prováděno ředění buněčných suspenzí. Všechny kapky měly výchozí OD₆₀₀=1. Čím byl kmen tolerantnější vůči testované látce, tím více kapek v řadě mohlo růst.

Misky byly inkubovány při 30 °C. Po 1, 3 nebo 7 dnech (jak je uvedeno v textu) jsme pořídili černobílé snímky digitálním fotoaparátem Nikon Coolpix 4500. Růst *Candid* v určitých podmínkách jsme testovali touto metodou vždy třikrát po sobě. S ohledem na velké množství testovaných kmenů v různých podmínkách a množství opakování jsme někdy pro přehlednost použili tabulkové vyjádření výsledků. Růst buněk je v tabulce popsán pomocí symbolů. Symbol „+“ označuje růst jedné kapky na misce. Čím více symbolů „+“, tím lépe kmen roste. Maximální počet „+“ je roven 4. Příklad porovnání růstu pomocí symbolů je uveden na obr (Obr. 12), kde je ukázáno, jak koresponduje tabulkové vyjádření s fotografií kapkového testu. Skutečnost, že kmen na misce neroste vůbec, označuje v tabulkovém zápisu symbol „-“.

druh:	FLC 10µg/ml	3. den
<i>C. albicans</i> SC5314	++	
<i>C. albicans</i> 1173	+++	
<i>C. dubliniensis</i>	++++	
<i>C. parapsilosis</i>	+	
<i>C. glabrata</i>	++++	

Obr. 12 Porovnání vyjádření výsledku kapkového testu tabulkovým zápisem a fotografií. Symbol „+“ označuje růst jedné kapky na misce. (růst *Candid* na pevném YPD médiu v přítomnosti flukonazolu 10µg/ml, 30°C).

MĚŘENÍ RŮSTOVÝCH KŘIVEK A STANOVENÍ NORMOVANÉHO RŮSTU POMOCÍ MICROPLATE READERU

Buňky jsme naočkovali na pevné médium YPD a inkubovali 24 hodin při 30°C. Poté jsme je resuspendovali v tekutém médiu YPD nebo YNB-K⁺ na OD₆₀₀=0,02. Do každé jamky

mikrotitrační destičky typu Elisa jsme napipetovali 100 μ l této suspenze a destičku přelepili průhlednou fólií, která brání odpařování vody z média a případné vzájemné kontaminaci kultur vlivem třepání. Inkubace destiček probíhala dle typu experimentu buď přímo v readeru, nebo inkubátoru uzpůsobeném pro kultivaci buněk v mikrotitračních destičkách. Buňky byly vždy inkubovány při teplotě 30°C a kultury provzdušňovány třepáním.

Pro měření růstových křivek jsme buňky kultivovali v readeru. Vlnová délka měření OD byla vždy 595 nm, perioda měření 1 hodina. Pro stanovení normovaného růstu jsme pomocí readeru změřili výchozí OD₅₉₅ čerstvě připravené destičky. Poté byly buňky inkubovány mimo reader a další měření OD₅₉₅ v readeru následovalo po 24 nebo 36 hodinách.

Pro zpracování výsledků jsme použili software KC4 a MS Excel. Způsob vyhodnocení výsledků se liší v závislosti na typu experimentu. V případě růstových křivek jsme pro každé podmínky měřili OD₅₉₅ 4 identických vzorků. Výsledná hodnota OD v určitém čase je tvořena aritmetickým průměrem těchto 4 hodnot. Z těchto 4 hodnot byla vypočtena směrodatná odchylka. Grafickým vyjádřením výsledků je graf závislosti OD₅₉₅ na čase. Body jsme proložili křivkou. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože hodnoty směrodatné odchylky nepřesahují 15 %.

Pro stanovení normovaného růstu jsme pro každé podmínky měřili OD₅₉₅ 4 identických kultur 36 hodinách. Od každé hodnoty OD₅₉₅ v čase t jsme odečetli OD₅₉₅ změřenou v na začátku experimentu (t_0). Z takto upravených 4 výsledků měření jsme spočítali aritmetický průměr i směrodatnou odchylku. Abychom mohli porovnávat růst jednotlivých kmenů v přítomnosti různých aditiv (solí antimykotik), bylo potřeba průměrné hodnoty OD₅₉₅ normovat na průměrnou hodnotu OD₅₉₅ určitého kmenu v kontrolních podmínkách. Kontrolními podmínkami rozumíme růst buněk v médiu bez aditiv.

4 VÝSLEDKY

4.1 CANDIDY A SOLE ALKALICKÝCH KOVŮ

4.1.1 TOLERANCE K SOLÍM ALKALICKÝCH KOVŮ

První experimenty byly zaměřené na zjištění míry tolerance různých druhů *Candida* vůči solím alkalických kovů. Zopakovali jsme některé již dříve získané výsledky (Krauke & Sychrová 2008), které popisovaly mezidruhové rozdíly v toleranci solí alkalických kovů. Tolerance byla sledována pomocí tzv. kapkových testů (kap. 3.2.6.) jako schopnost růstu buněk na pevných médiích v přítomnosti různých koncentrací solí. Pomocí těchto úvodních experimentů jsme optimalizovali podmínky pro další experimenty a zároveň jsme vybrali kmeny *Candida*, se kterými jsme pokračovali v práci.

Přehled druhů a kmenů použitých v úvodních experimentech:

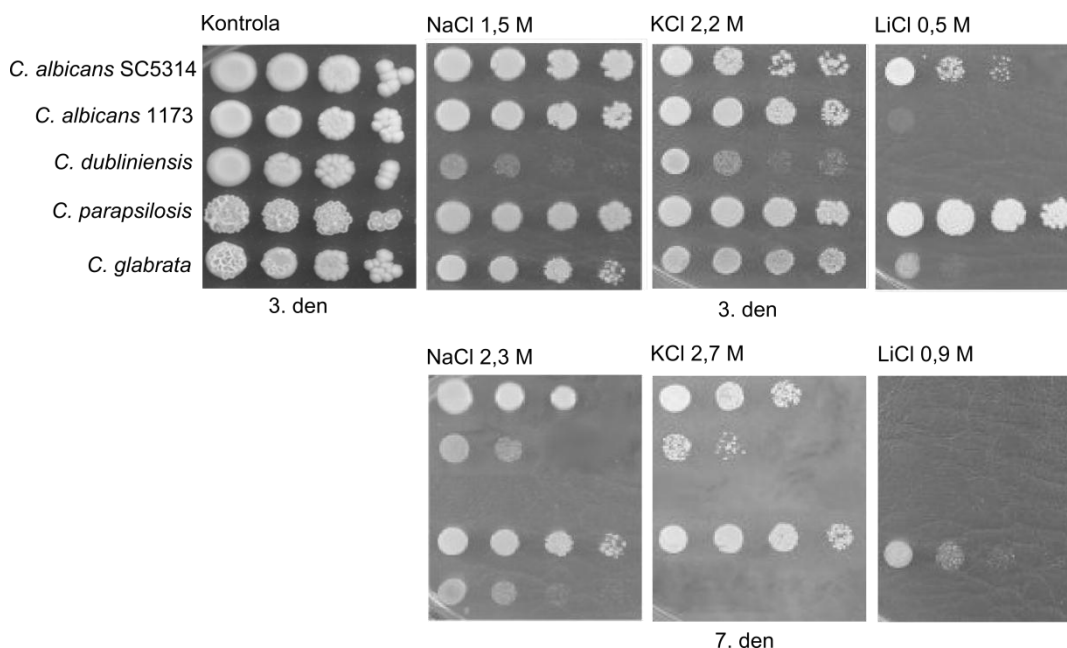
- *Candida albicans* SC 5314
- *Candida albicans* 1173
- *Candida albicans* BWP17
- *Candida albicans* BWOZ1381
- *Candida dubliniensis* CD36
- *Candida parapsilosis* CBS604
- *Candida glabrata* ATCC 2001

Kmeny *C. a.* BWP17 a *C. a.* BWOZ1381, které obsahují auxotrofní mutace (kap. 3.1.2.) rostly na kontrolním médiu výrazně pomaleji než kmeny *C. a.* SC5314 a *C. a.* 1173. Tato skutečnost by stěžovala srovnání výsledků s ostatními druhy, a proto jsme kmeny BWP17 a BWOZ1381 z dalších experimentů vyřadili. Výsledky pro ně získané neuvádíme.

Uspořádání, koncentrace aditiv a podmínky byly shodné s výše citovanou prací (Krauke & Sychrová 2008). K médiu bohatému na živiny YPD jsme přidali tyto soli alkalických kovů vždy ve dvou koncentracích: chlorid sodný 1,5 mol/l a 2,3 mol/l; chlorid draselný 2,2 mol/l a 2,7 mol/l; chlorid lithný 0,5 mol/l a 0,9 mol/l. Kapkové testy s nižší koncentrací soli jsme vyhodnotili třetí den. Třetí den jsou již kolonie na kontrolní misce (médiu YPD bez soli) zcela narostlé a rozdíly

v růstu mezi třetím a čtvrtým dnem jsou již velmi malé. Kapkové testy s vyšší koncentrací soli jsme vyhodnotili sedmý den, protože silný stres výrazně zpomaluje růst buněk.

Vliv solí alkalických kovů v médiu na růst buněk je znázorněn na obr. 13. V přítomnosti NaCl nejlépe roste *C. parapsilosis* a *C. albicans* SC5314, jejíž růst je však částečně inhibován vyšší koncentrací soli. Méně tolerantní k NaCl než kmen *C. a.* SC5314 je kmen *C. a.* 1173 i *C. glabrata*. Nejméně tolerantním druhem k NaCl je *C. dubliniensis*, která roste výrazně hůře již při koncentraci 1,5 M NaCl a na miskách s 2,3 M NaCl neroste vůbec.



Obr. 13 Růst *Candid* na médiu YPD v přítomnosti chloridu sodného, chloridu draselného a chloridu lithného při 30°C.

V přítomnosti 2,2 M KCl je ztelně inhibován růst jen druhu *C. dubliniensis*, který při vyšší koncentraci KCl neroste vůbec. KCl v koncentraci 2,7 mol/l je letální také pro druh *C. glabrata*. Oba testované kmeny *C. albicans* při vyšší testované koncentraci rostou hůře než *C. parapsilosis*, přičemž kmen SC5314 je více tolerantní než kmen 1173. Nejvíce tolerantním druhem ke KCl je *C. parapsilosis*, který roste dobře i v přítomnosti 2,7 M KCl. Chlorid lithný má na *Candidy* nejsilnější toxické účinky. Nejvíce tolerantní je druh *C. parapsilosis*, který v přítomnosti 0,5 M LiCl roste nejlépe ze všech. Vyšší koncentrace LiCl 0,9 mol/l růst *C. parapsilosis* inhibuje, avšak pro ostatní druhy je tato koncentrace LiCl letální. Pořadí ostatních druhů *Candid* dle schopnosti růst v přítomnosti nižších koncentrací LiCl je: *C. a.* SC5314, *C. glabrata*, *C. a.* 1173.

Z provedených kapkových testů jsou patrné velké mezidruhové rozdíly v halotoleranci *Candida*. Nejvíce tolerantním druhem je *C. parapsilosis*, který rostl nejlépe ve všech testovaných podmínkách. U druhu *C. albicans* jsme pozorovali významné rozdíly mezi kmeny SC5314 a 1173. Kmen SC5314 je o něco méně halotolerantní než *C. parapsilosis*, ale vždy rostl lépe než kmen 1173. *C. glabrata* je k účinkům solí podobně citlivá jako kmen *C. a.* 1173, avšak o něco hůře než tento kmen toleruje KCl. Nejméně halotolerantním druhem je *C. dubliniensis*.

Ze všech testovaných solí je pro *Candidy* nejvíce toxický LiCl. Druhým nejsilnějším inhibitorem růstu je chlorid sodný. I sodné ionty pro *Candidy* toxické, přesto třikrát vyšší koncentrace NaCl než koncentrace LiCl nemá tak silný inhibiční účinek. Nejlépe tolerovanou solí je chlorid draselný. Draselné ionty nemají toxické účinky a proto *Candidy* tolerují i velmi vysoké (2,7 mol/l) koncentrace této soli. Uvedené výsledky jsou ve shodě s výše uvedenou (Krauke & Sychrová 2008)

4.1.2 SUBINHIBIČNÍ KONCENTRACE SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU

Po porovnání maximálních koncentrací solí tolerovaných jednotlivými druhy *Candida* bylo potřeba stanovit subinhibiční koncentrace solí - tzn. nejvyšší koncentrace solí, jejichž účinky jsou *Candidy* schopné plně kompenzovat. Přidáním solí v subinhibiční koncentraci do média jsme chtěli indukovat stresovou situaci, kterou je buňka schopna pomocí svých regulačních mechanismů kompenzovat a udržet iontovou homeostázi (2. 2.).

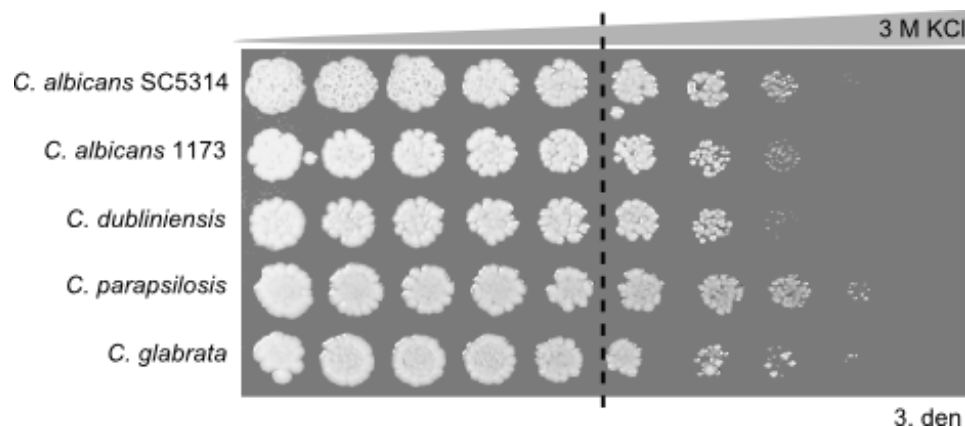
Určovali jsme subinhibiční koncentraci chloridu sodného, chloridu draselného, chloridu lithného a sorbitolu. Sorbitol jsme zařadili do experimentů, protože je to látka neiontové povahy, pro *Candidy* fyziologicky inertní, avšak ve vyšší koncentraci schopna zvýšit osmotický tlak stejně jako soli alkalických kovů (kap. 2. 2. 2.)

Pro odhad subinhibičních koncentrací solí a sorbitolu jsme použili kapkové testy na miskách s gradientem testované látky. Pozorovali jsme růst různých druhů *Candida* na pevném médiu bohatém na živiny YPD s gradientem koncentrace soli či sorbitolu. Oproti klasickému kapkovému testu je v tomto uspořádání počet buněk ve všech kapkách stejný. Přípravu a uspořádání gradientových kapkových testů podrobně popisuje kapitola 3. 2. 2. a 3. 2. 6.

Růst buněk na misce s gradientem koncentrace soli jsme porovnali s růstem buněk na kontrolní misce s médiem YPD. Gradientové kapkové testy jsme vyhodnotili první, třetí a sedmý den. První den jsme ověřovali, zda je gradient na misce dobře rozvržen. První kapka zleva na

gradientové misce rostla stejně, jako kolonie na kontrolní misce. Od druhé kapky byl růst oproti kontrole pomalejší. Třetí den již byly kolonie na kontrolní misce plně narostlé a na gradientové misce bylo možné odhadnout hranici subinhibiční koncentrace. Subinhibiční koncentraci jsme odečítali třetí den, protože nás zajímala koncentrace, kterou jsou všechny druhy *Candida* schopny kompenzovat, aniž by se výrazně zpomalil jejich růst. Odečet ze sedmého dne nám sloužil pro porovnání s předchozími kapkovými testy. Sedmý den byly vidět výrazné mezidruhové rozdíly v toleranci k solím, které byly shodné s výsledky kapkových testů popsaných v kapitole 4. 1. 1.

Od první do páté kapky zleva nepozorujeme žádný rozdíl v růstu (Obr. 14.). Makrokolonie v šesté kapce oproti páté jsou u obou kmenů *C. albicans* menší, také makrokolonie *C. glabrata* v šesté kapce je menší než v kapce páté. Růst buněk v sedmé kapce je již zřetelně zpomalen u všech druhů *Candida*. Přerušovaná čára mezi pátou a šestou kapkou označuje hranici, od které směrem doleva rostou všechny druhy *Candida* bez známek inhibice. Pro odhad koncentrace KCl v tomto místě jsme změřili délku celé misky (d) a délku od levého kraje misky k linii vyznačené přerušovanou čarou (d_1). Pomocí přímé úměry mezi vzdáleností a koncentrací jsme vypočítali subinhibiční koncentraci (C_{si}) v místě přerušované čáry dle rovnice: $C_{si} = C_{max} * (d_1/d)$ Tímto způsobem byly odhadnuty C_{si} chloridu sodného, chloridu draselného, chloridu lithného a sorbitolu.



Obr. 14 Růst *Candida* na médiu YPD při 30°C v přítomnosti KCl. Koncentrace KCl stoupá zleva doprava. Přerušovaná čára označuje oblast, od které směrem doleva rostou všechny druhy *Candida* bez známek inhibice.

Jestli hodnoty C_{si} získané z gradientových kapkových testů odpovídají subinhibičním koncentracím, které neovlivňují růst buněk, jsme ověřili pomocí sady klasických kapkových testů. Pozorovali jsme růst *Candida* na médiu YPD s přidávkou solí nebo sorbitolu v koncentraci vypočtené z gradientových kapkových testů. Třetí den jsme porovnávali růst buněk na těchto

miskách s kontrolou. Všechny druhy *Candid* rostly na miskách s aditivou stejně jako na kontrolní misce. Stanovené koncentrace tedy neměly inhibiční účinek na žádný z použitých druhů a lze je pro další experimenty považovat za výchozí subinhibiční koncentrace. Jejich přehled je uveden v Tab. 1.

Tab. 2 Subinhibiční koncentrace solí alkalických kovů a sorbitolu

	C_{si} [M]
NaCl	1
KCl	1,5
LiCl	0,2
Sorbitol	1,1

4.2 FLUKONAZOL

První antimykotikum, se kterým jsme pracovali, byl flukonazol (FLC). Tuto látku jsme si zvolili kvůli návaznosti na dříve získané výsledky (Kolecka et al. 2009), které popisují vliv kombinací subinhibičních koncentrací flukonazolu a chloridu sodného na FLC-senzitivní kmen *C. a.* SC5314 a FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173. Nejprve jsme popsání výsledky zopakovali a následně jsem je rozšířili. Využili jsme kapkové testy a měření růstových křivek tekutém médiu (kap. 3. 2. 6.).

4.2.1 REZISTENCE *CANDID* K FLUKONAZOLU

Různé druhy *Candid* se výrazně liší svou citlivostí k různým antimykotikům a tedy i k flukonazolu (kap. 2. 4.). Nejprve jsme testovali citlivost námi používaných kmenů *Candid* k této látce v našich experimentálních podmínkách (médiu, výchozí koncentrace buněk, doba a teplota inkubace).

Kapkové testy na médiu YPD s přidavkem flukonazolu v koncentracích 2, 16, 128 µg/ml sloužily k porovnání citlivosti různých druhů *Candid* k flukonazolu. Rezistentní k flukonazolu byly kmeny *C. a.* 1173, *C. dubliniensis* a *C. glabrata*, jejichž růst nebyl ani v přítomnosti FLC v koncentraci 128 µg/ml inhibován. Kmeny k flukonazolu senzitivní naopak byly *C. a.* SC5314, se znatelnou inhibicí růstu FLC v koncentraci 16 µg/ml, a *C. parapsilosis*, který rostl slaběji oproti kontrole (médiu bez FLC) již v přítomnosti FLC v koncentraci 2 µg/ml.

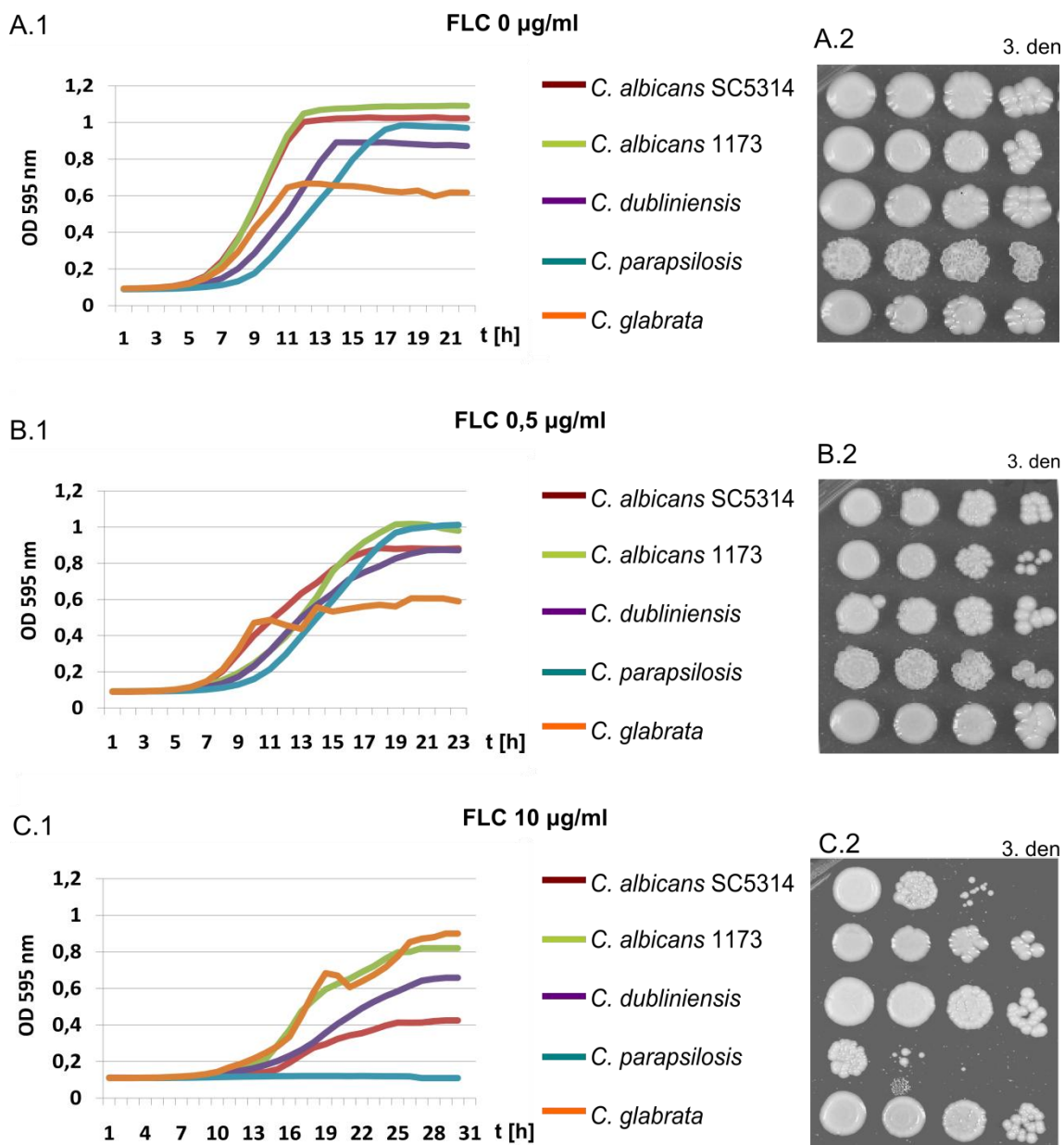
4.2.2 STANOVENÍ SUBINHIBIČNÍ KONCENTRACE FLUKONAZOLU

Pro další experimenty jsme potřebovali stanovit subinhibiční koncentraci flukonazolu. Podobně jako u stanovení subinhibičních koncentrací solí i v tomto případě jsme hledali koncentraci FLC, kterou jsou *Candidy* schopné pomocí svých regulačních mechanismů kompenzovat. Vzhledem k výrazným mezidruhovým rozdílům v rezistenci *Candid* k flukonazolu jsme se rozhodli následovat práci (Kolecka et al. 2009), ve které autoři stanovili dvě hodnoty subinhibiční koncentrace flukonazolu - nižší koncentraci pro FLC-senzitivní kmen *C. a.* SC5314 a vyšší pro FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173. Naším úkolem bylo najít takové koncentrace, které by byly vhodné pro všechny námi testované druhy *Candid*.

Testovali jsme růst *Candid* v médiu YPD s přidavkem flukonazolu v koncentraci 0,5 µg/ml a 10 µg/ml pomocí kapkových testů i měření růstových křivek. Na kapkovém testu FLC v koncentraci 0,5 µg/ml (Obr 15. B.2) jsme třetí den nezaznamenali u žádného druhu známky

inhibice ve srovnání s růstem buněk na médiu bez FLC (Obr. 15. A.2). Růstové křivky však dokazují, že i tak nízká koncentrace FLC v médiu vyvolává změny v růstu u všech druhů *Candid*. Ve srovnání s kontrolou (Obr. 15. A.1), je průběh růstových křivek v přítomnosti FLC v koncentraci 0,5 µg/ml (Obr. 15. B.1) změněn. Dochází především k prodloužení doby zdvojení a tedy i času, za který buňky dosáhnou stacionární fáze růstu. Ve stacionární fázi buňky dorůstají zhruba stejné OD jako v kontrolních podmínkách. FLC v této koncentraci růst *Candid* ovlivňuje, ale všechny druhy jsou schopné tento stres kompenzovat.

V přítomnosti vyšší koncentrace flukonazolu (10 µg/ml) jsou vidět rozdíly v růstu jednotlivých druhů *Candid* na pevném i v tekutém médiu. Na kapkovém testu (Obr. 15. C.2) jsou dobře patrné rozdíly mezi FLC-rezistentními a FLC-senzitivními *Candidami*. Kmeny *C. albicans* 1173, *C. dubliniensis* a *C. glabrata* rostou v přítomnosti FLC 10 µg/ml bez známek inhibice. Z růstových křivek těchto kmenů je však vliv FLC znatelný (Obr. 15. C.1). Lag fáze i exponenciální fáze růstu se prodlužují. Všechny tři kmeny však dorůstají alespoň 80% OD₅₉₅ kontroly ve stacionární fázi. U FLC-senzitivních kmenů *C. a.* SC5314 a *C. parapsilosis* jsou patrné účinky flukonazolu již na kapkovém testu. Oba kmeny jsou FLC 10 µg/ml silně inhibovány, *C. a.* SC5314 méně než *C. parapsilosis*. V tekutém médiu je růst těchto dvou kmenů oproti kontrole nejvíce pozměněn. *C. albicans* dorůstá pouze 40 % OD₅₉₅ kontroly ve stacionární fázi, *C. parapsilosis* neroste vůbec.



Obr. 15 Růst *Candida* v médiu YPD v přítomnosti flukonazolu při 30°C. Kontrola bez FLC (A.1 růstové křivky, A.2 kapkový test). Vliv přítomnosti FLC v koncentraci 0,5 µg/ml (B.1. růstové křivky, B.2 kapkový test) a 10 µg/ml (C.1 růstové křivky, C.2 kapkový test) Data tvoří křivky proložené body tvořené průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

Nepravidelnosti v růstových křivkách u druhu *C. glabrata* jsou způsobené flokulací. Tento jev se objevuje v závislosti na podmínkách od určitého množství buněk v médiu. Buňky se shlukují do „vloček“, které zkreslují měření OD₅₉₅. Flokulace se objevuje nejdříve v druhé polovině exponenciální fáze. Lag fázi a dobu zdvojení tedy u *C. glabrata* můžeme bez problémů porovnat. S opatrností musíme přistupovat k hodnocení OD₅₉₅ ve stacionární fázi tohoto druhu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že koncentrace flukonazolu 0,5 µg/ml je subinhibiční pro všechny druhy námi testovaných *Candid*. Druhou testovanou koncentrací flukonazolu 10 µg/ml je možné považovat za subinhibiční pro FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173, druh *C. dubliniensis* a druh *C. glabrata*. Naopak pro FLC-senzitivní kmen *C. a.* SC5314 a druh *C. parapsilosis* se o této koncentraci jako o subinhibiční uvažovat nedá. Proto byly v dalších experimentech využity dvě různé subinhibiční koncentrace FLC v závislosti na citlivosti jednotlivých druhů *Candid*.

4.2.3 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDID* K FLUKONAZOLU

Po stanovení subinhibičních koncentrací flukonazolu, solí alkalických kovů a sorbitolu jsme mohli přistoupit k pokusům, které by ukázali souvislost mezi rezistencí různých druhů *Candid* k flukonazolu a tolerancí přítomnosti solí v médiu. Testovali jsme schopnost *Candid* růst v prostředí se subinhibiční koncentrací flukonazolu a zároveň subinhibiční koncentrací chloridu sodného, chloridu draselného a sorbitolu. Využili jsme kapkové testy na pevných půdách i sledování růstu v tekutém médiu (kap. 3. 2. 6.).

VLIV SUBINHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ CHLORIDU SODNÉHO NA REZISTENCI *CANDID* K FLUKONAZOLU

Práce (Kolečka et al. 2009), na kterou jsme navazovali, se zabývala souběžným působením subinhibičních koncentrací NaCl a FLC na FLC-senzitivní kmen *C. a.* SC5314 a FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173. Proto i my jsme začali pokusy s flukonazolem v kombinaci s chloridem sodným. Mohli jsme ověřit dříve získané výsledky této práce a rozšířit je o experimenty s dalšími druhy *Candid*. Prvním krokem bylo provedení série kapkových testů. Hodnotili jsme růst *Candid* v prostředí média YPD bohatého na živiny v přítomnosti FLC v kombinaci s chloridem sodným. Pro přehlednost jsme zvolili tabulkový zápis výsledků těchto testů (Tab. 2.). Začali jsme testovat růst *Candid* v přítomnosti FLC v koncentracích 0,5 µg/ml; 10 µg/ml v kombinaci s 1 M NaCl, protože právě tato koncentrace NaCl byla stanovena v předchozích experimentech jako vhodná subinhibiční koncentrace pro všechny druhy *Candid*. Kombinace FLC 10 µg/ml a 1M NaCl byla letální pro všechny testované kmeny s výjimkou druhu *C. glabrata*, který v těchto podmínkách slabě rostl. Kombinace nižší koncentrace FLC

(0,5 µg/ml) s 1 M NaCl byla letální pro *C. a.* SC5314, *C. a.* 1173 a *C. dubliniensis*. Velmi slabě rostla *C. parapsilosis*, nejlépe *C. glabrata*.

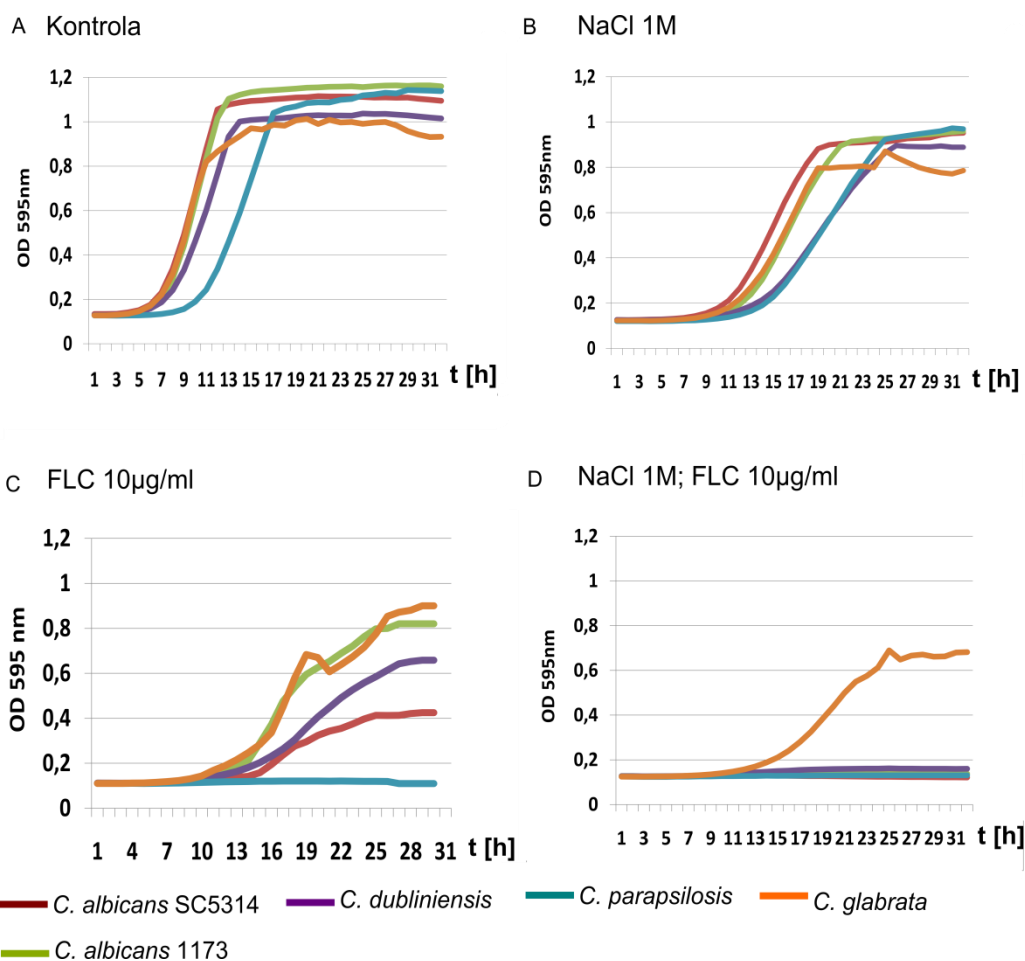
Zajímalo nás, zda se silný inhibiční účinek projeví i v přítomnosti FLC a nižších koncentrací NaCl. Provedli jsme proto testy s koncentrací NaCl 0,6 mol/l a 0,3 mol/l v kombinaci s flukonazolem. Získané výsledky jsou uvedené v Tab. 2. Obě použité koncentrace FLC zůstali stejné jako u výše popsaných experimentů. Kombinace FLC a 0,6M NaCl nejméně inhibuje kmen *C. glabrata*, který je silněji inhibován kombinací s FLC v koncentraci 10 µg/ml. Slaběji než tento druh roste *C. parapsilosis*, u kterého je také inhibice růstu vyšší v přítomnosti vyšší koncentrace FLC. Velmi slabě rostou kmeny *C. a.* SC5314 a *C. a.* 1173 bez ohledu na koncentraci FLC. Obě koncentrace FLC v kombinaci s NaCl 0,6 M jsou letální pro kmen *C. dubliniensis*.

Nejnižší testovaná koncentrace chloridu sodného byla 0,3 mol/l v kombinaci s FLC v koncentraci 0,5 a 10 µg/ml. V přítomnosti 0,3M NaCl a FLC 0,5 µg/ml rostly všechny kmeny s výjimkou *C. dubliniensis* bez známek inhibice. *C. dubliniensis* rostla v těchto podmínkách nejhůře ze všech testovaných kmenů a kombinace 0,3 M NaCl s FLC 10 µg/ml byla pro tento druh letální. Vyšší koncentrace FLC 10 µg/ml s 0,3 M NaCl působí silnou inhibici růstu u *C. a.* SC5314 a *C. parapsilosis*, pouze slabý inhibiční účinek mají tyto podmínky na kmen *C. a.* 1173 a druh *C. glabrata*. Při hodnocení výsledků je však třeba mít na zřeteli, že pro FLC-senzitivní kmeny je koncentrace FLC 10 µg/ml nad hranicí subinhibice.

Tab. 3 Růst *Candid* na médiu YPD s přidavkem NaCl a FLC, 3. den při 30°C Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce. Symbol „-“ označuje misky, kde kmen nerostl vůbec (kap. 3. 2. 6.).

druh:	FLC (µg/ml)	NaCl [M]			
		0	0,3	0,6	1
<i>C. albicans</i> SC5314	0	++++	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	+	-
	10	++	++	+	-
<i>C. albicans</i> 1173	0	++++	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	+	-
	10	++++	+++	+	-
<i>C. dubliniensis</i>	0	++++	++++	++++	++++
	0,5	++++	++	-	-
	10	++++	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	0	++++	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	++	+
	10	+	+	+	-
<i>C. glabrata</i>	0	++++	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	+++	++
	10	++++	+++	++	+

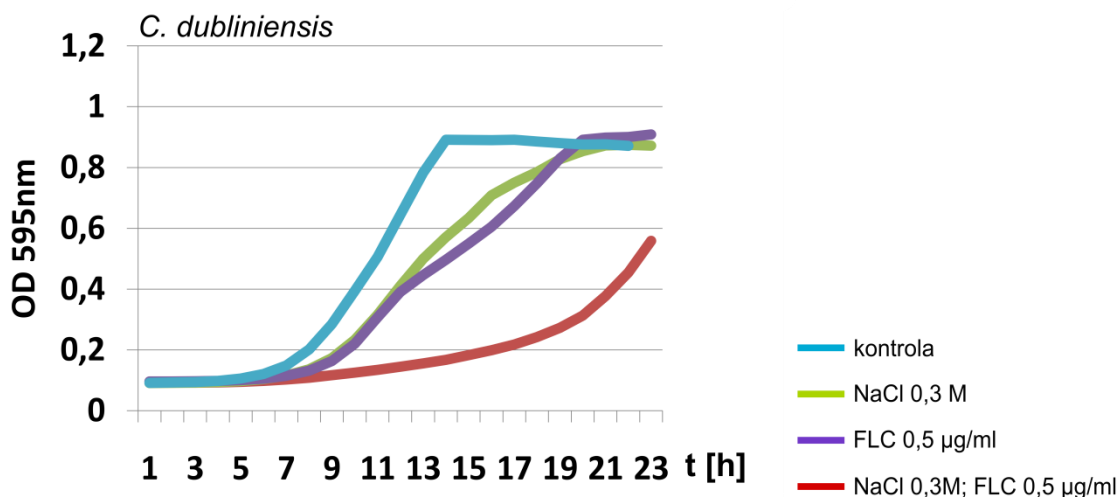
Na začátku nás překvapila síla inhibičního účinku kombinace FLC 10 µg/ml s 1 M NaCl. Měřili jsme proto růstové křivky *Candid* v prostředí tekutého YPD média s přidavkem 1 M NaCl a FLC 10 µg/ml. Vliv samotného 1 M NaCl na růst *Candid* se projevuje prodloužením doby zdvojení (Obr. 16. B). Vliv samotného FLC 10 µg/ml byl popsán výše (kap. 4. 2. 2.). Je patrný velký rozdíl, mezi FLC-rezistentními *C. a* 1173, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* a FLC-senzitivními *C. a*. SC5314 a *C. parapsilosis* (Obr. 16. C). Přítomnost obou látek je letální pro všechny druhy *Candid* s výjimkou druhu *C. glabrata*, který jediný je v těchto podmínkách schopen růstu (Obr. 16. D). Tento výsledek se zcela shoduje s výsledky kapkových testů.



Obr. 16 Růst *Candida* v médiu YPD s přidavkem NaCl 1 M; FLC 10 µg/ml při 30°C. Růst *Candida* v médiu YPD (A), v přítomnosti 1M NaCl (B), FLC 10 µg/ml (C) a v kombinaci 1M NaCl s FLC 10 µg/ml (D). Data tvoří křivky proložené body tvořené průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

Měření růstových křivek jsme prováděli také v přítomnosti: 1 M NaCl; FLC 0,5 µg/ml, a 0,6M NaCl spolu s FLC 10 µg/ml. Ve všech případech pozorované inhibice růstu odpovídaly výsledkům získaných z kapkových testů.

Mezidruhové rozdíly v růstu *Candida* jsme pozorovali i v nejmírnějších testovaných podmínkách 0,3 M NaCl v kombinaci s FLC 0,5 µg/ml. Výsledek kapkových testů (Tab. 2.) ukazuje, že jediným druhem, který je v těchto podmínkách inhibován je kmen *C. dubliniensis*. Toto pozorování jsme ověřili měřeními růstových křivek. Zatímco všechny *Candidy* rostou za těchto podmínek dobře, růst *C. dubliniensis* je výrazně inhibován (Obr. 17.). *C. dubliniensis* se tak stal jediným testovaným druhem, kde inhibici růstu vyvolaly i nejnižší testované koncentrace NaCl a FLC.



Obr. 17 Růst *C. dubliniensis* v médiu YPD s přidavkem NaCl 0,3 M; FLC 0,5 µg/ml při 30°C Data tvoří křivky proložené body tvořené průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

VLIV SUBINHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ CHLORIDU DRASELNÉHO A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDID* K FLUKONAZOLU

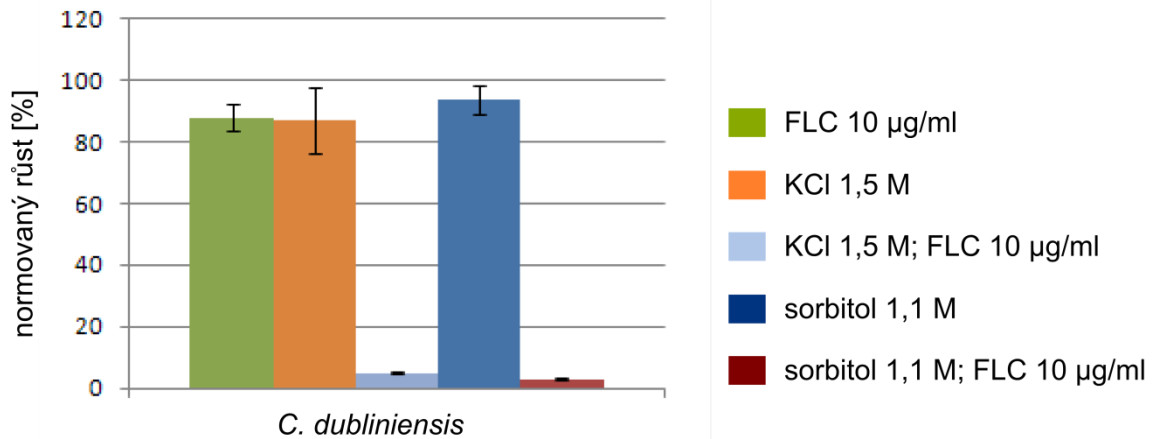
Po experimentech s kombinacemi flukonazolu a chloridu sodného nás zajímalo, jestli můžeme výše popsané efekty pozorovat i s použitím jiných látek, které by samy o sobě měly na buňky kvasinek méně toxický efekt než sodné ionty. Sledovali jsme proto vliv chloridu draselného a sorbitolu na rezistenci *Candid* k flukonazolu. Prvním krokem bylo provedení série kapkových testů. Hodnotili jsme růst *Candid* na pevném médiu YPD se FLC 10 µg/ml; 0,5 µg/ml v kombinaci se subinhibičními koncentracemi chloridu draselného a sorbitolu. Použité subinhibiční koncentrace chloridu draselného 1,5 mol/l a sorbitolu 1,1 mol/l jsme stanovili v předchozích pokusech (kap. 4. 1. 2.).

Kvůli přehlednosti jsme zvolili tabulkový zápis výsledků kapkových testů (Tab. 3.). Přítomnost 1,5 M KCl a FLC v koncentraci 0,5 µg/ml negativně ovlivňuje pouze kmen *C. dubliniensis*. Ostatní kmeny tyto podmínky zcela tolerují. KCl 1,5 M v kombinaci s vyšší koncentrací FLC (10 µg/ml) působí znatelnou inhibici růstu všech testovaných druhů. Nejhůře rostou *C. a.* SC5314, *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*, přičemž musíme mít na paměti senzitivitu *C. a.* SC5314 a *C. parapsilosis* k FLC. Lépe roste FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173. Nejlépe dané podmínky toleruje druh *C. glabrata*, u kterého jsme pozorovali jen slabou inhibici růstu.

Tab. 4 Růst *Candida* na médiu YPD v prostředí s FLC, KCl a sorbitolem, 3. den při 30°C. Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce (kap. 3. 2. 6.).* médium bez NaCl, KCl a sorbitolu.

druh:	FLC (µg/ml)	Kontrola*	KCl 1,5 M	Sorbitol 1,1 M
<i>C. albicans</i> SC5314	0	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	++++
	10	++	+	++
<i>C. albicans</i> 1173	0	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	++++
	10	++++	++	++++
<i>C. dubliniensis</i>	0	++++	++++	++++
	0,5	++++	++	++
	10	++++	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	0	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	++++
	10	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	0	++++	++++	++++
	0,5	++++	++++	++++
	10	++++	+++	++++

Nejvýraznější vliv KCl a sorbitolu na rezistenci k flukonazolu jsme pozorovali u *C. dubliniensis*. Proto jsme se rozhodli výsledky pro tento kmen potvrdit stanovením normovaného rlstu v tekutém médiu. Experiment potvrdil, že samotný FLC (10 µg/ml), 1,5 M KCl či 1,1 M sorbitol růst *C. dubliniensis* výrazně neovlivňují (Obr. 18.) Růst v přítomnosti samotných výše jmenovaných aditiv dosahuje minimálně 80 % pozitivní kontroly (OD₅₉₅ po 36 h bez aditiv). Přítomnost FLC (10 µg/ml) zároveň KCl 1,5M nebo sorbitolem 1,1 M způsobuje velmi silnou inhibici růstu *C. dubliniensis*. Výsledky měření normovaného růstu potvrzují výsledky kapkových testů.



Obr. 18 Nárůst *C. dubliniensis* v médiu YPD po 36 h při 30°C v přítomnosti FLC (10 µg/ml); 1,5 M KCl; 1,1 M sorbitolu. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

4.2.4 SOUHRN

Výsledky získané z pozorování růstu buněk na pevných i v tekutých médiích ukazují, že přítomnost subinhibičních koncentrací solí alkalických kovů výrazně zvyšuje senzitivitu *Candida* k flukonazolu. Nejvýrazněji ovlivňuje senzitivitu *Candida* chlorid sodný. Znatelně mírnější účinky má chlorid draselný. Nejméně rezistenci *Candida* k flukonazolu ovlivňuje sorbitol. Zásadně se liší míra inhibice jednotlivých drhů *Candida*. Nejvíce je rezistence k flukonazolu ovlivněna u kmene *C. dubliniensis*. Naopak testované podmínky nejlépe toleruje *C. glabrata*.

4.3 ITRAKONAZOL A KLOTRIMAZOL

Po experimentech zkoumajících vliv solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci *Candida* k flukonazolu jsme přistoupili k pokusům s jinými antimykotiky. Vybrali jsme dvě látky patřící společně s flukonazolem do skupiny azolových antimykotik. Jsou jimi systémové antimykotikum itrakonazol (ITR) a klotrimazol (KLO). S flukonazolem je spojuje shodný mechanismus účinku (kap. 2. 3. 1.). Chtěli jsme ověřit, zda vyšší citlivost k flukonazolu v přítomnosti NaCl, KCl a sorbitolu je či není specifická jen pro toto antimykotikum.

Stejně jako v pokusech popsanych v minulé kapitole jsme provedli sérii kapkových testů na pevných médiích a vybrané výsledky jsme ověřili sledováním růstu buněk v tekutých médiích (kap. 3. 2. 6.).

4.3.1 CITLIVOST *CANDIDA* K ITRAKONAZOLU A KLOTRIMAZOLU

Nejprve jsme ověřili citlivost všech čtyř druhů *Candida* k itrakonazolu a klotrimazolu. Použili jsme dvě koncentrace 0,5 µg/ml a 10 µg/ml, stejně jako v experimentech s flukonazolem. Koncentrace 0,5 µg/ml ITR nebo KLO nezpůsobila u žádné z *Candida* inhibici růstu, proto jsme ji považovali za subinhibiční pro všechny druhy *Candida*. Koncentrace ITR 10 µg/ml byla letální pro *C. parapsilosis* a způsobila silnou inhibici růstu kmenu *C. albicans* SC5314. Koncentrace KLO 10 µg/ml silně inhibovala kmen *C. parapsilosis* a *C. a.* SC5314. Pro tyto dva druhy není koncentrace itrakonazolu a klotrimazolu 10 µg/ml subinhibiční. Ostatní kmeny *Candida* obě látky v koncentraci 10 µg/ml zcela tolerovaly. Z výsledků vyplývá, že FLC-rezistentní kmeny *C. a.* 1173, *C. dubliniensis* a *C. glabrata* byly rezistentní i k itrakonazolu a klotrimazolu. FLC-senzitivní kmeny *C. a.* SC5314 a *C. parapsilosis* byly k těmto látkám senzitivní. Koncentrace 0,5 µg/ml a 10 µg/ml obou antimykotik byly v dalších experimentech považovány za subinhibiční (výsledky shrnuté v tomto odstavci nejsou graficky dokumentovány).

4.3.2 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDID* K ITRAKONAZOLU

Růst *Candid* v přítomnosti ITR a NaCl, KCl a sorbitolem jsme hodnotili podobně jako v pokusech s flukonazolem.

RŮST *CANDID* NA PEVNÉM MÉDIU

Pomocí kapkových testů jsme zkoumali růst *Candid* na médiu YPD s přídatkem itrakonazolu v kombinaci s chloridem sodným (1 ; 0,6 ; 0,3 mol/l), chloridem draselným 1,5 mol/l a sorbitolem 1,1 mol/l. Koncentrace solí a sorbitolu jsou shodné s koncentracemi použitými v experimentech s flukonazolem.

Velké množství provedených kapkových testů nás vedlo k tabulkovému vyjádření výsledků (Tab. 4.). Nejsilnější inhibiční účinky měl na všechny druhy *Candid* v kombinaci s ITR chlorid sodný. Kombinace ITR (10 µg/ml) s 1 M NaCl byla letální pro všechny druhy *Candid* s výjimkou druhu *C. glabrata*. U tohoto druhu je rezistence k ITR vlivem NaCl oslabena nejméně - jako jediný roste v přítomnosti 0,3 M NaCl a ITR 10 µg/ml bez známek inhibice.

O něco silněji je narušena rezistence k ITR u *C. a.* 1173. NaCl v koncentraci 1 mol/l nebo 0,6 mol/l v kombinaci s vyšší koncentrací ITR (10 µg/ml) je pro tento kmen letální. V přítomnosti 0,3 M NaCl v kombinaci s ITR (10 µg/ml) je růst tohoto kmene inhibován jen slabě.

U kmene *C. a.* SC5314, který je citlivý k ITR, jsou účinky NaCl v kombinaci s nižší koncentrací ITR (0,5 µg/ml) podobné jako u kmene *C. a.* 1173, který je k ITR rezistentní. Také růst *C. parapsilosis* je silně inhibován kombinací 0,5 µg/ml ITR s NaCl v koncentraci 1 nebo 0,6 mol/l, avšak *C. parapsilosis* na rozdíl od *C. a.* SC5314 velmi dobře roste v přítomnosti 0,5 µg/ml ITR a 0,3 M NaCl.

Velmi zajímavé jsou výsledky získané pro *C. dubliniensis*. Ačkoliv je tento druh k ITR rezistentní, je jeho rezistence k ITR v přítomnosti NaCl nejvíce oslabena. Již koncentrace ITR 0,5 µg/ml v kombinaci se všemi testovanými koncentracemi NaCl je pro tento druh letální.

Chlorid draselný a sorbitol nemají tak výrazné účinky na rezistenci *Candid* k itrakonazolu jako chlorid sodný. Nejlépe rostl v přítomnosti ITR v koncentraci 10 µg/ml a KCl (1,5 mol/l) nebo sorbitolu (1,1 mol/l) druh *C. glabrata*, u kterého jsme zaznamenali jen velmi slabou inhibici

růstu. Velmi podobně se choval kmen *C. a.* 1173, který rostl o něco hůře v přítomnosti ITR (10 µg/ml) a 1,5M KCl než *C. glabrata*.

Růst *C. albicans* SC5314 a *C. parapsilosis*, které jsou senzitivní k ITR, nebyl přítomností ITR (0,5 µg/ml) s 1,5 M KCl nebo 1,1 M sorbitolem nijak ovlivněn.

Nejvýrazněji ovlivňují KCl a sorbitol rezistenci k ITR u *C. dubliniensis*. Tento druh roste ze všech nejhůře v přítomnosti ITR 0,5 µg/ml v kombinaci s 1,5 M KCl nebo 1,1 M sorbitolem. Ještě výraznější inhibici růstu *C. dubliniensis* působí kombinace s KCl nebo sorbitolem s ITR ve vyšší koncentraci (10 µg/ml).

Tab. 5 Růst *Candid* na médiu YPD v přítomnosti ITR, NaCl, KCl a sorbitolu, 3. den při 30°C. Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce. Symbol „-“ označuje misky, kde kmen nerostl vůbec (kap. 3. 2. 6.). * médium bez NaCl, KCl a sorbitolu.

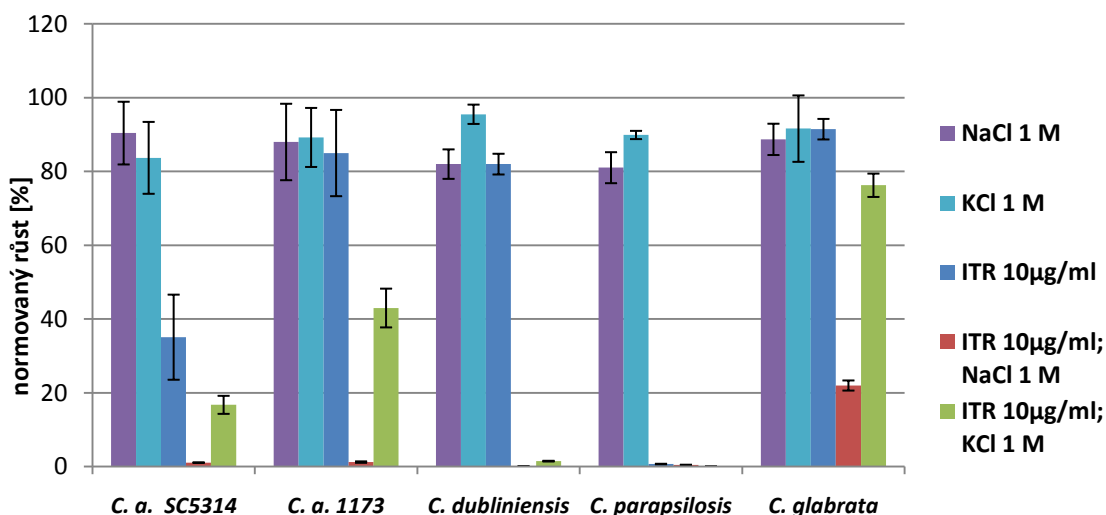
druh:	ITR(µg/ml)	Kontrola*	NaCl [M]			KCl 1,5 M	Sorbitol 1,1 M
			0,3	0,6	1		
	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. albicans</i> SC5314	0,5	++++	+++	+	-	++++	++++
	10	+	+	-	-	+	+
	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. albicans</i> 1173	0,5	++++	++++	+	-	++++	++++
	10	++++	+++	-	-	++	+++
	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. dubliniensis</i>	0,5	++++	-	-	-	++	++
	10	++++	-	-	-	+	+
	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. parapsilosis</i>	0,5	++++	++++	+	-	++++	++++
	10	-	-	-	-	-	-
	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>C. glabrata</i>	0,5	++++	++++	+++	++	++++	++++
	10	++++	++++	++	+	+++	+++

RŮST *CANDID* V TEKUTÉM MÉDIU

Nejprve jsme sledovali růst *Candid* v tekutém médiu YPD v přítomnost itrakonazolu v koncentraci 10 µg/ml s 1M NaCl nebo s 1M KCl. Koncentrace KCl byla oproti kapkovým testům upravena na 1 mol/l, abychom mohli porovnat účinky stejné koncentrace NaCl a KCl na rezistenci *Candid* k ITR. Samotný 1 M NaCl nebo 1 M KCl má na růst všech druhů *Candid* jen

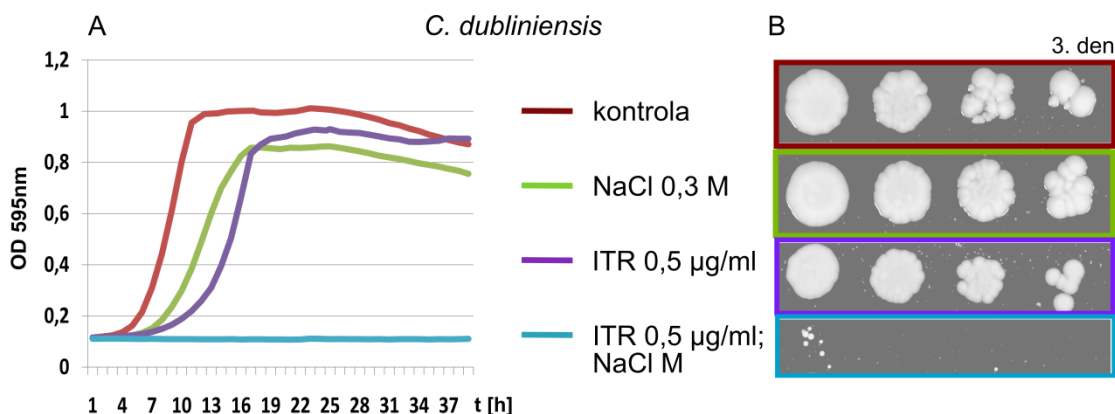
malý vliv (Obr. 19.). Všechny druhy rezistentní k ITR (*C. a. 1173*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*) dosahovaly v přítomnosti ITR (10 µg/ml) alespoň 80 % růstu buněk v kontrolním médiu (YPD bez aditiv). Přítomnost ITR společně s 1M NaCl měla na všechny druhy *Candida* s výjimkou kmene *C. glabrata* letální účinek. Přítomnost ITR v kombinaci s 1M KCl byla letální jen pro druhy *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*. Nejlépe v těchto podmínkách rostla *C. glabrata*. Silnější inhibici růstu působil ITR s 1M KCl na kmen *C. a. 1173*. Ještě slaběji rostl *C. a. SC5314*, který je k ITR citlivější než kmen 1173.

Chlorid sodný oproti chloridu draselnému ovlivnil rezistenci *Candida* k itrakonazolu mnohem silněji. Výsledky byly v souladu s výše popsanými kapkovými testy.



Obr. 19 Nárůst *Candida* v médiu YPD po 36 h při 30°C v přítomnosti ITR, NaCl a KCl. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

K nejvýraznějšímu ovlivnění rezistence k ITR dochází podle výsledků kapkových testů u *C. dubliniensis*, která nerostla již v přítomnosti ITR (0,5 µg/ml) a 0,3 M NaCl. Ověřili jsme tento výsledek pomocí měření růstových křivek a porovnali jsme je s výsledky kapkových testů. Sledovali jsme růst *C. dubliniensis* v tekutém médiu YPD s přidavkem ITR v koncentraci 0,5 µg/ml a 0,3 M NaCl. V přítomnosti samotného ITR nebo NaCl rostla *C. dubliniensis* téměř stejně jako v kontrolních podmínkách (YPD médium bez aditiv), avšak kombinace ITR a NaCl v uvedených koncentracích je pro tento kmen letální (Obr. 20. B). Na kapkovém testu se v těchto podmínkách objevilo několik rezistentních kolonií (Obr. 20. A).



Obr. 20 Růst *C. dubliniensis* v médiu v přítomnosti ITR 0,5 µg/ml; NaCl 0,3 M. (A) růstové křivky měřené při 30°C. (B) kapkový test 3. den 30°C. Data tvoří křivky proložené body tvořeny průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

4.3.3 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDID* KE KLOTTRIMAZOLU

V experimentech s klotrimazolem jsme postupovali analogicky k práci s flukonazolem a itrakonazolem.

RŮST *CANDID* NA PEVNÉM MÉDIU

Pomocí kapkových testů jsme zkoumali růst různých druhů *Candida* na pevném YPD médiu v přítomnosti klotrimazolu, NaCl, KCl a sorbitolu. Použité koncentrace klotrimazolu (0,5 µg/ml; 10 µg/ml), NaCl (1; 0,6 ; 0,3 mol/l), KCl (1,5 mol/l) a sorbitolu (1,1 mol/l) jsou stejné jako v předchozích experimentech. Pro přehlednost jsme zvolili tabulkový zápis výsledků kapkových testů (Tab. 6).

Nejsilněji ovlivnil rezistenci všech testovaných druhů *Candida* ke klotrimazolu chlorid sodný. V přítomnosti 1M NaCl v kombinaci s KLO (10 µg/ml) rostla jen *C. glabrata*, pro ostatní druhy byly tyto podmínky letální. Kmen *C. a. 1173*, který je rezistentní ke KLO, rostl v přítomnosti vyšší koncentrace KLO a NaCl (0,6 a 0,3 mol/l) vždy hůře než *C. glabrata*. V přítomnosti KLO v nižší koncentraci (0,5 µg/ml) a NaCl (0,6 a 0,3 mol/l) byla inhibice růstu obou kmenů *C. albicans* a *C. parapsilosis* srovnatelná. Nejvýrazněji byla vlivem NaCl ovlivněna rezistence vůči klotrimazolu u *C. dubliniensis*, která je ke KLO rezistentní. *C. dubliniensis* neroste

v přítomnosti 0,5 µg/ml KLO a 0,6 M NaCl. Také kombinace KLO s nejnižší testovanou koncentrací NaCl (0,3 mol/l) působí silnou inhibici růstu *C. dubliniensis*.

Tab. 6 Růst *Candid* na médiu YPD s aditivy, 3. den při 30°C. Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce. Symbol „-“ označuje misky, kde kmen nerostl vůbec (kap. 3. 2. 6.). * médium bez NaCl, KCl a sorbitolu.

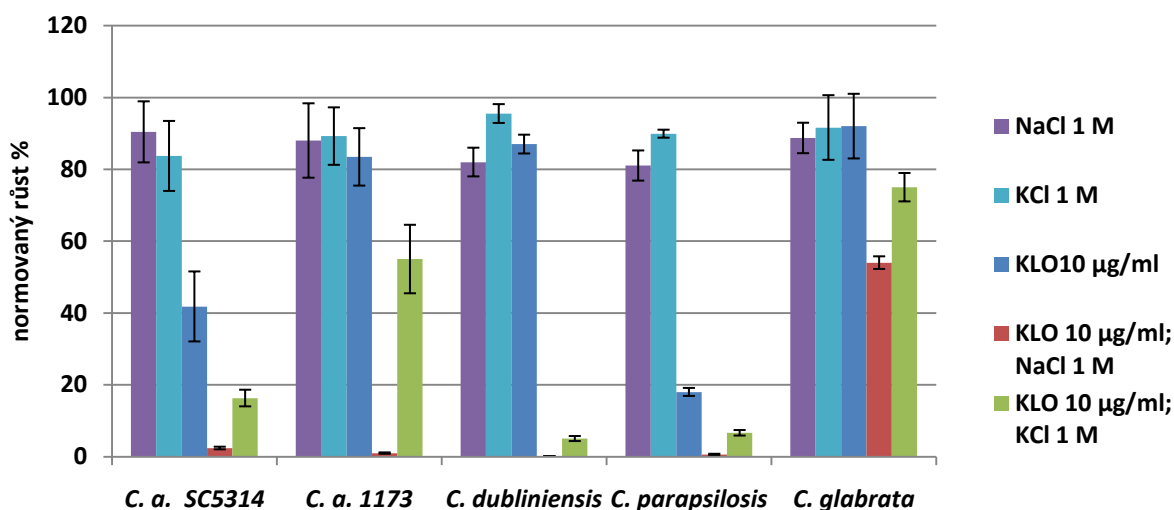
druh:	KLO(µg/ml)	Kontrola*	NaCl [M]				
			0,3	0,6	1	KCl 1,5 M	Sorbitol 1,1 M
<i>C. albicans</i> SC5314	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	0,5	+++++	+++++	++	-	+++++	+++++
	10	++	++	+	-	++	++
<i>C. albicans</i> 1173	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	0,5	+++++	+++++	++	-	+++++	+++++
	10	+++++	+++	+	-	+++	+++++
<i>C. dubliniensis</i>	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	0,5	+++++	++	-	-	+++	+++
	10	+++++	+	-	-	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	0,5	+++++	+++++	++	-	+++++	+++++
	10	+	+	+	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	0	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	0,5	+++++	+++++	+++	++	+++++	+++++
	10	+++++	+++++	++	+	+++	+++++

RŮST *CANDID* V TEKUTÉM MÉDIU

Podobně jako v experimentech s itrakonazolem jsme nejprve sledovali růst *Candid* v tekutém médiu v přítomnosti KLO (10 µg/ml) s 1 M NaCl nebo 1 M KCl. Snížení koncentrace KCl oproti

kapkovým testům na koncentraci 1 mol/l nám umožnila porovnat účinky KCl a NaCl stejné koncentrace. Samotný 1 M NaCl nebo 1 M KCl má na růst všech druhů *Candida* jen malý vliv (Obr. 21.). Všechny druhy rezistentní ke KLO (*C. a. 1173*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*) dosahovaly v přítomnosti KLO (10 µg/ml) alespoň 80 % růstu buněk v kontrolním médiu (YPD bez aditiv). Přítomnost KLO společně s 1M NaCl měla na všechny druhy *Candida* s výjimkou kmene *C. glabrata* letální účinek. Přítomnost KLO v kombinaci s 1M KCl byla letální jen pro druhy *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*. Nejlépe v těchto podmínkách rostla *C. glabrata*. Silnější inhibici růstu působil KLO s 1M KCl na kmen *C. a. 1173*. Ještě slaběji rostl *C. a. SC5314*, který je k KLO citlivější než kmen 1173.

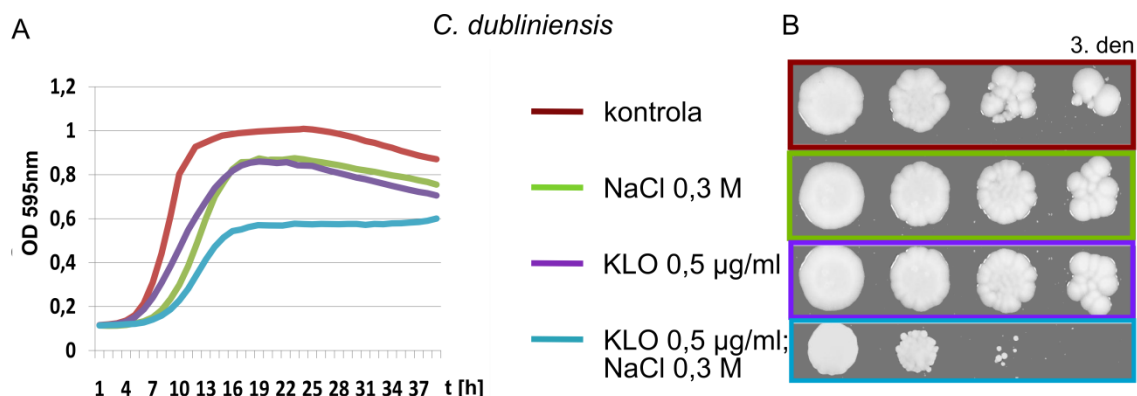
Podobně jako u itrakonazolu i rezistence *Candida* ke klotrimazolu je silněji ovlivněna NaCl než KCl. Výsledky získané pozorováním růstu *Candida* v tekutém médiu odpovídají výsledkům kapkových testů.



Obr. 21 Nárůst *Candida* v médiu YPD po 36 h při 30°C v přítomnosti KLO, NaCl, KCl. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku .

Stejně jako v přítomnosti FLC a ITR je i rezistence ke KLO nejvíce ovlivněna v přítomnosti NaCl či KCl u druhu *C. dubliniensis*. Obdobně jako v předchozích pokusech jsme chtěli ověřit měření růstových křivek, že růst *C. dubliniensis* je inhibován v přítomnosti nižší koncentrace KLO (0,5 µg/ml) a nejnižší testované koncentrace NaCl 0,3 mol/l. V přítomnosti samotného KLO 0,5 µg/ml nebo 0,3 M NaCl rostla *C. dubliniensis* téměř stejně jako v kontrolních podmínkách (YPD médium bez aditiv), avšak kombinace KLO a NaCl v uvedených koncentracích silně

inhibuje růst tohoto druhu. Výsledky kapkových testů (Obr. 22 B) se shodují s měřením růstových křivek (Obr. 22 A).



Obr. 22 Růst *C. dubliniensis* v médiu v přítomnosti KLO 0,5 µg/ml; NaCl 0,3 M. (A) růstové křivky měřené při 30°C. (B) kapkový test 3. den 30°C. Data tvoří křivky proložené body tvořeny průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

4.3.4 SOUHRN

Výsledky pokusů prezentovaných v této kapitole ukázaly, že vliv subinhibiční koncentrace NaCl, KCl a sorbitolu ovlivnil rezistenci *Candida* k itrakonazolu a klotrimazolu. Nejsilněji oslaboval rezistenci *Candida* k ITR a KLO chlorid sodný. Účinky chloridu draselného byly mnohem mírnější. Sorbitol ovlivnil rezistenci k ITR a KLO pouze u *C. dubliniensis*. Tento druh byl nejcitlivější k působení NaCl KCl či sorbitolu v kombinaci s ITR nebo KLO. Naopak druh s nejvyšší rezistencí k současnému působení ITR, KLO a solí je *C. glabrata*.

Vliv NaCl, KCl a sorbitolu na rezistenci různých druhů *Candida* k ITR a KLO byl téměř totožný s vlivem na rezistenci *Candida* k flukonazolu. Výsledky se lišily jen intenzitou inhibice. Itrakonazol disponuje silnější antimykotickou aktivitou než flukonazol, či klotrimazol (kap. 2. 3. 1.) a proto i porušení rezistence *Candida* k ITR mělo za následek výraznější inhibici růstu.

4.4 CALCOFLUOR WHITE A DODECYLSÍRAN SODNÝ

Série experimentů s azolovými antimykotiky ukázala, že soli alkalických kovů a sorbitol oslabují rezistenci různých druhů *Candida* k těmto antimykotikům. Dalším krokem naší práce bylo zjistit, zda přítomnost subinhibičních koncentrací solí alkalických kovů či sorbitolu ovlivňuje rezistenci *Candida* jen k azolovým antimykotikům, nebo jestli podobné efekty můžeme pozorovat i u dalších látek s antimykotickou aktivitou. Vybrali jsme dvě antifungálně aktivní látky – calcofluor white (CFW) a dodecylsírán sodný (SDS), které se na rozdíl od azolových antimykotik nepoužívají ve farmakoterapii. Vybrali jsme tyto dvě látky proto, že stejně jako azolová antimykotika porušují buněčné bariéry *Candida*. CFW blokuje syntézu chitinu a tím i tvorbu buněčné stěny, SDS díky své povaze detergentu narušuje integritu plasmatické membrány buněk (kap. 2. 3. 2.). Zajímalo nás, jak a jestli vůbec, působení subinhibičních koncentrací solí alkalických kovů a sorbitolu změni rezistenci *Candida* k CFW a SDS.

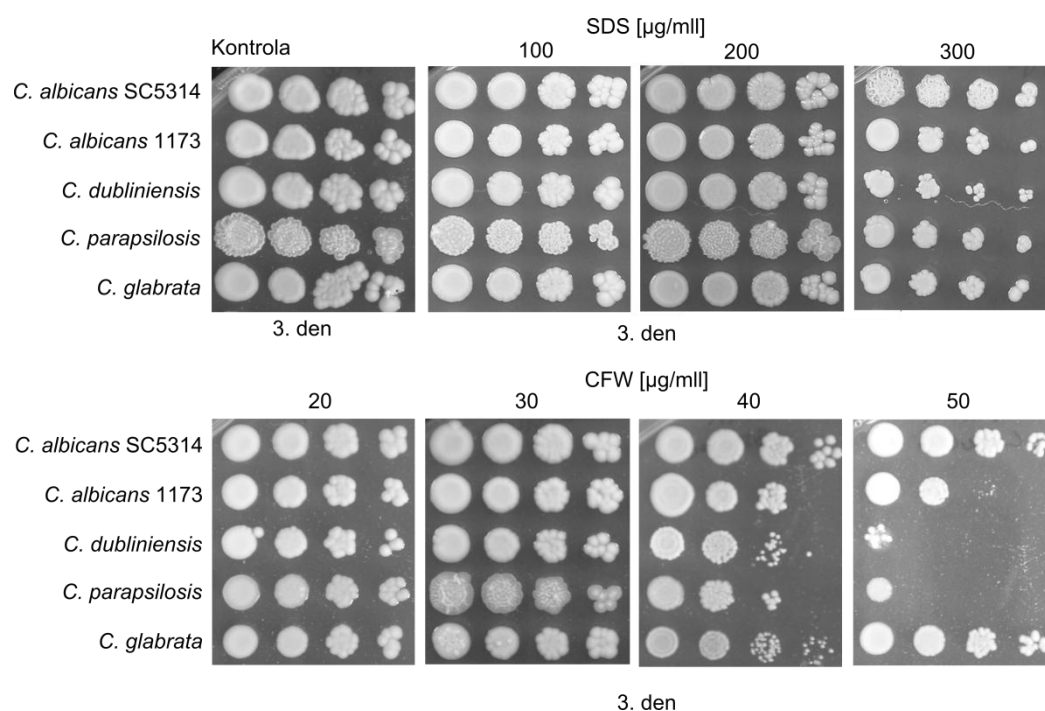
Pomocí kapkových testů jsme nejdříve stanovili subinhibiční koncentrace CFW a SDS, poté jsme provedli sérii kapkových testů s CFW, SDS, NaCl, KCl a sorbitolem – podobně jako u pokusů s azolovými antimykotiky. Vybrané výsledky jsme ověřili sledováním růstu *Candida* v tekutém médiu.

4.4.1 STANOVENÍ SUBINHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ CFW A SDS

Pro stanovení subinhibičních koncentrací obou látek jsme využili kapkové testy (kap. 3. 2. 6.). Sledovali jsme růst různých druhů *Candida* na médiu YPD v přítomnosti CFW a SDS v různých koncentracích.

Použitá koncentrace CFW byla v rozmezí 20 až 50 $\mu\text{g/ml}$. V přítomnosti CFW v koncentracích 20 $\mu\text{g/ml}$ a 30 $\mu\text{g/ml}$ rostly buňky všech kmenů *Candida* stejně jako na kontrolním médiu (YPD bez aditiv), (Obr. 23). Koncentrace CFW 40 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$ již působila na některé druhy inhibičně. Nejvíce citlivé k CFW byly druhy *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*. Lépe rostl při vyšších koncentracích CFW kmen *C. a.* 1173. Nejvíce rezistentní k CFW byly *C. a.* SC5314 a *C. glabrata*. Nejvyšší testovaná koncentrace, která nezpůsobila inhibici růstu u žádného druhu *Candidy*, je CFW 30 $\mu\text{g/ml}$. Tato koncentrace splnila naše podmínky pro další použití jako subinhibiční koncentrace CFW.

Ve druhém případě jsme sledovali růst *Candida* na médiu YPD v přítomnosti SDS v koncentracích 100, 200, 300 µg/ml (Obr. 23). Přítomnost SDS v médiu v koncentracích 100 a 200 µg/ml neměla na růst testovaných druhů *Candida* vliv. Zpomalení růstu a také úbytek životaschopných buněk v makrokoloniích se projevily u všech testovaných *Candida* až při koncentraci SDS 300 µg/ml. Nejvyšší subinhibiční koncentrace SDS je tedy 200 µg/ml pro všechny druhy *Candida*.



Obr. 23 Růst *Candida* na médiu YPD v přítomnosti CFW a SDS při 30 °C.

4.4.2 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDIDA* VŮČI CALCOFLUOR WHITE

Experimenty byly zaměřeny na vliv subinhibičních koncentrací NaCl, KCl a sorbitolu na rezistenci *Candida* k CFW a probíhaly stejně jako předchozí pokusy s azolovými antimykotiky. Nejprve byla provedena série kapkových testů a vybrané výsledky těchto testů byly ověřeny sledováním růstu *Candida* v tekutém médiu. Na rozdíl od pokusů s azoly jsme netestovali vliv NaCl v koncentraci 0,3 M.

RŮST *CANDID* NA PEVNÉM MÉDIU

Pomocí kapkových testů jsme zkoumali růst různých druhů *Candida* na pevném YPD médiu v přítomnosti CFW, chloridu sodného, chloridu draselného a sorbitolu. Použité subinhibiční koncentrace aditiv byly: CFW 30 µg/ml, NaCl 1; 0,6 mol/l, KCl 1,5 mol/l a sorbitol 1,1 mol/l. Pro přehlednost jsme zvolili tabulkový zápis výsledků kapkových testů (Tab. 7).

Subinhibiční koncentrace NaCl společně se subinhibiční koncentrací CFW působily inhibičně na všechny druhy *Candida*. Kombinace CFW s 1 M NaCl byla letální pro *C. dubliniensis*. Jen velmi slabě rostl v těchto podmínkách kmen *C. a.* 1173, lépe rostly kmen *C. a.* SC5314, *C. parapsilosis* a *C. glabrata*. Nižší koncentrace NaCl (0,6 M) společně s CFW byla stále pro *C. dubliniensis* letální. U ostatních kmenů byl růst inhibován slaběji než v přítomnosti 1 M NaCl, avšak mírná inhibice je znatelná u všech druhů *Candida*.

Přítomnost 1,5 M KCl společně s CFW v médiu inhibovala růst *Candida* méně než NaCl. Nejhůře rostl v těchto podmínkách druh *C. dubliniensis*, o něco lépe kmen *C. a.* 1173. Jen malé zhoršení růstu oproti kontrole (růst na médiu YPD bez aditiv) jsme pozorovali u kmenu *C. a.* SC5314 a *C. parapsilosis*. Naopak růst druhu *C. glabrata* nebyl kombinací CFW a KCl inhibován.

Současná přítomnost sorbitolu a CFW v médiu měla inhibiční vliv pouze na kmen *C. dubliniensis*. Ostatní kmeny *Candida* rostly stejně jako na kontrolním médiu (Tab. 7).

Tab. 7 Růst *Candid* na médiu YPD s CFW, SDS, NaCl, KCl a sorbitolem 3. den při 30°C. Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce. Symbol „-“ označuje misky, kde kmen nerostl vůbec (kap. 3. 2. 6.). * médium bez NaCl, KCl a sorbitolu.

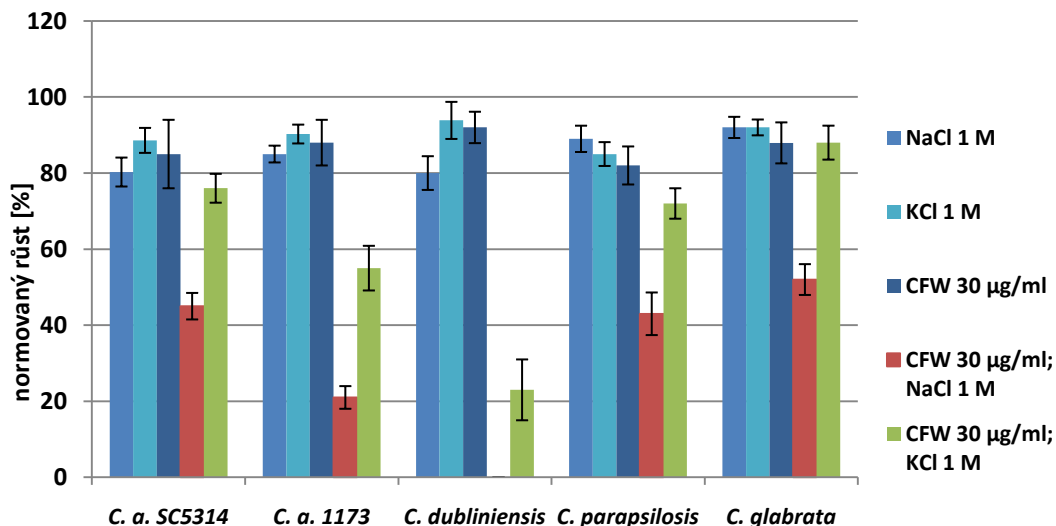
druh:	CFW(μg/ml)	Kontrola*	NaCl [M]		KCl 1,5 M	Sorbitol 1,1 M
			0,6	1		
<i>C. albicans</i> SC5314	0	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	+++	++	+++	++++
<i>C. albicans</i> 1173	0	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	++	+	++	++++
<i>C. dubliniensis</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	-	-	+	++
<i>C. parapsilosis</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	+++	++	+++	++++
<i>C. glabrata</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	+++	++	++++	++++

RŮST *CANDID* V TEKUTÉ MÉDIU

Pro ověření vybraných výsledků kapkových testů jsme stanovením normovaného růstu hodnotili růst *Candid* v tekutém médiu v CFW 30 μg/ml, 1M NaCl a 1M KCl. Koncentrace CFW a NaCl je stejná jako u kapkových testů. Koncentrace KCl je oproti kapkovým testům nižší, protože jsme chtěli porovnat účinky NaCl a KCl stejné koncentrace.

Potvrdili jsme, že použitá koncentrace CFW je subinhibiční, protože všechny kmeny *Candid* dorůstají alespoň 80 % růstu kontroly (růst buněk v médiu YPD bez aditiv), (Obr. 24). Výrazně silnější účinky na rezistenci *Candid* k CFW má oproti chloridu draselnému chlorid sodný. Přítomnost NaCl v médiu společně s CFW je letální pro *C. dubliniensis*. Velmi silně je zpomalen růst kmenů *C. a.* 1173 a *C. parapsilosis*. Lépe roste *C. a.* SC5314, nejméně je inhibován je kmen *C. glabrata*. Chlorid draselný společně s CFW inhibuje všechny testované kmeny méně, než

chlorid sodný ve stejné koncentraci. Nehůře roste v přítomnosti KCl a CFW *C. dubliniensis*, naopak *C. glabrata* roste téměř stejně jako v kontrolním médiu bez aditiv.



Obr. 24 Nárůst *Candida* v médiu YPD po 36 h při 30°C v přítomnosti CFW, NaCl a KCl. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

4.4.3 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ A SORBITOLU NA REZISTENCI *CANDID* K DODECYLSÍRANU SODNÉMU

Při práci s dodecylsíránem sodným (SDS) jsme postupovali obdobně jako u pokusů s CFW. Sledovali jsme vliv subinhibičních koncentrací NaCl, KCl a sorbitolu na rezistenci *Candida* k SDS. Nejprve byla provedena série kapkových testů a vybrané výsledky těchto testů byly ověřeny sledováním růstu *Candida* v tekutém médiu (kap. 3. 2. 6.).

RŮST *CANDID* NA PEVNÉM MÉDIU

Pomocí kapkových testů jsme zkoumali růst různých druhů *Candida* na pevném YPD médiu v přítomnosti SDS, chloridu sodného, chloridu draselného a sorbitolu. Použité subinhibiční koncentrace aditiv jsou: SDS 200 µg/ml, 1 M nebo 0,6 M NaCl, 1,5 M KCl a 1,1 M sorbitol. Pro přehlednost jsme zvolili tabulkový zápis výsledků kapkových testů (Tab. 8).

Stejně jako v pokusech s ostatními antimykoticky aktivními látkami je rezistence *Candida* k SDS nejsilněji ovlivněna působením chloridu sodného. SDS společně s NaCl inhibují růst všech

testovaných druhů. *C. dubliniensis* v přítomnosti SDS a 0,6 M NaCl neroste vůbec. Kmeny *C. a.* SC5314, *C. a.* 1173 a *C. parapsilosis* jsou schopné slabě růst v přítomnosti SDS a NaCl. Nejméně je růst ovlivněn u druhu *C. glabrata*. Kombinace SDS a 1 M NaCl sice působí výrazně inhibičně i na tento kmen, avšak při nižší koncentraci NaCl tento efekt slábne.

Chlorid draselný v koncentraci 1,5 mol/l v kombinaci s SDS inhibuje nejsilněji opět *C. dubliniensis*. Lépe rostou kmeny *C. a.* SC5314, *C. a.* 1173 a *C. parapsilosis*. Kmen *C. glabrata* roste v těchto podmínkách bez známek inhibice.

Vliv sorbitolu (1,1 mol/l) v kombinaci s SDS 200 má nepříznivý vliv na růst jen u kmene *C. dubliniensis* (Tab. 8).

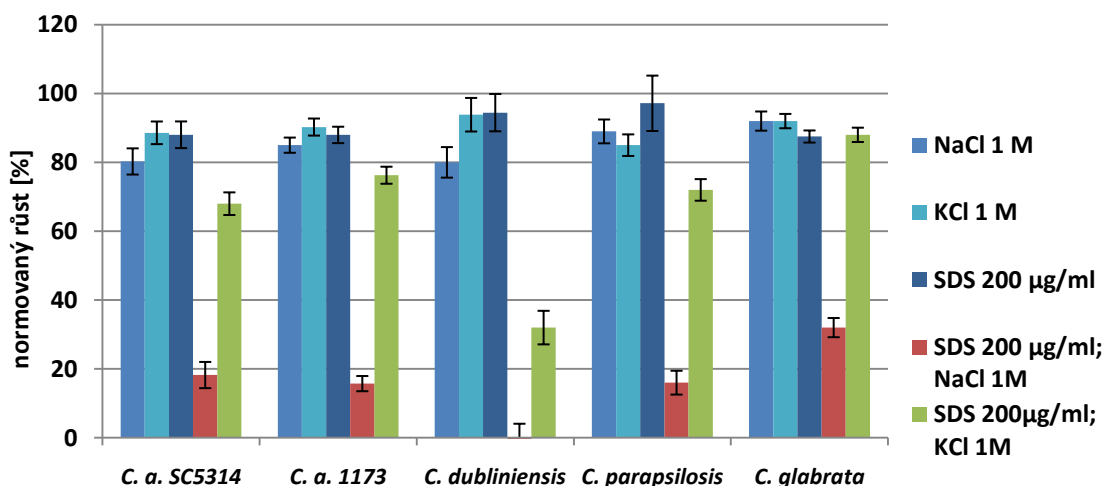
Tab. 8 Růst různých druhů *Candida* na médiu YPD s SDS, NaCl, KCl a sorbitolem, 3. den při 30°C. Symbol „+“ znázorňuje růst jedné kapky na misce. Symbol „-“ označuje misky, kde kmen nerostl vůbec (kap. 3. 2. 6.). * médium bez NaCl, KCl a sorbitolu.

druh:	SDS(μg/ml)	Kontrola*	NaCl [M]		KCl 1,5 M	Sorbitol 1,1 M
			0,6	1		
<i>C. albicans</i> SC5314	0	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	++	+	+++	++++
<i>C. albicans</i> 1173	0	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	++	+	+++	++++
<i>C. dubliniensis</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	-	-	+	++
<i>C. parapsilosis</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	++	+	+++	++++
<i>C. glabrata</i>	0	++++	++++	++++	++++	++++
	200	++++	+++	++	++++	++++

RŮST *CANDID* V TEKUTÉM MÉDIU

Pro ověření vybraných výsledků kapkových testů jsme hodnotili růst *Candida* v tekutém médiu a stanovili jsme normovaný růst v médiu YPD s SDS v koncentraci 200 µg/ml, 1 M NaCl a 1 M KCl. Koncentrace KCl je podobně jako u pokusů s CFW oproti kapkovým testům nižší, protože jsme chtěli porovnat účinky NaCl a KCl o stejné koncentraci.

Stanovením normovaného růstu jsme ověřili, že koncentrace SDS 200 µg/ml je subinhibiční, protože všechny kmeny *Candida* dorůstaly alespoň 80 % růstu kontroly (růst buněk v médiu YPD bez aditiv (Obr. 25). Výrazně silnější účinky na rezistenci *Candida* k SDS měla oproti chloridu draselnému chlorid sodný. Přítomnost NaCl v médiu společně s SDS byla letální pro *C. dubliniensis*. Velmi silně byl zpomalen růst kmenů *C. a. SC5314*, *C. a. 1173* a *C. parapsilosis*, které dosahovaly zhruba 17 % růstu buněk v kontrolním médiu. Nejméně byl inhibován druh *C. glabrata*. Inhibiční účinky KCl v kombinaci s SDS byly ve srovnání s NaCl téměř zanedbatelné, s výjimkou *C. dubliniensis*, u které kombinace SDS a KCl vyvolala silnou inhibici růstu.



Obr. 25 Nárůst *Candida* v médiu YPD po 36 h při 30°C v přítomnosti SDS, NaCl a KCl. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

4.4.4 SOUHRN

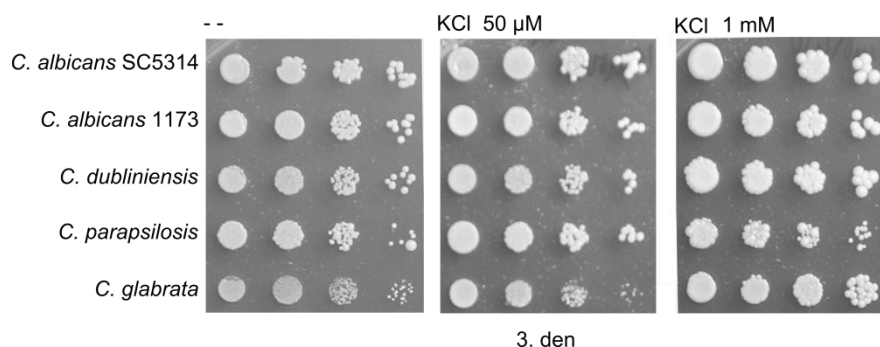
Výsledky představené v této kapitole dokázaly, že antimykoticky aktivní látky calcofluor white a dodecylsírán sodný v kombinaci se NaCl vyvolaly silnou inhibici růstu u všech testovaných druhů *Candida*. Inhibiční působení KCl v kombinaci s CFW nebo SDS bylo oproti NaCl mnohem slabší. Obdobně jako v případě azolových antimykotik je i rezistence k SDS a CFW nejsilněji ovlivněna u *C. dubliniensis*. Naopak nejlépe rostl v prostředí s CFW nebo SDS a se solemi druh *C. glabrata*.

4.5 REZISTENCE *CANDID* K ANTIMYKOTIKŮM V PROSTŘEDÍ S MINIMÁLNÍ KONCENTRACÍ DRASELNÝCH KATIONTŮ

Experimenty zahrnuté v této kapitole měly za úkolu objasnit, jak a zdali vůbec, hraje limitně nízká koncentrace draselných iontů roli v rezistenci *Candid* k různým antimykoticky aktivním látkám. Předchozí experimenty zkoumaly, jak vyšší koncentrace solí alkalických kovů a sorbitolu ovlivňují rezistenci *Candid* k různým antimykoticky aktivním látkám. Protože všechny buňky musí udržovat vysokou vnitrobuněčnou koncentraci K^+ (kap. 2. 2.), zajímalo nás, jak a jestli vůbec, bude narušena rezistence *Candid* k antimykoticky aktivním látkám v prostředí s velmi omezeným množstvím K^+ . Z doposud testovaných látek jsme si pro následující pokusy vybrali flukonazol jako zástupce azolových antimykotik, calcofluor white a dodecylsírán sodný. Využili jsme kapkové testy na pevných půdách i měření růstových křivek a stanovení normovaného růstu v tekutých médiích (kap. 3. 2. 6.). Použili jsme syntetické růstové médium YNB- K^+ s velmi nízkou koncentrací K^+ (15 μ M), (kap. 3. 1. 1.).

4.5.1 RŮST *CANDID* V PROSTŘEDÍ S MINIMÁLNÍ KONCENTRACÍ DRASELNÝCH IONTŮ

Nejprve jsme zjišťovali, jak jsou různé druhy *Candid* schopny růst v médiu s různou koncentrací draselných iontů. Sledovali jsme růst *Candid* na pevném médiu YNB- K^+ s koncentrací draselných iontů jen 15 μ M a v tomtéž médiu do kterého byl přidán KCl do konečné koncentrace 50 μ M a 1mM (Obr. 26). V prostředí s limitně nízkou koncentrací KCl rostou všechny druhy *Candid*, i když pomaleji než v přítomnosti vyšší koncentrace KCl. Jediný kmen, který roste hůře než ostatní je *C. glabrata*. Při koncentraci KCl 50 μ M v médiu rostou *Candidy* srovnatelně, jako bez přidaného KCl. Přídavek 1 mM KCl způsobí zlepšení růstu všech druhů, makrokolonie jsou ve srovnání s podmínkami s nižší koncentrací KCl větší. Největší rozdíl v růstu jsme zaznamenali u kmene *C. glabrata*, který v prostředí s 1 mM KCl roste stejně dobře jako ostatní druhy *Candid*. O trochu hůře v těchto podmínkách roste kmen *C. parapsilosis*. Tento rozdíl může být způsoben nízkým obsahem živin v médiu. YNB- K^+ oproti bohatému médiu YPD.

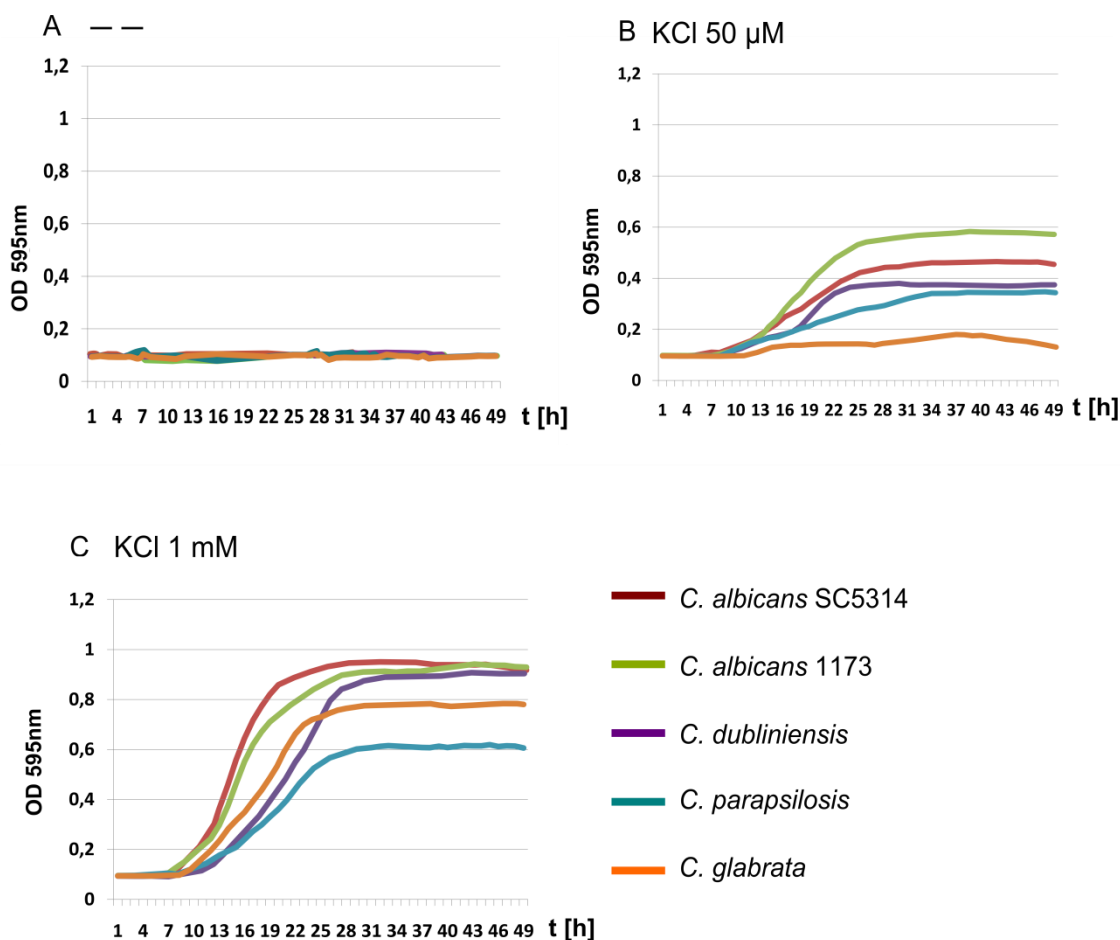


Obr. 26 Růst *Candida* na médiu YNB-K⁺ 3. den, při 30°C bez přidaného KCl a s přídatkem 50 µM, 1 mM KCl.

Následně jsme hodnotili růst *Candida* v tekutém médiu YNB-K⁺ pomocí měření růstových křivek. Stejně jako v experimentech na pevných půdách jsme sledovali růst *Candida* v samotném médiu YNB-K⁺ s limitně nízkou koncentrací draselných iontů a v tomtéž médiu s přidaným KCl o výsledné koncentraci 50 µmol/l a 1 mmol/l (Obr. 27).

V samotném médiu YNB-K⁺ nebyl schopen růstu žádný druh *Candidy* (Obr. 27 A). Tento výsledek je v rozporu s kapkovými testy. Růst na pevném médiu YNB-K⁺ umožňuje *Candidám* zřejmě přidaný agar, který obsahuje malé množství draselných iontů.

V přítomnosti 50 µM KCl v médiu YNB-K⁺ rostou všechny druhy *Candida*, jejich růst je však výrazně pomalejší než v přítomnosti vyšších koncentrací KCl. Nejhůře roste v těchto podmínkách stejně jako na miskách *C. glabrata* (Obr. 27 B). 1 mM KCl v médiu umožňuje normální růst *Candida* a dosažení vyšší OD ve stacionární fázi. V přítomnosti vyšší koncentrace KCl, stejně jako v případě kapkových testů roste o něco hůře než ostatní druhy *C. parapsilosis* (Obr. 27 C).



Obr. 27 Růst *Candida* médiu YNB-K⁺ při 30°C bez přidaného KCl (A), s KCl v koncentracích 50 µM (B) a 1 mM (C). Data tvoří křivky proložené body tvořené průměrnou hodnotou OD₅₉₅ měřenou v intervalu 1 hodiny. Chybové úsečky nejsou zobrazeny, protože směrodatná odchylka nepřesáhla 15 %.

4.5.2 VLIV LIMITNĚ NÍZKÉ KONCENTRACE DRASELNÝCH IONTŮ NA REZISTENCI *CANDIDA* K ANTIMYKOTIKŮM

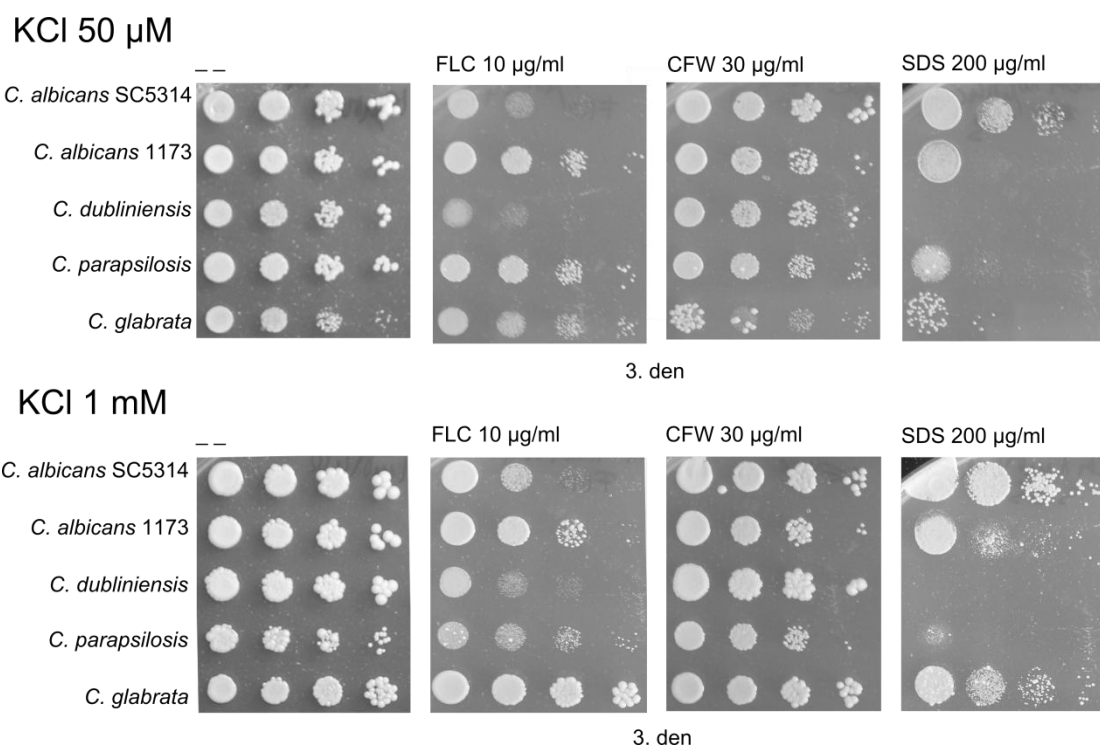
Po sérii pokusů, které byly zaměřené na růst *Candida* v prostředí s limitně nízkým obsahem draselných iontů, jsme přistoupili k pokusům s antimykoticky aktivními látkami. Cílem bylo zjistit, jak se mění rezistence jednotlivých druhů *Candida* k různým látkám s antifungální aktivitou v prostředí s nízkým obsahem draselných iontů. Pro následující experimenty jsme vybrali z azolových antimykotik flukonazol (FLC) 10µg/ml, dále jsme použili calcofluoro white (CFW) 30µg/ml a dodecylsírán sodný (SDS) 200µg/ml. Výsledky z kapitoly 4. 5. 1. ukázaly rozdíly v růstu *Candida* na médiu YNB-K⁺ s agarem a v médiu tekutém. Vybrali jsme si takové podmínky, při kterých byly *Candidy* schopné růst na pevném i v tekutém médiu. Antimykoticky aktivní látky jsme přidávali do média YNB-K⁺ společně s 50 µM a 1 mM KCl. Použité subinhibiční

koncentrace antimykotik jsou shodné s dřívějšími pokusy (kap. 4. 2. 2., kap. 4. 4. 1.). Provedli jsme sérii kapkových testů na pevných půdách a vybrané výsledky jsme ověřili stanovením normovaného růstu v tekutých médiích (kap. 3. 2. 6.).

Pomocí kapkových testů jsme hodnotili růst *Candida* na pevném médiu YNB-K⁺ v prostředí s přidaným 50 μM nebo 1 mM KCl v kombinacích s FLC (10 μg/ml), CFW (30 μg/ml) a SDS (200 μg/ml). Přítomnost flukonazolu v médiu nejvíce oslabila růst FLC-senzitivního kmene *C. a.* SC5314 a FLC-rezistentního druhu *C. dubliniensis*. Míra inhibice se příliš nelišila v prostředí s rozdílnou koncentrací draselných iontů. O něco lépe rostly v těchto podmínkách FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173 a FLC-rezistentní kmen *C. parapsilosis*. U kmene *C. a.* 1173 byl rozdíl v růstu v prostředí s nižší, či vyšší koncentrací KCl v kombinaci s FLC minimální. *C. parapsilosis* lépe tolerovala přítomnost FLC v prostředí s nižší koncentrací KCl v médiu. FLC-rezistentní *C. glabrata* rostla srovnatelně s kontrolou v přítomnosti FLC v kombinaci s oběma koncentracemi KCl (Obr. 28).

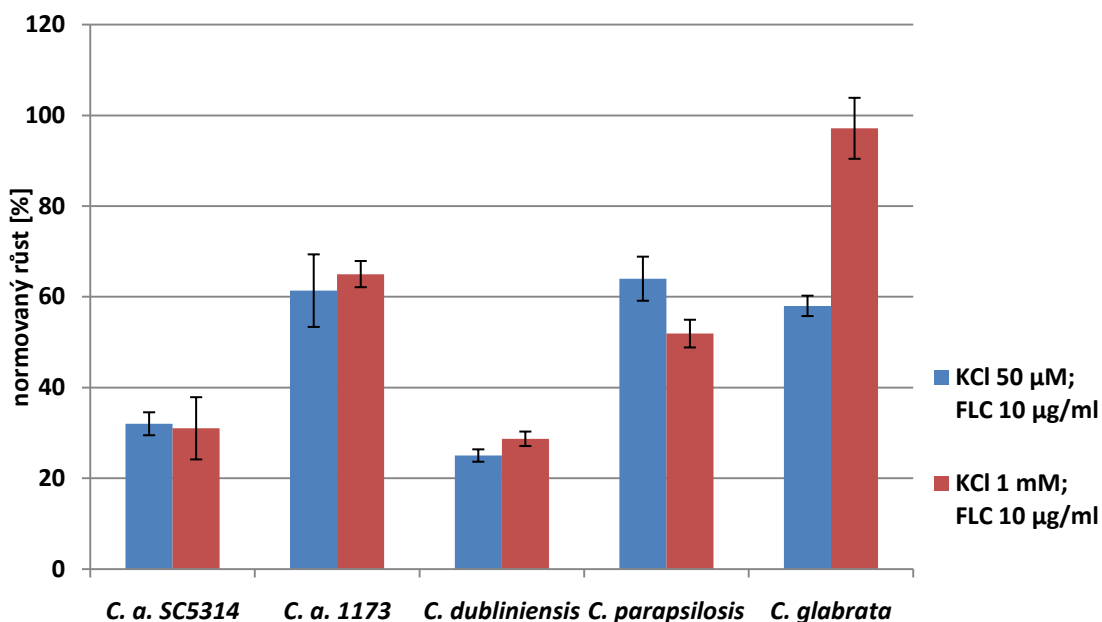
Vliv CFW 30 μg/ml na růst *Candida* v médiu s různou koncentrací KCl byl minimální. Růst byl inhibován v prostředí s nízkou koncentrací draselných iontů a s CFW pouze u druhu *C. glabrata* (Obr. 28).

Nejvýrazněji ovlivnila růst *Candida* přítomnost SDS 200 μg/ml v médiu. V médiu s koncentrací 50 μM i 1 mM KCl a SDS je inhibován růst všech druhů *Candida*. Koncentrace SDS 200 μg/ml není tedy pro *Candidy* v prostředí média YNB-K⁺ subinhibiční (Obr. 28).



Obr. 28 Růst *Candida* na médiu YNB-K⁺ 3. den při 30°C v přítomnosti KCl, FLC, CFW a SDS.

Pomocí stanovení normovaného růstu jsme sledovali růst *Candida* v tekutém médiu YNB-K⁺ v přítomnosti FLC 10 μ g/ml a 50 μ M nebo 1 mM KCl. Průměrnou OD₅₉₅ změřenou po 36 h inkubace jsme normovali na průměrnou OD₅₉₅ buněk, které rostly v médiu YNB-K⁺ s 50 μ M nebo 1 mM KCl (Obr. 29). Ve shodě s výsledky kapkových testů rostli i v tekutém médiu YNB-K⁺ v přítomnosti FLC nejhůře FLC-rezistentní druh *C. dubliniensis*. Kmen s druhým nejslabším růstem je FLC-senzitivní *C. a.* SC5314. Rozdíly v růstu u těchto kmenů v přítomnosti vyšší či nižší koncentrace přidaného KCl jsou zanedbatelné. FLC-rezistentní kmen *C. a.* 1173 dorůstá v přítomnost FLC zhruba 60 % růstu buněk v kontrolním médiu (médiu bez FLC) v prostředí s nižší i vyšší koncentrací KCl. *C. parapsilosis* se chová podobně jako *C. albicans* 1173, avšak při vyšší koncentraci KCl v médiu roste o trochu slaběji než při koncentraci nižší. Největší rozdíl v růstu v závislosti na koncentraci KCl v médiu jsme pozorovali u kmene *C. glabrata*. Přítomnost FLC 10 μ g/ml v médiu s 50 μ M KCl dorůstá tento kmen necelých 60 %, avšak v přítomnosti 1 mM KCl není inhibiční vliv FLC na tento druh znatelný.



Obr. 29 Nárůst *Candida* v YNB-K⁺ médiu po 36 h, při 30°C s 50 µM a 1 mM KCl, FLC 10 µg/ml. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku

4.5.3 SOUHRN

V prostředí s limitně nízkou koncentrací draselných iontů roste nejhůře druh *C. glabrata*. Tento druh byl také jediný, u kterého se projevila inhibice růstu v prostředí s nízkým obsahem draselných iontů a s calcofluor white. Koncentrace dodecylsírany sodného, která je v médiu bohatém na živiny YPD subinhibiční pro všechny testované druhy *Candida* inhibuje v médiu YNB-K⁺ růst všech testovaných druhů a nedá se proto považovat v tomto médiu za subinhibiční. Rezistence k flukonazolu byla nejvíce ovlivněna u *C. dubliniensis*, avšak bez souvislosti s obsahem K⁺ v médiu – rezistence k FLC toho druhu je ovlivněna pravděpodobně samotným médiem YNB-K⁺.

4.6 AMIODARON A PHENYTOIN

V předchozích experimentech jsme zkoumali, jak subinhibiční koncentrace solí alkalických kovů ovlivňují rezistenci různých druhů *Candida* k antimykoticky aktivním látkám, které poškozují buněčné bariéry. Pracovali jsme s azolovými antimykotiky (flukonazolem, itrakonazolem a klotrimazolem), které ovlivňují složení plasmatické membrány *Candida*. Dále jsme používali calcofluor white, který poškozuje buněčnou stěnu, a dodecylsírán sodný, jehož amfifilní charakter narušuje především plasmatickou membránu *Candida*.

Zajímalo nás, jestli přítomnost subinhibičních koncentrací solí v médiu ovlivní rezistenci *Candida* i k antimykoticky aktivním látkám, které nepoškozují buněčné bariéry. Pro další pokusy jsme vybrali amiodaron (AMD), který má prokázané antifungální účinky (kap. 2. 3. 3.). Druhou látkou zařazenou do této série experimentů je antiepileptikum phenytoin (PH) (kap. 2. 3. 3.). Dodnes nebyla prokázána antifungální aktivita této látky. Do naší práce jsme zařadili phenytoin kvůli jeho schopnosti blokovat sodné kanály buněk myokardu a neuronů. Předpokládali jsme, že pokud má phenytoin afinitu i ke k transportérům sodných kationtů *Candida*, mohl by se jeho antimykotický účinek projevit v prostředí s vyšší koncentrací sodných, či draselných kationtů.

Pro sledování vlivu solí alkalických kovů a sorbitolu na rezistenci *Candida* k AMD a PH jsme využili stanovení normovaného růstu v tekutém médiu (kap. 3. 2. 6.). Kapkové testy na pevném YPD médiu jsme vyloučili, protože jsme v literatuře nenašli případ použití AMD nebo PH v pevném médiu.

4.6.1 STANOVENÍ SUBINHIBIČNÍCH KONCENTRACÍ AMIODARONU A PHENYTOINU

Pozorovali jsme růst *Candida* v tekutém médiu YPD v přítomnosti AMD nebo PH. Koncentrace AMD ležely v intervalu 40 – 80 $\mu\text{g/ml}$. Horní hranice tohoto intervalu byla limitována rozpustností AMD, který se v koncentraci nad 80 $\mu\text{g/ml}$ v médiu sráží. Použité koncentrace PH (10 - 100 $\mu\text{g/ml}$) jsme převzali z práce (Esiobu & Hoosein 2003), která se zabývala potenciální antimykotickou aktivitou phenytoinu. Všechny druhy *Candida* rostly v přítomnosti obou látek v nejvyšší testované koncentraci bez známek inhibice.

Pro další pokusy jsme pro všechny druhy *Candida* používali subinhibiční koncentraci AMD (80 $\mu\text{g/ml}$) a PH (100 $\mu\text{g/ml}$).

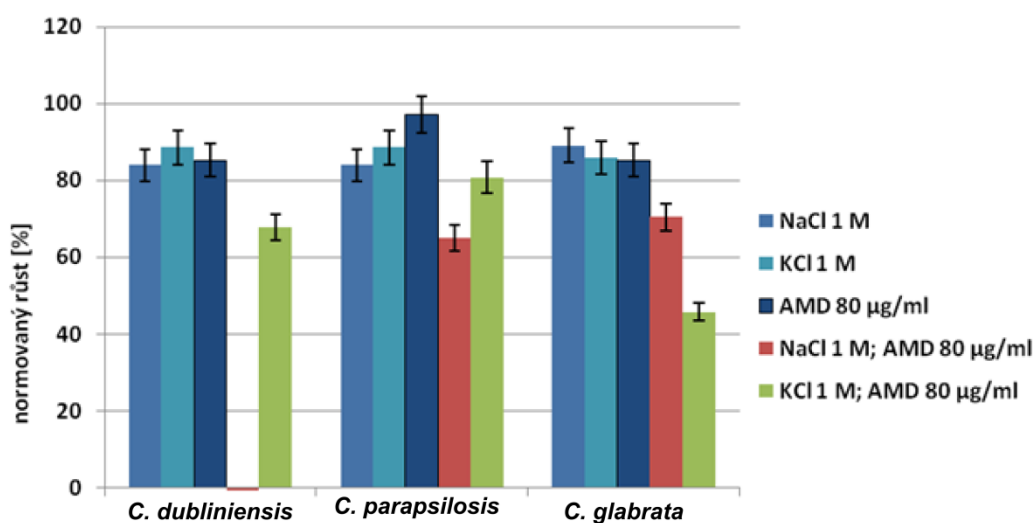
4.6.2 VLIV SOLÍ ALKALICKÝCH KOVŮ NA REZISTENCI *CANDID* K AMIODARONU A PHENYTOINU

Experimenty byly zaměřeny na vliv subinhibičních koncentrací NaCl, KCl na rezistenci *Candida* k AMD a PH a měly podobný průběh jako předchozí pokusy s ostatními antimykoticky aktivními látkami. Sledovali jsme růst *Candida* v tekutém médiu YPD v přítomnosti AMD (80 µg/ml) a PH (100 µg/ml) s 1 M NaCl a 1 M KCl.

Přítomnost phenytoinu v kombinaci s NaCl nebo KCl neměla vliv na růst žádného druhu *Candida*. Rozhodli jsme se, že v této práci nebudeme testovat vliv vyšších koncentrací na růst *Candida* a pokusy s phenytoinem jsme ukončili.

Současná přítomnost AMD (80 µg/ml) a 1 M NaCl či 1 M KCl neměla žádný vliv na růst obou kmenů *C. albicans*, a proto jsme pokusy opakovaly jen se zbývajícím druhem *Candida*. U *C. parapsilosis* opakovaně došlo jen k mírné inhibici růstu v přítomnosti s AMD a NaCl. Naproti tomu pro *C. dubliniensis* byly tyto podmínky letální. Kombinace subinhibičních koncentrací AMD a KCl neměla na *C. dubliniensis* tak silný inhibiční vliv jako kombinace s NaCl. *C. parapsilosis* rostla v přítomnosti AMD a KCl srovnatelně s buňkami v kontrolním médiu (médiu YPD bez aditiv), (Obr. 30).

Překvapující byl výsledek pozorování růstu druhu *C. glabrata*. Tento druh byl jen mírně inhibován přítomností AMD a NaCl. Opakovaně však byl jeho růst ovlivněn přítomností AMD a 1 M KCl v médiu. µµJe to jediný námi pozorovaný případ, kdy KCl v kombinaci s antimykoticky aktivní látkou způsobil silnější inhibici růstu než NaCl (Obr. 30).



Obr. 30 Nárůst *Candida* v médiu YPD při 30°C v přítomnosti NaCl, KCl a AMD. Data tvoří normované průměrné hodnoty, chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

4.6.3 SOUHRN

U amiodaronu i phenytoinu se nám nepodařilo stanovit koncentraci, při níž by se projevil antimykotický účinek těchto látek. U AMD jsme byli omezeni rozpustností amiodaronu v médiu.

U phenytoinu se nám nepodařilo prokázat, že ve spojení s NaCl, nebo KCl má antimykotickou aktivitu. V testovaných podmínkách rostly všechny druhy *Candida* v přítomnosti phenytoinu s NaCl či KCl bez známek inhibice.

Vliv solí alkalických kovů na rezistenci *Candida* k amiodaronu jsme pozorovali v tekutém médiu. Oba testované kmeny *C. albicans* rostly v těchto podmínkách bez známek inhibice. Nejsilnější bylo ovlivnění rezistence k AMD u *C. dubliniensis* v přítomnosti NaCl 1M. U kmenů *C. parapsilosis* a *C. glabrata* jsme pozorovali v těchto podmínkách jen mírnou inhibici růstu. Nejzajímavějším poznatkem je, že u kmene *C. glabrata* způsobil silnější porušení rezistence k AMD chlorid draselný 1M, než chlorid sodný ve stejné koncentraci. Na ostatní kmeny neměl KCl v kombinaci s AMD výraznější vliv než NaCl.

5 DISKUZE

5.1 VZTAH MEZI HOMEOSTÁZÍ IONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ A REZISTENCÍ *CANDIDA* K FLUKONAZOLU

Naše práce navazuje na dříve publikované výsledky (Kolecka et al. 2009), ze kterých vyplývá, že subinhibiční koncentrace flukonazolu a NaCl společně výrazně inhibují růst FLC-senzitivního i FLC-rezistentního kmene *C. albicans*. My jsme výsledky této práce zopakovali a poté rozšířili o pozorování vlivu subinhibičních koncentrací FLC a NaCl na růst dalších tří patogenních druhů *Candida*. Dále nás zajímalo, zda rezistenci k FLC ovlivňuje i přítomnost subinhibiční koncentrace chloridu draselného či sorbitolu – což by mohlo napovědět, zda potenciaci citlivosti *Candida* k FLC vyvolává spíše toxický účinek sodných iontů, vyšší koncentrace iontů obecně nebo zvýšený osmotický tlak generovaný látkou neiontové povahy.

Z našich pozorování růstu *Candida* na pevných i v tekutých půdách vyplývá, že přítomnost subinhibičních koncentrací FLC a NaCl inhibuje růst všech testovaných druhů *Candida*, a to i druhů k FLC i solím relativně rezistentních (kap. 4. 2. 3.). Subinhibiční koncentrace KCl a FLC měly vliv na růst jen u některých druhů *Candida*, přičemž míra inhibice byla ve srovnání s NaCl výrazně menší. Subinhibiční koncentrace FLC a sorbitolu ovlivňovaly růst jen u druhu *C. dubliniensis* (kap. 4. 2. 3.). Z uvedeného vyplývá, že nejvyšší synergismus je mezi antimykotickým účinkem flukonazolu a toxickými účinky sodných iontů. Vyšší koncentrace netoxických draselných iontů a zvýšený osmotický tlak (s výjimkou druhu *C. dubliniensis*) ovlivňují rezistenci *Candida* k FLC jen velmi slabě nebo vůbec.

1.1.1 *CANDIDA ALBICANS*

Oba kmeny *C. albicans* (FLC-senzitivní SC5314 a FLC-rezistentní 1173), se kterými jsme pracovali byly použity i ve výše zmíněné práci (Kolecka et al. 2009). Ve shodě s autory této práce jsme pozorovali, že pro oba kmeny je přítomnost subinhibiční koncentrace FLC a NaCl 1 mol/l letální. My jsme dále určily koncentrace NaCl, které v kombinaci se subinhibiční koncentrací FLC umožňují oběma kmenům růst (NaCl 0,6 mol/l) a při které rostou kmeny bez výraznějších známek inhibice (0,3 mol/l), (kap. 4. 2. 3.).

Míra inhibice FLC a vyšších testovaných koncentrací NaCl byla u FLC-senzitivního i FLC-rezistentního kmene stejná – rezistence k FLC v prostředí s optimální koncentrací NaCl tedy

nijak nechrání buňky před společným působením FLC a NaCl. Určitý rozdíl v růstu obou kmenů jsme opakovaně pozorovali v prostředí s FLC a nejnižší testovanou koncentrací NaCl, kde FLC-rezistentní kmen 1173 rostl slaběji než FLC-senzitivní kmen SC5314. Příčinou slabšího růstu kmene 1173 v těchto podmínkách může být jeho menší halotolerance, protože, v prostředí se subinhibiční koncentrací FLC a NaCl dochází ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace sodných iontů u obou kmenů *C. albicans* (Kolecka et al. 2009), dochází k porušení iontové homeostáze, což může být jednou z hlavních příčin popsaných inhibičních efektů. Méně halotolerantní kmen 1173 po průniku sodných iontů do buňky zřejmě není schopen tak efektivní detoxifikace jako kmen SC5314.

Přítomnost subinhibičních koncentrací KCl a FLC způsobila inhibici růstu jen u méně halotolerantního kmene 1173 (kap. 4. 2. 3.). Je to další náznak, že při současném působení FLC a solí hraje u *C. albicans* významnější úlohu halotolerance než rezistence k FLC.

1.1.2 *CANDIDA DUBLINIENSIS*

C. dubliniensis je zároveň velmi FLC-rezistentním a nejvíce námi testovaným halosenzitivním druhem z námi testovaných druhů *Candida* (kap. 4. 1. 1., kap. 4. 2. 1.). Subinhibiční koncentrace FLC a NaCl u tohoto druhu způsobily nejsilnější inhibici růstu. Ačkoliv je *C. dubliniensis* FLC-rezistentní, subinhibiční koncentrace FLC (10 µg/ml) v kombinaci se všemi testovanými koncentracemi NaCl měla letální účinek. *C. dubliniensis* nerostla ani v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC pro FLC-senzitivní kmeny (0,5 µg/ml) v kombinaci s 1 M a 0,6 M NaCl. Slabý růst jsme zaznamenali jen v přítomnosti FLC 0,5 µg/ml a NaCl 0,3 M. V těchto podmínkách rostly všechny ostatní druhy bez známek inhibice (kap. 4. 2. 3.).

U *C. dubliniensis* stačí pro inhibici růstu poloviční koncentrace NaCl a 20 × nižší koncentrace FLC, než u podobně FLC-rezistentního kmene *C. albicans* 1173. Tento fakt si vysvětlujeme halosenzitivitou *C. dubliniensis*. Autoři Krauke a Sychrová (2010) označují za důvody halosenzitivity *C. dubliniensis* menší schopnost exportovat sodné ionty z buňky, nebo je sekvestrovat do vakuoly. Při porušení iontové homeostáze vlivem FLC v přítomnosti vyšší koncentrace Na⁺ by mohla být nízká schopnost detoxifikace hlavní příčinou pozorovaných inhibičních efektů. Také odlišná stavba plasmatické membrány *C. dubliniensis* by mohla hrát určitou roli v iontové homeostázi, což může částečně vysvětlovat zároveň vysokou rezistenci tohoto druhu k FLC (menší fyziologické zastoupení ergosterolu) i halosenzitivitu zároveň.

Na rozdíl od ostatních testovaných druhů *Candida* byl růst *C. dubliniensis* výrazně inhibován i v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC, draselných iontů a sorbitolu, ačkoliv ve srovnání s účinky NaCl je tato inhibice daleko slabší (kap. 4. 2. 3.). Tolerance FLC *C. dubliniensis* je tedy silně porušena nejen toxicitou sodných iontů, ale i přítomností vyšší koncentrace netoxických iontů draselných i obecně zvýšeným osmotickým tlakem. Tato skutečnost naznačuje, že podobně jako u *C. albicans* není u *C. dubliniensis* v přítomnosti FLC a sole rozhodující vlastností rezistence k FLC, ale relativní halo- a osmosenzitivita.

1.1.3 *CANDIDA PARAPSILOSIS*

C. parapsilosis je nejvíce halotolerantní a zároveň FLC-senzitivní druh (kap. 4. 1. 1., kap. 4. 2. 1.). I u tohoto druhu jsme pozorovali inhibiční účinky v přítomnosti subinhibiční koncentrace FLC a NaCl. Na rozdíl od *C. dubliniensis* nebo *C. albicans* však tyto účinky nebyly pro *C. parapsilosis* letální. Zcela bez známek inhibice rostl tento druh v prostředí s FLC a KCl nebo sorbitolem. Mechanismy, které jsou zodpovědné za efektivní kompenzaci stresu vyvolaného FLC a solemi u *C. parapsilosis* pravděpodobně souvisejí s halotolerancí tohoto druhu. Vysoká účinnost exportu Na^+ z buňky a efektivní sekvestrace Na^+ do vakuol (Krauke & Sychrová 2010, Krauke & Sychrová 2008) mohou pomáhat kompenzovat porušení iontové homeostáze indukované flukonazolem.

1.1.4 *CANDIDA GLABRATA*

C. glabrata je FLC-rezistentní druh, který je o něco méně halotolerantní než *C. albicans*, ale více halotolerantní než *C. dubliniensis* (kap. 4. 1. 1., kap. 4. 2. 1.). I u tohoto druhu jsme zaznamenali inhibiční působení subinhibičních koncentrací FLC a NaCl. Podobně jako u *C. parapsilosis* však nebyla kombinace FLC s NaCl pro tento druh letální. Na rozdíl od *C. parapsilosis* je pro kmen *C. glabrata* subinhibiční koncentrace FLC 20 × vyšší (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kombinace FLC s KCl nebo sorbitolem neměly na růst tohoto druhu výrazný inhibiční účinek. *C. glabrata* je jediným druhem, který byl schopen růstu ve všech námi testovaných podmínkách.

Mechanismy, které umožňují tomuto druhu růst v přítomnosti FLC i solí alkalických kovů, jsou pro nás zatím neznámé. Důvod odlišného chování *C. glabrata* od ostatních druhů *Candida* se může skrývat ve fylogenetickém řazení tohoto druhu.

5.2 VZTAH MEZI HOMEOSTÁZÍ IONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ A REZISTENCÍ *CANDID* K ITRAKONAZOLU A KLOTRIMAZOLU

Stejně jako flukonazol patří i itrakonazol (ITR) a klotrimazol (KLO) do skupiny azolových anitmykotik. Mají stejný mechanismus účinku, avšak liší se svou antitmykotickou aktivitou, farmakokinetikou i indikací (kap. 2. 3. 1). S itrakonazolem a klotrimazolem jsme provedli téměř totožné experimenty jako s flukonazolem. Chtěli jsme ověřit, že subinhibiční koncentrace ITR a KLO v kombinaci se subinhibičními koncentracemi NaCl, KCl či sorbitolu budou působit na různé druhy *Candida* podobně jako FLC.

Výsledky experimentů, které hodnotily růst *Candida* v přítomnosti subinhibiční koncentrace ITR a KLO v kombinaci se subinhibičními koncentracemi NaCl na pevných i v tekutých půdách, byly téměř totožné s výsledky z experimentů s FLC (kap. 4. 3. 2., kap. 4. 3. 3.). Nejlépe rostla ve všech testovaných podmínkách *C. glabrata*, nejhůře *C. dubliniensis*. Ve shodě s experimenty s FLC dopadly i pokusy zkoumající současné působení ITR nebo KLO s KCl a sorbitolem. Druhem nejvíce citlivým ke kombinaci ITR nebo KLO s KCl či sorbitolem je i v tomto případě *C. dubliniensis*.

Jediným rozdílem mezi účinky FLC, KLO a ITR v kombinaci se solemi či sorbitolem, který jsme pozorovali je míra inhibice. Ve všech experimentech s itrakonazolem jsme zaznamenali silnější inhibiční účinek, než při použití FLC nebo KLO. Tato skutečnost zřejmě souvisí s vyšší antitmykotickou aktivitou itrakonazolu (Terrell 1999). Z výše uvedeného vyplývá, že subinhibiční koncentrace zejména NaCl výrazně ovlivňuje rezistenci *Candida* ke všem námi testovaným azolovým antitmykotikům.

5.3 VZTAH MEZI HOMEOSTÁZÍ IONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ A REZISTENCÍ *CANDID* K CALCOFLUOR WHITE A DODECYLSÍRANU SODNÉMU

Po experimentech s azolovými antimykotiky jsme si položili otázku, zda subinhibiční koncentrace solí či sorbitolu mohou snížit rezistenci *Candid* i k jiným antimykoticky aktivním látkám. Vybrali jsme si proto dvě antimykoticky aktivní látky, které obdobně jako azoly porušují buněčné bariéry, a zkoumali vliv subinhibičních koncentrací těchto látek, NaCl, KCl a sorbitolu na růst *Candid*. První látkou je fluorescenční barvivo calcofluor white (CFW), které blokuje polymeraci chitinu a poškozuje tím buněčnou stěnu buňky. Druhou látkou je dodecylsírán sodný, který díky své amfifilní povaze narušuje integritu plasmatické membrány a iniciuje denaturaci membránových proteinů (kap. 2. 3. 3.).

Zkoumali jsme vliv subinhibičních koncentrací CFW a SDS v kombinaci se subinhibičními kombinacemi NaCl, KCl a sorbitolu na růst *Candid* na pevných i v tekutých půdách - obdobně jako v experimentech s azoly (kap. 4. 4. 2., kap. 4. 4. 3.). Přítomnost subinhibiční koncentrace CFW nebo SDS a subinhibiční koncentrace NaCl vyvolala inhibici růstu u všech druhů *Candid*. Nejsilněji byl v přítomnosti CFW nebo SDS a NaCl inhibován druh *C. dubliniensis*, naopak relativně nejlépe rostl v těchto podmínkách druh *C. glabrata*. Projevil se i rozdíl mezi halotolerantnějším kmenem *C. a.* SC5314, který rostl v přítomnosti CFW lépe než méně halotolerantní kmen *C. a.* 1173. Vliv subinhibičních koncentrací NaCl na rezistenci *Candid* k CFW a SDS se velmi podobá účinkům NaCl na rezistenci vůči azolům – jen mezidruhové rozdíly nejsou v míře inhibice tak dramatické. Mnohem slabší inhibici růstu *Candid* vyvolala přítomnost CFW či SDS v kombinaci s KCl a sorbitolem. Potvrzuje se, že obdobně jako u azolů je synergismus účinku CFW nebo SDS podpořen toxicitou sodných iontů. *C. dubliniensis* byla jediným druhem, u kterého se projevila výrazně vyšší citlivost k CFW a SDS vlivem vyšší koncentrace netoxických draselných iontů nebo vlivem zvýšeného osmotického tlaku. I toto pozorování je ve shodě s výsledky z pokusů s azoly.

Z uvedených pozorování vyplývá, že porušení homeostáze alkalických iontů mohou vyvolat subinhibiční koncentrace látek s různým mechanismem antimykotického účinku. Podobné účinky jako azoly vyvolal dodecylsírán sodný i calcofluoro white. Všechny tyto látky shodně napadají buněčné bariéry buňky. Stejně byly i mezidruhové rozdíly ve schopnosti kompenzovat stres vyvolaný současně antimykoticky aktivní látkou a solí či sorbitolem. Zdá se, že schopnost různých druhů *Candid* udržet iontovou homeostázi v přítomnosti antimykotické látky a vyšší

koncentrace iontů nezávisí na mechanismu účinku antimykotika, ale spíše na schopnosti *Candid* vyrovnat se s iontovou dysbalancí.

5.4 REZISTENCE *CANDID* K ANTIMYKOTICKY AKTIVNÍM LÁTKÁM V PROSTŘEDÍ S MINIMÁLNÍ KONCENTRACÍ DRASELNÝCH IONTŮ

V předchozích částech práce jsme se zabývali rezistencí *Candid* k různým antimykoticky aktivním látkám v prostředí s vyšší koncentrací iontů alkalických kovů. V další části jsme se zaměřili na vliv antimykoticky aktivních látek na růst *Candid* v prostředí s limitně nízkou koncentrací draselných kationtů, které také ovlivňuje iontovou homeostázi. Pro každou buňku je esenciální udržovat relativně vysokou vnitrobuněčnou koncentraci draselných iontů - v prostředí s nízkým obsahem draselných iontů musí buňky draselné ionty účinně vychytávat z okolí a koncentrovat uvnitř buňky. Zajímalo nás, jak a jestli vůbec, subinhibiční koncentrace antimykotik s různým mechanismem účinku ovlivní tuto schopnost u různých druhů *Candid*. Pro tyto experimenty jsme vybrali flukonazol (FLC) jako zástupce azolových antimykotik, calcofluor white (CFW) a dodecylsírán sodný (SDS).

Pro sledování růstu *Candid* v prostředí s minimální koncentrací draslíku, jsme museli použít na rozdíl od předchozích pokusů médium YNB-K⁺ chudé na živiny s limitně nízkým obsahem draselných iontů. V tekutém médiu YNB-K⁺ bez přídavku KCl *Candidy* nebyly schopné růstu. Naproti tomu na pevném médiu YNB-K⁺ bez přidaného KCl rostly všechny druhy *Candid* (kap. 4. 5. 1.). Tento rozdíl je pravděpodobně způsobený agarem v pevném médiu, který patrně obsahuje draselné ionty. Všechny druhy *Candid* rostou v přítomnosti velmi nízkých koncentrací draselných iontů (desítky μM) lépe než *Saccharomyces cerevisiae* (nepublikováno), což naznačuje, že disponují velmi účinnými systémy pro transport K⁺ do buňky. Avšak jeden z námi testovaných druhů *Candid* – *C. glabrata* rostl v prostředí s nízkou koncentrací KCl pomaleji než ostatní (kap. 4. 5. 2.). Právě *C. glabrata* je fylogeneticky nejvíce příbuzná *S. cerevisiae* (Fitzpatrick 2006) a méně efektivní transport draselných iontů z prostředí by mohl být jejich společným znakem. Na pevném i v tekutém médiu YNB-K⁺ s přídavkem KCl o výsledné koncentraci 1 mmol/l rostly všechny testované druhy *Candid* bez známek hladovění na draselné ionty, a tuto koncentraci KCl jsme považovali vhodné kontrolní podmínky pro další pokusy.

Abychom zjistili, jak subinhibiční koncentrace antimykoticky aktivních látek – FLC, CFW a SDS ovlivňují růst *Candid* v prostředí s nedostatkem draselných iontů, hodnotili jsme růst *Candid* na

pevné i v tekutém médiu YNB-K⁺ s přidaným 50 μM a 1 mM KCl (kontrolní koncentrace). Použitá koncentrace FLC v této části práce byla subinhibiční pouze pro FLC-rezistentní *Candidy* (*C. a. 1173*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*). Nejvýznamnější vliv měl FLC při nízké koncentraci K⁺ na růst *C. dubliniensis*. Míra inhibice však byla stejná v prostředí s nízkou i kontrolní koncentrací KCl. Citlivost tohoto druhu k FLC je tedy spíše ovlivněna samotným médiem chudým na živiny, než nízkou koncentrací K⁺. Nízká koncentrace K⁺ v růstovém médiu neovlivnila rezistenci k FLC u ostatních testovaných druhů (kap. 4. 5. 2.).

Druhou antimykoticky aktivní látkou byl CFW. V prostředí s 1 mM KCl a 30 μg/ml CFW rostly všechny druhy bez známek inhibice, čili použitá koncentrace CFW byla v těchto podmínkách subinhibiční pro všechny testované druhy *Candid*. V prostředí se subinhibiční koncentrací CFW a nízkou koncentrací KCl byla inhibována jen *C. glabrata* (kap. 4. 5. 2.). To potvrzuje domněnku, že *C. glabrata* má ze všech testovaných druhů nejméně účinný systém pro transport draselných iontů do buňky, který není schopen kompenzovat stres vyvolaný CFW.

Poslední testovanou látkou zařazená byl dodecylsírán sodný (SDS). Koncentrace SDS, která byla subinhibiční pro všechny druhy *Candid* v prostředí média bohatého na živiny (kap. 4. 5. 2.), inhibovala v prostředí média YNB-K⁺ všechny druhy *Candid* bez ohledu na koncentraci přidaného KCl. Je tedy zřejmé, že míra tolerance SDS všemi testovanými druhy závisí na růstovém médiu - tedy na dostupnosti živin a metabolickém stavu buněk.

5.5 VZTAH MEZI HOMEOSTÁZÍ IONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ A REZISTENCÍ *CANDID* K AMIODARONU

Amiodaron (AMD) se od předchozích antimykoticky aktivních látek liší mechanismem účinku. Azolová antimykotika, CFW i SDS poškozují buněčné bariéry (kap. 2. 3. 1., kap. 2. 3. 3.), naproti tomu amiodaron ovlivňuje membránový potenciál a narušuje homeostázi vápenatých a draselných kationtů (Marešová et al. 2008). Zajímalo nás, jestli subinhibiční koncentrace solí alkalických kovů ovlivní růst *Candida* v prostředí se subinhibiční koncentrací AMD. Rozdíly v experimentech s amiodaronem a ostatními antimykotiky jsou dva: hodnotili jsme růst *Candida* pouze v tekutém médiu a nepodařilo se nám kvůli špatné rozpustnosti AMD dosáhnout koncentrace, která by na *Candida* působila inhibičně. Použitá koncentrace AMD je však již inhibiční pro *S. cerevisiae* (Marešová et al. 2008). Nejvyšší koncentrace AMD při které nedocházelo ke srážení AMD v médiu byla 80 µg/ml. V přítomnosti AMD v této koncentraci rostly všechny druhy *Candida* bez známek inhibice, a proto jsme tuto koncentraci považovali za subinhibiční. V dostupné literatuře se nám nepodařilo najít příklad použití AMD v pevné půdě a proto jsme i my pokusy na pevných půdách s AMD vyloučili. Hodnotili jsme růst *Candida* v prostředí se subinhibiční koncentrací NaCl, KCl a AMD.

Přítomnost subinhibiční koncentrace AMD a NaCl měla nejsilnější vliv na růst *C. dubliniensis*, která v těchto podmínkách nerostla vůbec. Účinek AMD byl silně potencován toxicitou sodných iontů. Tento efekt potvrzuje domněnku, že *C. dubliniensis* je velmi citlivá ke všem podnětům, které vedou k porušení iontové homeostáze.

Inhibiční vliv subinhibiční koncentrace AMD a KCl se v překvapivé míře projevil u druhu *C. glabrata*. Opakovaně jsme porovnali vliv 1 M NaCl a 1 M KCl na citlivost tohoto druhu k AMD. Inhibice způsobená přítomností 1 M KCl byla vždy výrazně větší, než inhibice způsobená 1 M NaCl. Je to jediný případ v naší práci, kdy netoxické draselné ionty způsobují ve spojení s antimykoticky aktivní látkou silnější inhibici, než toxické ionty sodné. Tato skutečnost naznačuje, že transportní systémy druhu *C. glabrata* se výrazně odlišují od systémů ostatních druhů *Candida* a budou při dalším studiu v budoucnu středem našeho zájmu.

6 ZÁVĚRY

Ze souborů získaných výsledků je možné vyvodit řadu nových a původních poznatků:

- Kombinace subinhibičních koncentrací flukonazolu a NaCl silně inhibují růst všech druhů testovaných *Candid*.
- Míra inhibice je u jednotlivých druhů *Candid* velmi rozdílná. Nejméně se projevuje u druhu *C. glabrata*, nejsilněji u druhu *C. dubliniensis*.
- Všechny inhibiční efekty vyvolané kombinací subinhibičních koncentrací flukonazolu a solí byly pozorovány i s použitím azolových antimykotik itrakonazolu a klotrimazolu.
- Silnou inhibici růstu *Candid* způsobily v kombinaci se subinhibičními koncentracemi solí i subinhibiční koncentrace dalších antimykoticky aktivních látek - calcofluor white a dodecylsírany sodného.
- Míra inhibice jednotlivých druhů *Candid* byla velmi podobná v přítomnosti azolových antimykotik, calcofluor white i dodecylsírany sodného. Všechny tyto látky poškozují buněčné bariéry.
- Antimykotický účinek azolů, calcofluor white i dodecylsírany sodného byl nejsilněji potencován v přítomnosti toxických sodných iontů. Vyšší koncentrace draselných iontů či neiontového solutu měly zásadní vliv na rezistenci k výše jmenovaným látkám jen u druhu *C. dubliniensis*.
- Subinhibiční koncentrace NaCl a KCl ovlivnily rezistenci dvou druhů *Candid* k amiodaronu - antiarytmiku s prokázanou antimykotickou aktivitou. Růst druhu *C. dubliniensis* byl silně inhibován kombinací NaCl a amiodaronu, zatímco růst druhu *C. glabrata* byl v kombinaci s amiodaronem silněji inhibován kombinací amiodaronu a KCl.

Jak je patrné z výše uvedených jednotlivých bodů, všechny tři hlavní cíle diplomové práce byly splněny. Závěrem je možno konstatovat, že kombinace subinhibičních koncentrací solí kationtů alkalických kovů a řady antimykoticky aktivních látek má výrazně negativní vliv na růst čtyř druhů patogenních kvasinek rodu *Candida*. Zda se jedná o porušení homeostázy vnitrobuněčné koncentrace draselných a sodných kationtů na úrovni transportu kationtů do buňky, či naopak na úrovni jejich exportu a sekvestrace, bude předmětem dalšího studia.

7 SEZNAM ZKRATEK

AMD	amiodaron
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosin trifosfát
CBS	Sbírka mikroorganismů Akademie věd a umění Nizozemského království
CFW	calcofluor white
cps	tobolka
C_{si}	subinhibiční koncentrace
DMSO	dimethylsulfoxid
drm	dermální
dur	tvrdá
FLC	flukonazol
i. V.	intravenosní
inf	infuse
ITR	itrakonazol
KLO	klotrimazol
OD ₅₉₅	optická hustota měřená při 595 nm
OD ₆₀₀	optická hustota měřená při 600 nm
PH	phenytoin
por	perorální
SDS	dodecyl síran sodný
sol	roztok

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arino J., Ramos J., Sychrová H. (2010)** Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 95-120
- Ashford B. (1928)** Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg* 8, 507-538
- Banuelos M. A., Sychrova H., Bleykasten-Grosshans C., Souciet J. L., Potier S. (1998)** The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144, 2749-2758
- Barnett J. A. (2008)** A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeasts* 25, 385-417
- Blankenship J. R., Mitchell A. P. (2006)** How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9, 588-594
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. (2005)** Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* 244, 229-234
- Butler G., Rasmussen M. D., Lin M. F. et al. (2009)** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-662
- Casalinuovo I. A., Di Francesco P., Garaci E. (2004)** Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 8, 69-77
- Courchesne W. E. (2002)** Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amioarone. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 195-199
- Csank C., Haynes K. (2000)** *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol*

Lett 189, 115-120

De Rosa F. G., Garazzino S., Pasero D., Di Perri G., Ranieri V. M. (2009) Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anestesiol* 75, 453-458

Doležal M., Buchta V. (2006) Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství* 1, 10-14

Dujon B., Sherman D., Fischer G. et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44

Esiobu N., Hoosein N. (2003) An assessment of the in vitro antimicrobial effects of two antiepileptic drugs - sodium valproate and phenytoin. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 63-68

Espinel-Ingroff A. (2008) Mechanism of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25, 101-106

Fidel P. L., Vazquez J. A., Sobel J. D. (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12, 80-96

Fitzpatrick D., Logue M., Stajich J., Butler G. (2006) A fungal phylogenybased on 42 complete genomes derived supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6:99

Gupta S. S., Van-Khue T., Beaudry V., Rulli S., Vunningham K., Rao R. (2003) Antifungal activity of Amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 278, 28831-28839

Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P. (2006) *Farmaceutická chemie IV.*, 1. vyd., Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 166 stran

Hohmann S., Krantz M., Nordlander B., Hussinger D., Sies H. (2007) Yeast osmoregulation. *Methods in Enzymol* 428, 29-45

Chen S. C., Sorell T. C. (2007) Antifungal agents. *Med J Aust* 187, 404-409

Jackson A.P., Gamble J. A. Yeomans T. et al. (2009) Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res* 19, 2231-2244

Jones T., Federspiel N. A., Chibana H. et al. (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329-7334

Karkowska-Kuleta J., Rapala-Kozik M., Kozik A. (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochim Pol* 56, 211-224

Kaur R. Domergue R., Zupanic M. L., Cormack B. P. (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 9, 378-384

Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Manning N. J. et al. (1997) Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Lett* 400, 80-82

Kinclová O., Potier S., Sychrová H. (2001) The *Candida albicans* Na^+/H^+ antiporter exports potassium and rubidium. *FEBS Lett* 504, 11-15

Kinclová O., Potier S., Sychrová H. (2002) Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/ H^+ antiporters into two subfamilies. *Microbiology* 148, 1225-1232

Kinclova-Zimmermannová O., Sychrová H., (2007) Plasma-membrane Cnh1 Na^+/H^+ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*, *Microbiology* 153, 2603-2612

Kolecka A., Krauke Y., Bujdánková H., Sychrová H. (2009) Subinhibitory concentrations of fluconazole increase the intracellular sodium content in both fluconazole-resistant and -sensitive *Candida albicans* strains. *Can J Microbiol* 55, 605-610

Komárek P., Rabišková M. et al. (2006) *Technologie léků*, 3. vyd., Galén, Praha, 399 stran

Konířová J. (2008) Mechanismus působení Calcofluor White na životeschopnost kvasinkové buňky. Bakalářská práce. Katedra buněčné biologie, Přírodovědecké fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 27 stran

Krauke Y., Sychrová H. (2008) Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species. BMC microbiology 8:80

Krauke Y., Sychrová H. (2010) Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. Curr Microbiol 2010 Mar 19

Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P. K. Ghannoum M. A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 70, 878-888

Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A. (2007) *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res 86, 204-215

Lincová D., Farghali H. et al. (2007) Základní a aplikovaná farmakologie, 2. vyd., Galén, Praha, 672 stran

Maertens J., Boogaerts M. (2005) The place for itraconazole in treatment. J Antimicrob Chemother 56, 33-38

Marešová L., Muend S., Yong-Qiang Zhang, Sychrová H., Rao R. (2008) Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. J Biol Chem 284, 2795-2802

Marešová L., Urbánková E., Gášková E., Sychrová H. (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. FEMS Yeast Res 6, 1039-1046

Melkusová S., Bujdánková H., Vollekova A. et al. (2004) The efficiency of the benzothiazole APB, the echinocandin micafungin, and amphotericin B in fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Pharmazie* 59, 573-574

Moran G. P., Sanglard D., Donnelly S. M. et al. (1998) Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agent Chemother* 42, 1819–1830

Odds F. C., Brown A. J., Gow N. A. (2003) Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Microbiol* 11, 272-279

Pinjon E., Moran G. P., Jackson C. J., Kelly S. L. et al. (2003) Molecular mechanisms of Itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agent Chemother* 47, 2424–2437

Piret J., Lamontagne J., Bestman-Smith J. et al. (2000) In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against Herpes Simplex and human immunodeficiency viruses. *J Clin Microbiol* 38, 110-119

Roncero C. and Duran A. (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* 163, 1180-1185.

Rosen R., Hoffman B. F. (1973) Mechanisms of action of antiarrhythmic drugs. *Circulation Research* vol. 32

Rozsypal H. (2008) Systémová antimykotika. *Klin Farmakol Farm* 22, 40–44

Ruhnke M. (2006) Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7, 495-504

Sanglard D., Ischer F., Monod M., Bille J. (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agent Chemother* 40, 2300-2305

Sheehan D. J., Hitchcock C. A., Sibley C. M. (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 40-79

Soll D. R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 5,183-20

Stokes C., Moran G. P., Spiering M., Cole G. T. et al. (2007) Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 44, 920-931

Sullivan D. J., Moran G. P., Al-Mosaied E., Stokes C., Vaughan C., Coleman D. C. (2004) Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 4, 369-376

Sullivan D. J., Moran G. P., Coleman D. C. (2005) *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett* 253, 9-17

Sullivan D. J., Westerneng T. J., Haynes K. A., Bennett D. E., Coleman D. C. (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141, 1507-1521

Sychrová H. (2004) Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* 53, 91-98

Trofa D., Gascer A., Nosanchuk J. D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 606-625

Wilson R. B., Davis D., Mitchell A. P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181, 1868-1874