Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Vliv tyrosolu na minimální inhibiční koncentrace vybraných antimykotik

(Diplomová práce)

Autor: Marcela Vaisová

Školitel: Ing. Lucie Křivčíková

Hradec Králové 2014

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Dále prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne

Marcela Vaisová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala školitelce Ing. Lucii Křivčíkové za odborné vedení, rady a připomínky při tvorbě této práce a Bc. Kristýně Hoblové za jazykovou korekturu.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Marcela Vaisová

Školitel: Ing. Lucie Křivčíková

Název diplomové práce: ***Vliv tyrosolu na minimální inhibiční koncentrace vybraných antimykotik***

V minulých studiích věnovaných quorum sensingu byly u *Candida albicans* objeveny dvě quorum sensing molekuly, farnesol a tyrosol. Tyrol byl již dříve potvrzen jako látka, která zkracuje lag fázi buněčného cyklu *Candida albicans* a podporuje její konverzi do vláknité formy, farnesol naopak podporuje biochemicky aktivní formu blastospory. Tato práce se věnuje účinku tyrosolu na *Candida albicans* v kombinaci s vybranými antimykotiky, fungistatickým flukonazolem a fungicidním amfotericinem B.

Kmeny *Candida albicans* použité v experimentu byly získány většinou při odběrech biologického materiálu u pacientů s různě lokalizovanou infekcí *Candida albicans*. Dále byly využity čtyři standardní sbírkové kmeny.

Pro experiment byla použita metoda mikrodilučního bujónového testu, sledující vzájemný účinek různých koncentrací zvoleného antimykotika a tyrosolu.

U amfotericinu B byla u dvaceti osmi vzorků minimální inhibiční koncentrace (MIC) při použití tyrosolu stejná jako MIC kontrolního vzorku, u šesti vzorků byla MIC oproti kontrolní hodnotě mírně zvýšená, u tří mírně snížená.

U flukonazolu bylo dvacet čtyři testovaných kmenů beze změny, u osmi kmenů se MIC zvýšila, u sedmi se snížila. Jeden kmen reagoval na nejvyšší koncentraci tyrosolu zvýšením MIC, na nižší koncentrace jejím snížením.

Výsledky nepotvrdily výrazný vliv tyrosolu na minimální inhibiční koncentraci některého z antimykotik.

Klíčová slova: tyrosol, *Candida albicans,* minimální inhibiční koncentrace, antimykotika

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences
Author: Marcela Vaisová
Supervisor: Lucie Křivčíková
Title of diploma thesis: **Effect of tyrosol on minimal inhibitory concentration of antimycotics**

Previous studies concerning quorum sensing in *Candida albicans* discovered two quorum sensing molecules, farnesol and tyrosol. Tyrosol has been formerly confirmed as a substance which shortens the lag phase of *Candida albicans* cell cycle and stimulates its conversion to the hyphal form, farnesol stimulates blastospores. This work covers the effect of tyrosol combined with two antimycotics, fungistatic fluconazole and fungicidal amphotericine B.

Candida albicans strains used in the experiment were mostly isolated from samples taken from patients suffering from variously located *Candida albicans* infections and four laboratory standard strains were also used.

The method used for the experiment was a modified broth dilution method using combinations of both tyrosol and antimycotics various concentrations, which were prepared by two-fold dilution.

Using amphotericine B, 28 strains did not show any difference in MIC compared with the control sample, 6 strains showed mildly higher MIC and 3 strains shower mildly lower MIC.

Using fluconazole, 24 strains showed no change in MIC. 8 strains showed mildly higher MIC, seven strains showed mildly lower MIC and one strain reacted with lower MIC in the presence of lower concentrations of tyrosol, but with higher MIC to higher concentrations of tyrosol.

The results showed no significant effect of tyrosol on MIC of any of the tested antimycotics.

Key words: tyrosol, *Candida albicans*, minimal inhibitory concentration, antimycotics

Seznam použitých zkratek

AIDS acquired immunodeficiency syndrome, syndrom získané imunodeficience

ALS proteiny s agglutinin-like sekvencí

AMB amfotericin B

BAL bronchoalveolární laváž

CNS centrální nervový systém

CFU colony forming unit – jednotka tvořící kolonii

FLZ flukonazol

GIT gastrointestinální trakt

HIV human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

MIC minimální inhibiční koncentrace

RPMI syntetické kultivační médium

SAP sekreční aspartyl proteinasa

T tyrosol

TAS tracheální aspirát

1 Obsah

Seznam použitých zkratek 6

1 Obsah 7

2 Úvod – zadání práce 11

3 Teoretická část 12

3.1 Buněčná komunikace 12

3.1.1 Quorum sensing 12

3.1.2 Tyrosol 13

3.1.3 Farnesol 14

3.2 Úvod do mykologie 15

3.3 Candida albicans 15

3.3.1 Morfologie Candida albicans 15

3.3.2 Diagnostika 16

3.3.3 Patogeneze 17

3.3.4 Kandidové infekce a jejich terapie 18

3.4 Antimykotika 20

3.4.1 Přehled 20

3.4.2 Amfotericin B 21

3.4.3 Flukonazol 23

3.5 Metodiky 25

3.5.1 Růstová křivka mikroorganismu 25
3.5.2 Růstová média 26
3.5.3 Testování antibiotické účinnosti 27
4 Praktická část 29
4.1 Chemikálie 29
4.2 Přístrojové a materiálové vybavení 29
4.3 Testované kmeny *Candida albicans* 29
4.3.1 Testované kmeny 29
4.3.2 Příprava suspenze buněk Candida albicans 30
4.4 Média 30
4.4.1 Sabouraudův agar 30
4.4.2 RPMI 30
4.4.3 MOPS 31
4.4.4 Tyrosol 31
4.4.5 Antimykotika 31
4.5 Metoda testování 32
4.5.1 Provedení exprimentu 32
4.5.2 Hodnocení testu 33
5 Výsledky 34
5.1 Amfotericin B 34
5.1.1 Sbírkové kmeny 34
5.1.2 Klinické izoláty – pochva 35
5.1.3 Klinické izoláty – bronchoalveolární laváž 36
5.1.4 Klinické izoláty – tracheální aspirát 37
5.1.5 Klinické izoláty – hrtan 38

5.1.6 Klinické izoláty – nosohltan 39
5.1.7 Klinické izoláty – sputum 41
5.1.8 Klinické izoláty – ústní dutina 42
5.1.9 Klinické izoláty – plíce 43
5.1.10 Klinické izoláty – rektum 43
5.1.11 Klinické izoláty – moč 44
5.1.12 Klinické izoláty – nekrotická kost 45
5.1.13 Klinické izoláty – centrální žilní katetr 46
5.1.14 Shrnutí pro všechny kmeny 46
5.2 Flukonazol 48
5.2.1 Sbírkové kmeny 48
5.2.2 Klinické izoláty – pochva 49
5.2.3 Klinické izoláty – bronchoalveolární laváž 50
5.2.4 Klinické izoláty – tracheální aspirát 51
5.2.5 Klinické izoláty – hrtan 52
5.2.6 Klinické izoláty – nosohltan 53
5.2.7 Klinické izoláty – sputum 55
5.2.8 Klinické izoláty – ústa 56
5.2.9 Klinické izoláty – plíce 57
5.2.10 Klinické izoláty – rektum 57
5.2.11 Klinické izoláty – moč 58
5.2.12 Klinické izoláty – nekrotická kost 59
5.2.13 Klinické izoláty – centrální žilní katetr 59
5.2.14 Shrnutí pro všechny kmeny 59
5.3 Shrnutí pro obě antimykotika 60

6 Diskuze 61

7 Závěr 63

8 Seznam použité literatury 64

9 Seznam obrázků a grafů 69

10 Přílohy 72

2 Úvod – zadání práce

V minulých letech byly ve studiích zkoumajících quorum sensing molekuly a jejich role v růstu a chování buněk u kvasinky *Candida albicans* identifikovány dvě signální molekuly – farnesol a tyrosol. Farnesol zpomaluje nárůst kolonií a přechod buněk do invazivního stádia (Hornby et al., 2001). Tyrosol podle dosavadních výzkumů zkracuje dobu potřebnou k započetí buněčného dělení a podporuje přechod do vláknité, invazivní formy kvasinek (Chen et al., 2004).

Dosavadní výzkum, zejména studie H. Chen et al., 2004, se zaměřoval na účinky tyrosolu v buňce neovlivněné dalšími látkami. Studie sledovala růstovou křivku buněk po jejich přenosu do čerstvého média a zředění kolonie. Pozorovaná lag fáze neboli interval mezi přenesením do čerstvého média a začátkem dělení buněk se znatelně zkracovala, pokud byl k médiu přidán tyrosol. Lag fáze byla vysvětlena jako doba potřebná k syntéze tyrosolu až do koncentrace, která na buňky působí jako signál k dělení. Tyrosol také podporoval přechod kvasinek do vláknité formy, pozorovatelný jako nárůst klíčních hyf u jednotlivých buněk.

Studie Alem et al., 2006, zjistila, že produkce tyrosolu je výrazně vyšší u buněk biofilmu než u buněk v suspenzi, a uvedla větší nárůst biomasy u buněk v biofilmu.

Cílem této práce bylo prozkoumat účinek tyrosolu na růst buněk, na něž zároveň působí antimykotická látka, která jejich růst zastavuje. Pro práci byl jako antimykotikum vybrán fungistaticky působící flukonazol a fungicidně působící amfotericin B. Byla použita mikrodiluční bujónová (broth) metoda, při které jsou na mikrotitrační destičku pipetovány malé objemy suspenze buněk v živném médiu a roztoky obou testovaných látek, antimykotika i tyrosolu. Roztoky testovaných látek jsou připraveny a pipetovány v koncentračních řadách tak, aby se v jednotlivých jamkách docílilo různých kombinací koncentrací obou látek.

3 Teoretická část

3.1 Buněčná komunikace

3.1.1 Quorum sensing

Quorum sensing je způsob komunikace mikroorganismů. Mikroorganismy jednak vylučují určité chemické látky, jednak jsou schopny vnímat koncentrace těchto látek a tím určit počet buněk ve svém okolí. Dosažení prahové koncentrace signální látky stimuluje celou kolonii k určité reakci, např. syntéze antibiotika, tvorbě biofilmu nebo, v případě dimorfních kvasinek, přechod z kvasinkové do vláknité formy (Madhani a Heitman, 2011).

Mechanismy účinku quorum sensing molekul v terapii jsou v podstatě dva. V prvním případě jde o inhibici růstu mikroorganismů, kdy uměle zvýšená hladina patřičné signální látky zastaví růst mikrobů – tento přístup využívá přirozené obrany mikroorganismu proti přemnožení. Druhou možností je využití quorum sensing molekul u mikrobů, u nichž tato signální molekula reguluje expresi genů, které způsobují poškození hostitele.

Každý druh mikroorganismů používá jinou signální molekulu, některé druhy i více. Z toho důvodu také jeden druh nemusí reagovat na signální molekuly produkované jiným druhem. Může ale nastat i situace, kdy quorum sensing molekula produkovaná jedním mikroorganismem působí i na jiný druh – například farnesol produkovaný *Candida albicans* inhibuje růst *Aspergillus nidulans* (Semighini et al., 2006).

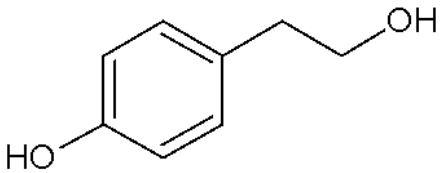
U bakterií i kvasinek byl pozorován vliv quorum sensing molekul při přenosu a zředění kolonie do čerstvého nového média. Po zředění byla pozorována značná prodleva, než začal exponenciální nárůst počtu buněk, a tato prodleva mohla být ovlivněna přidáním látek izolovaných z nezředěných kolonií. Byly identifikovány látky, které interval do začátku růstu zkracovaly, i látky, které ho prodlužovaly.

U *Candida albicans* je látkou, která interval prodlužuje, farnesol (Hornby et al., 2001), a látkou urychlující nástup růstu tyrosol (T). Efekt tyrosolu se omezuje právě na zkrácení času do započetí růstu, nemá už vliv na samotný růst buněk (Chen et al., 2004). Prodleva před nárůstem zředěné kultury je způsobena nutností nasyntetizovat

tyrosol až do dosáhnutí koncentrace potřebné pro podporu růstu. Bylo prokázáno, že ve zředěném médiu tyrosol růst vláknité formy podporuje, ale sám neindukuje. Podle analýzy se tyrosol uplatňuje v regulaci genů kódujících proteiny pro syntézu DNA a regulaci buněčného cyklu.

Candida albicans při vysoké hustotě buněk v okolí roste v kvasinkové formě, při zředění se rozrůstá do formy vláknité. Právě farnesol a kyselina farnesolová byly identifikovány jako quorum sensing molekuly, které brání vzniku vláknité formy v koloniích s vysokou buněčnou hustotou (Chen et al., 2004).

3.1.2 Tyrosol



Obr. 1: Vzorec tyrosolu

Sumární vzorec: $C_8H_{10}O_2$

CAS: 501-94-0

Molekulová hmotnost 138,166 g/mol.

Systematicky 2-(4-hydroxyfenyl)ethanol.

Je to bílý prášek s bodem tání 91 °C, dráždí plíce, oči, kůži (web 2, 2014). Přirozeně se vyskytuje v olivovém oleji, víně (Covas et al., 2003) a rozchodnici růžové (*Rhodiola rosea*) (Chiang et al., 2014).

Při podání per os se lépe vstřebává z olejového než z vodného roztoku, rychle se vylučuje močí. V organismu fungují některé fenolické látky včetně tyrosolu jako scavengery volných radikálů. Tyrosol chrání některé typy nervových buněk před poškozením beta-amyloidem a následným rozvojem Alzheimerovy choroby (St-Laurent-Thibault et al., 2011). Studie Samuel et al., 2008, dokládá kardioprotektivní účinky tyrosolu spojené s konzumací bílého vína.

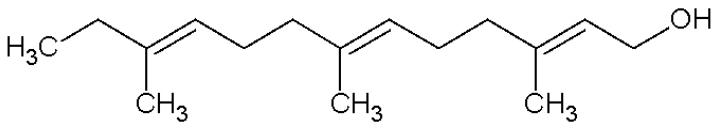
Bylo prokázáno, že tyrosol je quorum-sensing molekula *Candida albicans* a že jeho určitá koncentrace zkracuje lag fázi, ve které se kvasinky nedělí, podporuje tvorbu klíčních hyf a urychluje přechod *Candida albicans* z kvasinkového stádia do hyfálního (Chen et al., 2004). Také chrání kvasinky před fagocytujícími buňkami imunitního systému (Cremer et al., 1999).

Mezi produkty genů regulovaných tyrosolem patří DNA polymerasy, replikační faktory, regulátory buněčného cyklu, reduktady ribonukleotidů nebo DNA-reparační enzymy (Chen et al., 2004). Regulace genů probíhá ovlivněním kinasy Cek1 patřící do kaskády kinas MAPK (Biswas et al., 2007).

Buňky tvořící biofilm produkují větší množství tyrosolu než buňky v suspenzi (Alem et al., 2006).

V buňce je tyrosol syntetizován z tyrosinu, meziprodukty této metabolické dráhy jsou p-hydroxyfenylpyruvát a p-hydroxyfenylacetaldehyd (web 1, 2014).

3.1.3 Farnesol



Obr. 2: Vzorec farnesolu

Sumární vzorec: $C_{15}H_{26}O$

CAS: 4602-84-0, trans, trans isomer 106-28-5

Molekulová hmotnost: 222,37

Systematicky 3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodekatrien-1-ol.

Farnesol je bezbarvá stabilní kapalina. Dráždí dýchací cesty, oči a kůži (web 3). Byl identifikován jako první quorum sensing molekula u *Candida albicans* a u eukaryotního organismu vůbec. U *Candida albicans* brání přechodu kvasinky do infekčního, vláknitého stavu a následně tvorbě biofilmu (Ramage et al., 2002)

Vzhledem ke třem dvojným vazbám v molekule se farnesol může vyskytovat v několika izomerech. Údaje o jejich aktivitě jako quorum sensing molekuly u *Candida*

albicans se liší – studie Schlepin et al., 2003, udává jako biologicky aktivní izomer E,E-farnesol, zatímco studie Hornby et al, 2001 uvádí srovnatelnou aktivitu E,E-farnesolu i směsi izomerů.

V buňce je syntetizován z farnesylpyrofosfátu, meziproduktu v syntéze sterolů. Antimykotika, jejichž mechanismus působení spočívá v zablokování syntézy sterolů, tak mohou zvýšit hladinu farnesolu tím, že zvýší koncentraci jeho prekurzoru. Efekt, který má vysoká koncentrace farnesolu na kvasinky, pravděpodobně přispívá k antimykotickému účinku zmíněných léčiv (Hornby et al., 2003).

3.2 Úvod do mykologie

Houby jsou organismy, jejichž metabolismus získává energii z organických sloučenin. Jsou to eukaryotické buňky. Je pro ně typická produkce různorodých látek, z nichž ne u všech je dosud známa jejich funkce nebo účel, za kterým je houby syntetizují. Některé z těchto látek mohou fungovat jako quorum sensing látky v chemické mezibuněčné komunikaci (Jílek et al., 2002). První houba a vůbec první eukaryotní organismus, u kterého byla objevena komunikace pomocí quorum sensing, byla kvasinka *Candida albicans*.

Kvasinky, na rozdíl od vláknitých hub, mají zpravidla jednobuněčnou stélku, tzv. blastosporu. Množí se pučením blastospor. Za určitých podmínek se dceřiné buňky neoddělí úplně od buňky mateřské, čímž vzniká pseudomycelium čili řetízek prodloužených, vzájemně od sebe stále oddělených buněk. Někdy dochází až ke vzniku hyf, vláken, ze kterých je složeno pravé mycelium (Greenwood et al., 1999).

3.3 Candida albicans

3.3.1 Morfologie Candida albicans

Candida albicans je heterotrofní, aerobní, málo náročná kvasinka. V organismu se běžně nachází ve formě kulovitých blastospor čili v kvasinkové fázi, během parazitární konverze je růstovou formou pseudomycelium nebo vláknité mycelium. Tato schopnost existovat ve dvou růstových formách ji řadí mezi dimorfní kvasinky.

Má schopnost tvořit biofilmy, což může hrát roli např. při infekci močového traktu při katetrizaci.

Důležitou strukturou kvasinky je buněčná stěna, která přichází do přímého kontaktu s hostitelským organismem, zajišťuje adherenci, obsahuje antigeny rozpoznávané imunitním systémem hostitele a chrání kvasinku před nepříznivými chemickými, fyzikálními a biologickými vlivy (Jílek et al., 2002).

Buněčná stěna *Candida albicans* je hydrofobní, což hraje roli v její virulenci a schopnosti formovat kolonie. Na povrchu buněčné stěny jsou mannoproteiny, přičemž na délce mannosového polysacharidového řetězce závisí hydrofobita a typ polysacharidů také určuje konkrétní sérotyp *Candida albicans*. Také jsou vysoce imunogenní. Mannoproteiny jsou kovalentní vazbou spojeny se sítí chitinových vláken spojených betaglukovými řetězci. Chitin v buněčné stěně může přispívat k rezistenci *Candida albicans* k amfotericinu B tím, že nedovolí jeho průnik k buněčné membráně (Gale et al., 1986). Mannan navíc potlačuje buněčnou imunitu hostitele, čímž přispívá ke snazšímu rozvoji infekce (Greenwood et al., 1999).

V plazmatické membráně kvasinek je pro terapii kandidóz nejvýznamnější obsah ergosterolu. U kvasinek rezistentních k amfotericinu B byl zaznamenán jak vyšší (Hamilton-Miller, 1972), tak nižší (Athat a Winner, 1971) obsah ergosterolu v buněčné membráně.

3.3.2 Diagnostika

Za účelem diagnostiky se *Candida albicans* kultivuje na Sabouraudově agaru při 25–37°C po dobu 1–2 dnů (Greenwood et al., 1999). Při kultivaci zpravidla tvoří hlavně bílé lesklé vypouklé kolonie, ale může dojít ke změně fenotypu.

Důkazem *Candida albicans* může být i tzv. germ tube test (test klíčních hyf), kdy se během prvních tří hodin kultivace objevují klíční hyfy. To ji odlišuje od dalších druhů rodu *Candida* (Votava et al., 2000).

Jelikož je přirozeným kolonizátorem sliznic a kůže, není její mikroskopický a kultivační důkaz postačující pro diagnózu infekce (Votava et al., 2000).

K přesné diagnostice jsou dnes využívány chromogenní půdy a auxanogramy, což jsou testy sledující využívání různých cukrů kvasinkou.

Citlivost k antimykotikům se u jednotlivých kmenů *Candida albicans* výrazně liší díky rezistencím různého původu. Je vhodné provést test citlivosti ke zvolenému antimykotiku před zahájením terapie kandidózy.

3.3.3 Patogeneze

Virulence *Candida albicans* je ovlivněna různými faktory, mezi které patří adheze k povrchu a tvorba biofilmu, tvorba hyf, sekrece proteinas a fenotypové změny, které mají na produkci některých proteolytických enzymů vliv (Yang, 2003).

Adheze k povrchu je podstatnou podmínkou úspěšné infekce a míra schopnosti adheze je úměrná virulenci daného kmene. Adherující strukturou kvasinek jsou proteiny s agglutinin-like sekvencí (ALS proteiny) a tzv. HWP1 proteiny. Ty se váží na lidské epiteliární buňky sliznice.

U *Candida albicans* hrají největší roli v adhezi na sliznice klíční hyfy v počáteční fázi přechodu z kvasinkového stádia do stádia hyf. Pozměněné sekvence proteinu HWP1 vedly k nižší tvorbě stabilních vazeb na sliznice, a přestože celková adherence buněk se nezměnila, byly tyto kmeny ve výsledku méně virulentní (Staab et al., 1999).

Proteinasy vylučované kvasinkami rozkládají mnoho humánních proteinů, mimo jiné albumin, hemoglobin nebo imunoglobulin A (Hube et al., 1998). Proteinas existuje několik typů, kódovaných různými geny. Některé jsou specifické pro kvasinkovou fázi (SAP1,2,3,8), jiné pro fázi hyf a konverzi (SAP4,5,6). Narušení genů pro proteinasy, zejména pro typy 1, 2 a 3, vedlo v experimentech na zvířatech ke snížení virulence (Hube et al., 1997).

Tvorba hyf se u *Candida albicans* považuje za zásadní pro virulenci. Konverze do hyfálního stádia probíhá až při oportunní kandidové infekci, běžně se v organismu vyskytuje v kvasinkové formě. Byly objeveny dva regulační proteiny, z nichž protein Cph1p se uplatňuje v transkripci a tvorbě pseudohyf a protein Efg1p je transkripční faktor. Kmen, který měl oba tyto proteiny změněné, nebyl schopen konverze do stádia hyf (Lo et al., 1997). Právě tvorba hyf je ovlivněna i dvěma zatím známými quorum sensing molekulami – tyrosolem, který ji podporuje, a farnesolem, který ji inhibuje.

3.3.4 Kandidové infekce a jejich terapie

Candida albicans je součástí přirozené mikroflóry organismu a pro zdravého jedince s nepoškozenou imunitou není život ohrožující. Onemocnění způsobená rodem *Candida* se souhrnně označují jako kandidózy. Jsou charakterizována kolonizací a proliferací kvasinky v organismu (Greenwood et al., 1999, Jílek et al., 2002).

Slizniční kandidózy

Postižení sliznic neboli soor je nejčastější formou kandidových infekcí. *Candida albicans* na sliznici tvoří bílé mazlavé povlaky, které se snadno odlučují. Kvasinka je na sliznici uchycena pseudomyceliem prorůstajícím sliznicí.

Soor dutiny ústní postihuje zejména novorozence a pacienty s vrozenou nebo získanou poruchou imunity či hormonální rovnováhy. Iatrogenním rizikovým faktorem je užívání širokospektrých antibiotik, které naruší přirozenou mikroflóru organismu, a terapie steroidy nebo jinými imunosupresivy. Léčí se zpravidla desinficiencii, např. gencianovou violetí, případně lze použít azolové antimykotikum v tekuté lékové formě (Jedličková, 2006).

Na soor dutiny ústní může navázat soor jícnu a dalších částí gastrointestinálního traktu. Děje se tak zejména u imunodeficientních stavů a u kachektizujících nemocí (Koďousek, 2003).

U postižení vaginální sliznice je hlavním příznakem svědění a pálení, většinou, ale ne vždy, je přítomen bílý výtok nebo povlak sliznice. K terapii se užívají azolová antimykotika jednak ve formě krému k zevnímu potírání, jednak ve vaginálních lékových formách. Při léčbě je vhodné kombinovat oba typy přípravků.

Kožní kandidózy

Kožní forma infekce se vyskytuje v různě závažných formách. Mírnou formou je intertrigo, vyskytující se zpravidla na místech vlhké zapářky – kůže mezi prsty, pod prsy, genitální oblast. Postižená kůže má narušenou svrchní vrstvu, což vede k přemnožení mikroorganismů a rozvoji zánětu – je zarudlá, suchá, svědí a odlupuje se. Mikroorganismy na odloučených částečkách kůže jsou zdrojem nepřímé nákazy. Vlhkost kůže usnadňuje uchycení infekce.

Intertrigo je častou komplikací např. obezity, neboť se snadněji tvoří kožní záhyby s příznivým prostředím pro infekci (Kulíková, 2007).

K terapii se používají lokální antimykotika ve formě mastí nebo krémů.

Systémové kandidózy

Candida albicans je oportunní patogen, k rozvoji systémové kandidózy je potřeba určité predispozice nebo oslabení. Mezi rizikové skupiny patří pacienti po transplantacích, kterým jsou podávána imunosupresiva, aby se zabránilo rejekci štěpu, pacienti s hematoonkologickým onemocněním, s imunodeficitem vrozeným nebo získaným (např. infekce HIV/AIDS), ale i pacienti s autoimunitním onemocněním nebo diabetes mellitus (Jedličková, 2006).

Rizikovým faktorem je rovněž podávání některých léčiv. Antibiotika narušují fyziologickou mikroflóru, imunosupresiva, kortikoidy, chemoterapie a radioterapie potlačují imunitu. Katetrizace usnadňuje průnik kvasinky do organismu, *Candida albicans* dokáže na materiálu vytvořit biofilm.

Zdrojem infekce může být i nevyléčená mírná forma kandidózy, např. soor dutiny ústní nebo trávicího traktu, odkud se kvasinka šíří krevní cestou, pravděpodobně přímým průnikem kvasinky skrz cévní stěnu.

Nejčastější jsou infekce plic, ledvin a močových cest, jater, srdce, případně centrálního nervového systému (CNS) (Koďousek, 2003).

Terapie spočívá v podání systémového antimykotika. Konkrétní účinná látka, dávkování a délka terapie se určují individuálně podle typu patogenu, lokalizace a rozsahu infekce a zdravotního stavu pacienta.

Při přítomnosti *Candidy* v krvi (kandidemie) zároveň dochází k infekci oka, kandidové endoftalmitidě, což je významné pro správnou diagnózu, protože jde o jediný typický příznak (Greenwood et al, 1999).

Plicní kandidóza

Infekce plic je zpravidla komplikací jiné choroby. Symptomy jsou obdobné jako při jiných respiračních infekcích, v části případů ale není kandidóza diagnostikována a včas léčena.

Kandidóza ledvin

Symptomaticky se podobá bakteriální nefritidě – bolestivost ledvin, horečka, oligurie. V ledvinách bývá nalezena kvasinka zejména v pseudomycelární formě.

Kandidomykotická endokarditida a kandidemie

Infekce srdce se vyskytuje především jako komplikace kardiologických operací, hemodialýzy nebo u narkomanů. Vyznačuje se výraznou vegetací na srdečních chlopních a sklonem k embolizaci.

3.4 Antimykotika

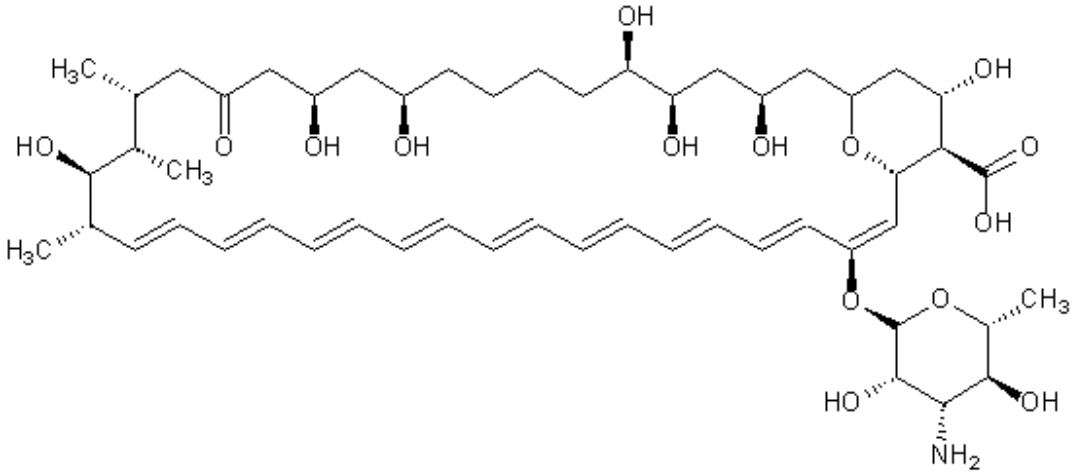
3.4.1 Přehled

Jako antimykotika se označují látky používané k terapii kvasinkových a plísňových infekcí. Protože jde o eukaryotní organismy, nedají se v těchto případech použít antibiotika, která působí na bakterie, tedy na organismy prokaryotní (Hynie, 2003).

Účinek antimykotik může být buď fungistatický, kdy zastaví nárůst a množení buněk, nebo fungicidní, kdy způsobí zánik buněk nebo spor (Hynie, 2003). Typ účinku nezávisí jen na vlastnostech látky, ale i na její koncentraci (Votava a Slíva, 2010).

Podle vlastností jednotlivých látek se dají rozlišit antimykotika lokální (např. nystatin, klotrimazol) a systémová (např. amfotericin B, flukonazol). Lokálně podávané látky jsou zpravidla špatně vstřebatelné nebo toxické při systémovém podání, proto se využívají pouze k místní léčbě kožních a slizničních infekcí nebo při napadení nehtů. Některé systémově podávané látky se dají podávat perorálně, například flukonazol, některé se nevstřebávají vůbec nebo velmi málo, takže je nutno podávat je infuzí, například amfotericin B (Hynie, 2003, Greenwood et al., 1999).

3.4.2 Amfotericin B



Obr. 3: Vzorec amfotericinu B

Sumární vzorec: $C_{47}H_{73}NO_{17}$

CAS: 1397-89-3

Molekulová hmotnost: 924.07902

Je to žlutooranžová pevná látka. Patří do skupiny polyenových antimykotik. Získává se kultivací *Streptomyces nodosus*. Řetězec konjugovaných dvojných vazeb v jeho molekule se váže na ergosterol buněčné membrány, což vytváří v buněčné membráně póry. Těmito póry unikají buňce ionty a živiny (Brejtburg et al., 1990). Vedlejší účinky při použití in vivo mohou být způsobeny tím, že se váže i na steroly savčích buněčných membrán. Určitá specificita k ergosterolu je podmíněna dvojnou vazbou na 22. uhlíku struktury ergosterolu, díky kterému je molekula na rozdíl od molekuly cholesterolu rovinná a lépe interaguje s řetězcem konjugovaných dvojných vazeb v molekule amfotericinu B (Hervé et al., 1989).

Ve vyšších koncentracích působí fungicidně – jeho působení buňku zahubí. Nižší koncentrace mají fungistatický efekt – zastavují růst a množení buněk.

Používá se u těžkých invazivních kandidóz a plísňových infekcí, často jako lék druhé volby po azolových antimykoticích.

Jeho spektrum účinku zahrnuje kvasinky, plísně a prvoky, nepůsobí na dermatofyty (Hynie, 2003).

In vitro byl prokázán jeho účinek na *Candida sp.* (zejména *Candida albicans*, ostatní druhy mohou být méně citlivé), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus sp*., *Mucor sp*., *Sporothrix schenchii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidius immitis*, *Histoplasma capsulatum* (web 4, 2014).

Podává se pouze intravenózně, při podání per os se nevstřebává (Hynie, 2003). Velmi málo proniká přes hematoencefalickou bariéru, do sklivce, slin a moči. Z více než 90 % se váže na plazmatické bílkoviny. Je vylučován ledvinami po dobu několika týdnů až měsíců (Suchopár et al., 1997).

V infuzích je použit amfotericin B v různých úpravách, např. jako koloidní disperze se sulfátem cholesterolu nebo v lipozomech, což zajišťuje nižší toxicitu (Suchopár et al., 1997). Lipozomální forma amfotericinu má terapeuticku výhodu v lepší prostupnosti do CNS. Nižší toxicita je způsobena nižší koncentrací látky v ledvinách.

Různým formám amfotericinu musí být vzhledem k jejich rozdílné kinetice a účinku přizpůsobeno dávkování. Není možné provádět mezi jednotlivými přípravky generické záměny, protože každá forma má dávkování přizpůsobené své odlišné kinetice a při záměně by mohlo dojít k poddávkování nebo předávkování pacienta. Podle formy amfotericinu B se výrazně liší i jeho biologický poločas. Konvenční amfotericin B má poločas asi dva týdny, lipozomální 100–150 hodin, komplex s cholesterylsulfátem 27–28 hodin (web 4, 2014).

V současné době není v České republice registrován přípravek s konvenčním amfotericinem B.

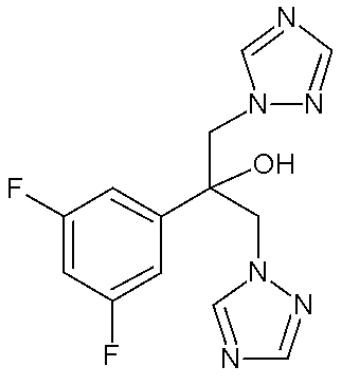
Nejvýznamnějším vedlejším účinkem je nefrotoxicita (Suchopár et al., 1997), u pacienta ji lze monitorovat podle hladin kreatininu, urey a alkalické fosfatázy v krvi – při poškození ledvin jsou tyto hodnoty zvýšené. Při ledvinových chorobách nebo selhání ledvin je nutno podávat amfotericin B s opatrností a pacienta monitorovat. Poškození ledvin mohou potencovat další nefrotoxické látky, např. aminoglykosidy, cisplatina, pentamidin.

Kortikoidy a adenokortikotropní hormon mohou v interakci s amfotericinem působit hypokalemii ohrožující srdeční činnost, amfotericinem způsobená hypokalemie může zvýšit toxicitu digoxinu.

Při podání infuze amfotericinu B v krátkém časovém rozestupu od transfuze leukocytů může nastat poškození plic (web 4, 2014). Amfotericin B zesiluje účinek periferních myorelaxancií (Suchopár et al., 1997).

Předávkování amfotericinem B může vést až k oběhovému selhání.

3.4.3 Flukonazol



Obr. 4: Vzorec flukonazolu (FLZ)

Sumární vzorec: $C_{13}H_{12}F_2N_6O$

CAS: 86386-73-4

Molekulová hmotnost: 306.270786

Flukonazol je bílá krystalická látka. Patří mezi triazolová antimykotika. Je získáván synteticky.

Mechanismus účinku spočívá ve změně složení buněčné membrány. Flukonazol inhibuje enzym cytochrom 14-α-desmethylasu zodpovědnou za demethylaci sterolů. To vede k hromadění methylovaných sterolů, např. lanosterolu, v buněčné membráně a nedostatku ergosterolu, který vzniká po demethylaci. Nedostatek ergosterolu v membráně má za následek její zvýšenou propustnost a únik živin, zejména draslíku a aminokyselin, z buňky (Hynie, 2003). Vykazuje fungistatický účinek.

Spektrum účinku zahrnuje *Candida albicans* (s narůstající rezistencí, zejména u HIV pozitivních pacientů léčených flukonazolem) a některé druhy rodu *Candida* (přirozeně rezistentní je *C. krusei* a *C. glabrata*), *Blastomyces dermatitidis*,

Coccidioides immitis, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, dermatofyty – např. *Microsporum*, *Trichophyton* (Jedličková, 2006).

Používá se u invazivních kandidóz, slizničních kandidóz včetně chronické orální kandidózy, kandidurie, vaginální kandidózy. Také k terapii dermatomykóz a rezistentní onychomykózy. U ohrožených pacientů je užíván k prevenci relapsů, u pacientů s poruchou imunity k prevenci kandidové infekce.

Má dlouhý biologický poločas, asi třicet hodin (Suchopár et al., 1997, Hynie, 2003). Dobře a rychle se absorbuje z gastrointestinálního traktu (GIT), hladina v krvi po perorálním podání je srovnatelná s parenterálním podáním. Narozdíl od některých dalších azolových antimykotik není jeho absorpce z GIT ovlivněna pH ani potravou (Hynie, 2003).

Distribuuje se do tkání a tělních tekutin. Proniká do CNS, proto může být použit např. pro terapii kryptokokové meningitidy (Hynie, 2003). Vysokých koncentrací dosahuje v kůži a moči – až desetinásobek plazmatické koncentrace. Je jen málo vázán na plazmatické proteiny. Je vylučován močí, je proto třeba upravit dávkování u pacientů se sníženou ledvinovou clearance (web 5, 2014).

Je inhibitorem několika isoforem jaterního cytochromu – silně inhibuje isoformu 2A9, středně silně 3A4 (Hynie, 2003). Je nutno pečlivě uvážit kombinaci s léčivy metabolizovanými těmito formami cytochromu. Vážné nežádoucí účinky hrozí u léčiv ovlivňujících srdeční rytmus. To je například terfenadin nebo cisaprid. Zde jde jednak o zpomalené odbourávání léčiv metabolizovaných ovlivněným cytochromem (nejvýznamnější je forma 3A4) a jednak o vlastní nežádoucí účinek flukonazolu spočívající v prodloužení QT intervalu. Kombinace flukonazolu s výše zmíněnými léčivy jsou kontraindikovány.

Dále dochází například k interakci s deriváty sulfonylurey, perorálními antidiabetiky, která může vést až k hypoglykemii (web 5, 2014).

V kombinaci se statiny hrozí zvýšení hladiny statinu a následkem toho poškození svalů. Doporučuje se po dobu léčby flukonazolem vysadit statin (Doseděl et al., 2011).

Relativně vzácným, ale potenciálně závažným nežádoucím účinkem je hepatotoxicita, zpravidla, ale nikoliv vždy, reverzibilní. Může se projevit například tmavou močí, světlou stolicí, zažloutnutím bělma nebo bolestí žaludku.

Dále se mohou vyskytnout různé gastrointestinální účinky (průjem, bolest žaludku, nauzea, zvracení nebo změny chuti), bolesti hlavy a závratě, vzácněji alergické reakce různé intenzity, od kožní vyrážky po angioedém a anafylaktický šok.

Při předávkování se projevují změny v psychice jako neúměrný strach nebo podezíravost, záchvaty a halucinace (web 5, 2014).

Flukonazol má slabší antimykotický účinek než amfotericin B (Hynie, 2003).

Flukonazol a amfotericin B mají v kombinaci in vitro antagonistický účinek, flukonazol snižuje množství ergosterolu v buněčné membráně, čímž zároveň snižuje možnost amfotericinu B navázat se na molekulu ergosterolu. Podávání této kombinace v terapii se proto nedoporučuje (Greenwood et al., 1999).

3.5 Metodiky

3.5.1 Růstová křivka mikroorganismu

Množení a odumírání mikroorganismů v kolonii je charakterizováno růstovou křivkou mikroorganismů. Ta zobrazuje počet buněk a jeho změny v čase. Dá se zobrazovat buď jako počet všech buněk bez ohledu na jejich stav, nebo jako počet živých buněk. Živou buňkou se rozumí buňka schopná dělení. Taková buňka se dá označit pojmem colony-forming unit (CFU) – jejím dělením může vzniknout celá nová kolonie mikrobů (Greenwood et al., 1999).

Růstová křivka začíná takzvanou lag fází neboli fází adaptace. V ní se buňky po přenosu do nového prostředí nedělí, jejich počet díky odumírání starších buněk klesá (Jílek et al., 2002). Roste objem jednotlivých buněk, mikroby mají intenzivní metabolismus (Greenwood et al., 1999). Součástí metabolismu může být i syntéza molekul hrajících roli v quorum sensing, které po dosažení určité koncentrace mohou stimulovat buňky k dělení a tím zkracují lag fázi (Jílek et al., 2002). Tuto roli hraje u *Candida albicans* tyrosol, opačným způsobem působí farnesol, který lag fázi prodlužuje (Chen et al., 2004).

Po lag fázi následuje fáze zrychleného a následně exponenciálního růstu, kdy počet buněk rychle stoupá. Rychlost dělení buněk a délka exponenciální fáze záleží na podmínkách prostředí, zejména na dostupnosti živin a odvodu zplodin metabolismu, a na generační době čili čase mezi dvěma děleními buňky (Jílek et al, 2002, Greenwood et al., 1999).

Přes fázi zpomaleného růstu se pak kolonie dostává do stacionární fáze, kdy je počet buněk nejvyšší a konstantní, protože mikroby se stejnou rychlostí množí i odumírají (Jílek et al., 2002). Někdy ale dochází spíše k zástavě růstu, kdy se buňky nedělí ani nehynou a mají pouze omezený metabolismus (Greenwood et al., 1999).

Vzhledem k rozdílným mechanismům ovlivňujícím exponenciální a stacionární fázi růstu se buňky v těchto dvou fázích mohou morfologicky nebo fyziologicky lišit, např. kvůli obsahu zásobních polysacharidů a lipidů ve stacionární fázi. Pro správné určení morfologie mikroorganismu je klíčová exponenciální fáze růstu (Greenwood et al., 1999).

Po vyčerpání živin, případně prostoru, a nahromadění metabolitů se zhorší životní podmínky pro mikroorganismy a jejich počet kvůli zvýšenému odumírání buněk klesá.

3.5.2 Růstová média

Růstové médium pro kultivaci mikroorganismů musí splňovat nároky na výživu mikroorganismů, mezi něž patří zdroj uhlíku a dusíku, potřebná hladina nebo naopak nepřítomnost kyslíku, patřičná hladina oxidu uhličitého, zdroj energie, případně vitaminy, růstové faktory, antioxidanty a další.

Komplexním zdrojem uhlíku, dusíku, minerálů atd. jsou materiály biologického původu, například masový extrakt, kvasničný extrakt, krev, hydrolyzáty bílkovin. Nerozštěpené bílkoviny většina mikroorganismů využít nedokáže.

V případě biologických materiálů se jedná o živné půdy bez přesně definovaného chemického složení, jejich výhodou je nízká cena.

Sabouraudův agar

Ke kultivaci *Candida albicans* se nejčastěji používá Sabouraudův dextrosový agar, který patří mezi půdy určené k pomnožení mikrobů. Obsahuje pepton

(hydrolyzovaný protein) a glukosu (starším názvem dextrosa). Aminokyseliny z peptonu slouží jako zdroj dusíku. Glukosa je zdrojem uhlíku a energie, navíc její vysoké koncentrace spolu s výsledným nižším pH půdy 5,6 brání nárůstu bakterií, kterými by vzorek mohl být kontaminován. Agar určený ke kultivaci kvasinek může obsahovat i chloramfenikol, který inhibuje růst bakterií (web 6, 2011).

RPMI

RPMI je růstové médium používané pro kultivaci mnoha typů buněk. Obsahuje glukosu, aminokyseliny, sodné, draselné a chloridové ionty a hydrogenuhličitanový pufr (přesné složení je uvedeno v příloze 1). K nastavení správného pH média slouží fenolová červeň (web 7, 2014).

DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO) je rozpouštědlo běžně užívané k rozpouštění antimykotik při testech. Podle studie Randhawa et al., 2008 dimethylsulfoxid v koncentraci vyšší než 1,25 % inhibuje tvorbu klíčních hyf u *Candida albicans*. Při použití DMSO v experimentech je proto třeba použít nižší koncentraci.

3.5.3 Testování antibiotické účinnosti

Testování antibiotické, případně antimykotické účinnosti může být provedeno několika metodami. Agarová difuzní metoda spočívá v uvolňování antibiotika do agaru z disků nebo proužku nasycených různými koncentracemi antibiotika. Agarová diluční metoda využívá agaru nasyceného různými koncentracemi antibiotika.

Diluční bujónové testy se provádějí v tekutém médiu s různými koncentracemi antibiotika. Antibiotikum je naředěno tzv. dvojkovou řadou – každá následující koncentrace je poloviční než koncentrace předchozí.

Makrodiluční test používá naředěná antibiotika ve zkumavkách, mikrodiluční test v jamkách mikrotitrační destičky.

Vyhodnocování

U kvantitativních testů antibiotické účinnosti se určuje minimální inhibiční koncentrace – nejnižší koncentrace antimykotika, která ještě vykazuje požadovaný účinek na mikroorganismy. U amfotericinu B, fungicidně působícího antimykotika, je to ta nejnižší koncentrace antimykotika, za jejíž přítomnosti v jamce nebo zkumavce nenastal žádný nárůst buněk.

V případě fungistaticných antimykotik, mezi které patří flukonazol, se minimální inhibiční koncentrace určuje podle požadovaného poklesu množství buněk v porovnání s kontrolní, ničím neovlivněnou jamkou nebo zkumavkou. Při mikrodilučním testu se jako MIC bere nejnižší koncentrace antimykotika, při které je nárůst v jamce poloviční oproti kontrole, čili jeho pokles o 50 %. Dá se využít i jednodušší číselná stupnice, kdy 0 znamená žádný nárůst a 4 nárůst v kontrolní jamce, tedy 100 %. Stupeň 1 se použije pro jamky se slabým zákalem způsobeným buňkami, stupeň 2 pro výrazný pokles množství buněk oproti kontrolní jamce, cca 50 %. Stupněm 3 je označen mírný pokles v množství buněk (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

V makrodilučním testu se MIC určí podle zkumavky, kde je zaznamenán pokles množství buněk o 80 % oproti kontrolní, antimykotikem neovlivněné zkumavce.

Diluční bujónové testy lze vyhodnocovat turbidimetricky. Ne vždy je ale měření vzniklého zákalu přesnější než vizuální odečet, protože některé mikroorganismy, včetně *Candida albicans*, tvoří biofilmy, které se nedají roztřepat na homogenní suspenzi buněk. Proto se využívá vizuálního hodnocení zkumavek nebo destiček proti černému pozadí.

4 Praktická část

4.1 Chemikálie

Amfotericin B (Fluka)

Flukonazol (Fluka)

Tyrosol (Sigma Aldrich, 98 %)

Sabouraudův dextrosový základ (HIMEDIA)

Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich)

RPMI (Sevapharma)

MOPS (≥ 99,5%, BioWhittaker)

Sterilní voda (Fresenia Cabi)

Sterilní fyziologický roztok (Fresenia Cabi)

4.2 Přístrojové a materiálové vybavení

Laminární box ESCO class type A2

Mikroskop Olympus BX 40

Bürkerova počítací komůrka

Plastové zkumavky s víčky a mikrozkumavky Eppendorf

Automatické pipety a multikanálová pipeta Socorex, pipetovací špičky

Mikrotitrační destičky (96 jamek) s víčky

Termobox Binder

Třepačka Grant-Bio

Denzitometr Biosan DEN-1B

Dvanáctijamkový pipetovací rezervoár a nedělený rezervoár

4.3 Testované kmeny *Candida albicans*

4.3.1 Testované kmeny

V pokusu byly použity standardní kmeny *Candida albicans* ATTC 8712, 25580, 10231 a 25188 a izoláty z hrtanu, dásně, moči, kosti, pochvy, bronchoalveolární laváže

(BAL), sputa, plic, úst, nosohltanu, rekta, centrálního žilního katetru a tracheálního aspirátu (TAS). Seznam všech použitých kmenů je uveden v příloze.

4.3.2 Příprava suspenze buněk Candida albicans

Odebrané vzorky se kultivují na Sabouraudově agaru při teplotě 37°C. Dvacet čtyři hodin před testováním se testované kolonie přeočkují na nový Sabouraudův agar a inkubují při teplotě 37 °C.

Nejprve se připraví základní suspenze buněk ve fyziologickém roztoku. Koncentrace základní suspenze je $1x10^6$ – $5x10^6$ CFU/ml. Suspenze se připravuje ve zkumavce, kde se část kolonie odebraná z agaru mikrobiologickou kličkou postupně roztírá po stěně zkumavky a mísí s fyziologickým roztokem.

Koncentrace základní suspenze se kontroluje mikroskopicky počítáním buněk v Bürkerově komůrce. Rozsah koncentrací $1x10^6$ – $5x10^6$ CFU/ml odpovídá 4 – 20 buňkám ve čtverci o ploše 0,04 mm^2.

Základní suspenze se ředí RPMI v poměru 30 µl suspenze k 1470 µl RPMI. 1 ml této suspenze se dále ředí 19 ml RPMI k dosažení koncentrace buněk $1x10^3$ – $5x10^3$ CFU/ml. Výsledná suspenze se pipetuje na mikrotitrační destičku.

Suspenze buněk se připravuje v potřebném množství v den pokusu.

4.4 Média

4.4.1 Sabouraudův agar

Základ pro Sabouraudův dextrosový agar obsahuje 40 gramů glukosy, 10 gramů peptonu a 15 gramů agaru.

65 gramů základu se rozpustí v 1000 ml destilované vody a přivede se k varu, aby se základ dokonale rozpustil. Sterilizuje se v autoklávu, 15 minut při 121°C.

Výsledné pH půdy je 5,6±0.2.

4.4.2 RPMI

10,45 g základu (přesné složení v příloze) se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Výsledný roztok se sterilizuje filtrací. Před použitím se RPMI zředí roztokem MOPS v poměru 1:4 (RPMI:MOPS).

4.4.3 MOPS

3-(N-morfolin)propansulfonová kyselina je pufrační činidlo.

17,25 g základu se rozpustí v 500 ml destilované vody.

4.4.4 Tyrosol

Rozpuštěním 6,9082 g tyrosolu v 1 ml RPMI vznikne zásobní roztok tyrosolu o koncentraci 50 mmol/l.

Roztok T1 o koncentraci 2 µmol/ml se připraví smísením zásobního roztoku tyrosolu a RPMI v poměru 1:24.

Roztok T2 o koncentraci 1 µmol/ml se připraví smísením roztoku T1 a RPMI v poměru 1:1.

Roztok T3 o koncentraci 0,4 µmol/ml vznikne smísením T1 a RPMI v poměru 1:4.

Roztok T4 o koncentraci 0,24 µmol/ml vznikne smísením T1 a RPMI v poměru 3:22.

Roztok T5 o koncentraci 0,12 µmol/ml vznikne smísením T1 a RPMI v poměru 3:47.

Roztok T6 o koncentraci 0,04 µmol/ml vznikne smísením T1 a RPMI v poměru 1:49.

4.4.5 Antimykotika

Rozpuštením 16 mg antimykotika v 10 ml rozpouštědla vznikne zásobní roztok o koncentraci 1,6 mg/ml. Amfotericin B se rozpouští v dimethylsulfoxidu, flukonazol ve vodě.

Zásobní roztok se používá k přípravě koncentrační řady roztoků antimykotika. Smísením zásobního roztoku a RPMI v poměru 1:49 vznikne roztok C1 o koncentraci 32 µg/ml. Roztok C2 o koncentraci 16 µg/ml vznikne smísením roztoku C1 a RPMI v poměru 1:1, následným ředěním dvojkovou řadou (ředění předchozího roztoku s vyšší koncentrací antimykotika s čistým médiem v poměru 1:1) se připraví roztoky C3-C10 o následujících koncentracích:

C3 - 8 µg/ml

C4 - 4 µg/ml

C5 - 2 µg/ml

C6 - 1 µg/ml

C7 – 0,5 µg/ml

C8 – 0,25 µg/ml

C9 – 0,125 µg/ml

C10 – 0,063 µg/ml

Postup je stejný pro přípravu roztoků amfotericinu B i flukonazolu. Roztoky se připravují do zkumavek vždy čerstvé v den pokusu.

4.5 Metoda testování

4.5.1 Provedení exprimentu

Test se provádí v mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Každá destička obsahuje jeden testovaný kmen a jedno antimykotikum.

Do řádků destičky se pipetuje vždy 50 µl jedné koncentrace tyrosolu. Roztok T1 (nejvyšší koncentrace) se pipetuje do řádku A, T2 do řádku B, T3 do řádku C, T4 do řádku D, T5 do řádku E a roztok T6 (nejnižší koncentrace) do řádku F. Do řádků G a H se pipetuje 50 µl čistého RPMI (řádek G slouží k odečtu MIC bez ovlivnění tyrosolem, řádek H je kontrola nulové bakteriální kontaminace antimykotika). Do sloupců destičky se pipetuje vždy 50 µl jedné koncenrace antimykotika při zachování koncentrační řady. Roztok C1 se pipetuje do sloupce 1 až roztok C10 do sloupce 10. Do sloupce 11 se pipetuje 50 µl RPMI (sleduje se vlastní antimikrobní účinek tyrosolu). Do celého sloupce 12 a řádku H se pipetuje 150 µl RPMI (slouží jako kontrola kontaminace médií). Do sloupců 1 – 11 a řádků A - G se pipetuje 100 µl suspenze buněk. Schéma mikrotitrační destičky s koncentracemi testovaných látek je uvedeno v příloze 3.

Veškerá práce s testovanými kmeny, roztoky látek a suspenzemi buněk je prováděna v laminárním boxu.

Destička je inkubována 24 hodin při 37 °C bez přístupu světla.

4.5.2 Hodnocení testu

Hodnotí se nárůst buněčných kolonií v jednotlivých jamkách v porovnání s jamkou G 11, která neobsahuje antimykotikum ani tyrosol, a proto je nárůst kolonií v této jamce hodnocen jako stoprocentní.

Destička se hodnotí vizuálně proti černému pozadí a proti světlu.

Jako minimální inhibiční koncentrace amfotericinu B je hodnocena nejnižší koncentrace, která zcela inhibuje nárůst kolonií.

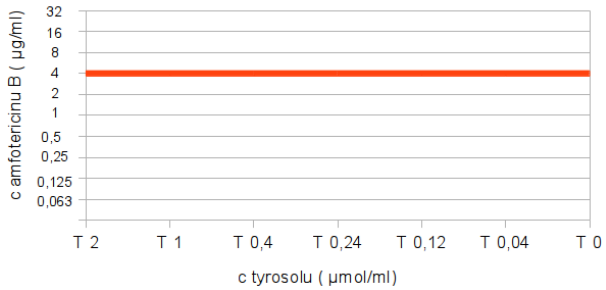
Jako minimální inhibiční koncentrace flukonazolu je hodnocena nejnižší koncentrace, která inhibuje nárůst kolonií o 50 %.

Destičky se hodnotí po 24 a 48 hodinách inkubace při 37 °C.

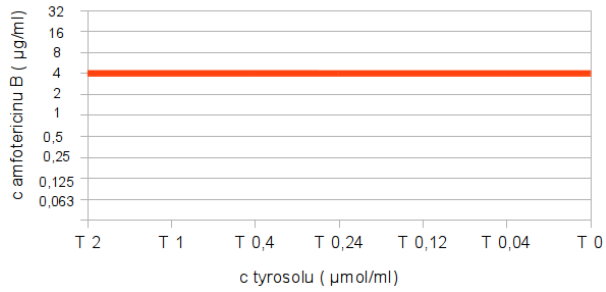
5 Výsledky

5.1 Amfotericin B

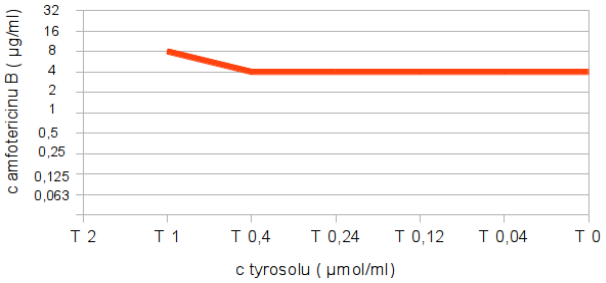
5.1.1 Sbírkové kmeny



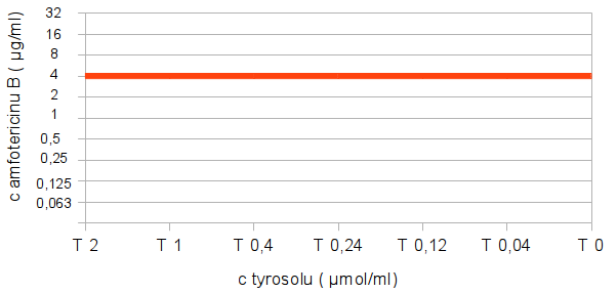
Obr. 5: Interakce AMB a T - kmen 8712: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 6: Interakce AMB a T - kmen 25 580: Nedošlo ke změně MIC.

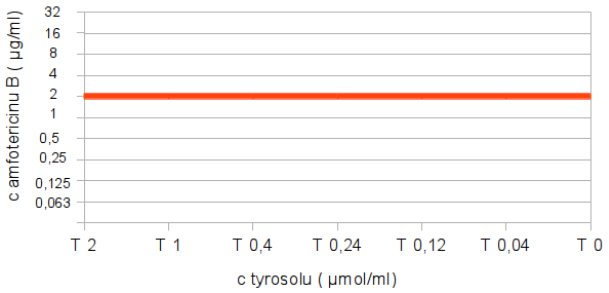


Obr. 7: Interakce AMB a T - kmen 10 231: Při koncentraci tyrosolu 1 µmol/ml došlo k mírnému nárůstu MIC. Kvůli chybě v pipetování nebylo možné odečíst hodnotu MIC při koncentraci tyrosolu 2 µmol/ml.

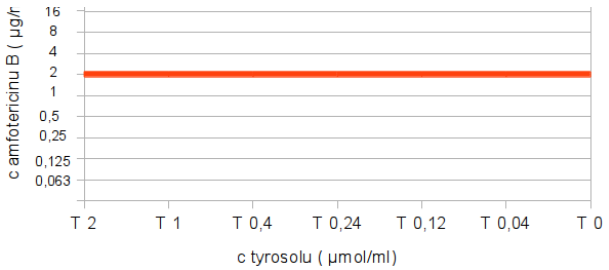


Obr. 8: Interakce AMB a T - kmen 25 188: Nedošlo ke změně MIC.

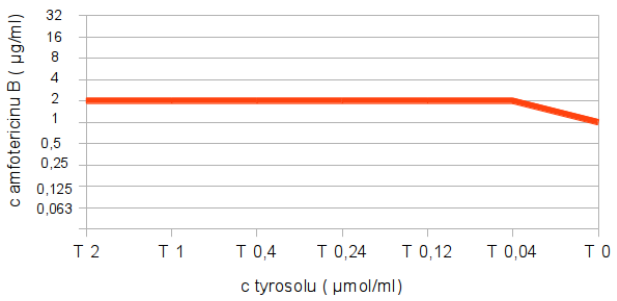
5.1.2 Klinické izoláty – pochva



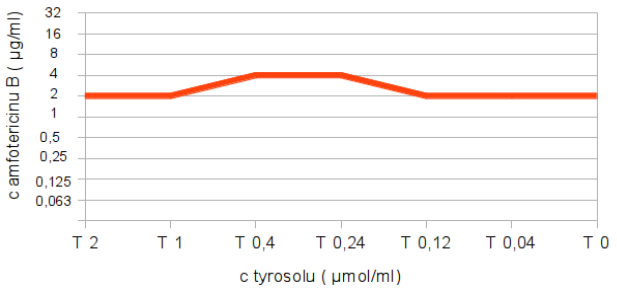
Obr. 9: Interakce AMB a T - vzorek 9, akutní zánět pochvy: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 10: Interakce AMB a T - vzorek 11, chronický zánět pochvy: Nedošlo ke změně MIC.

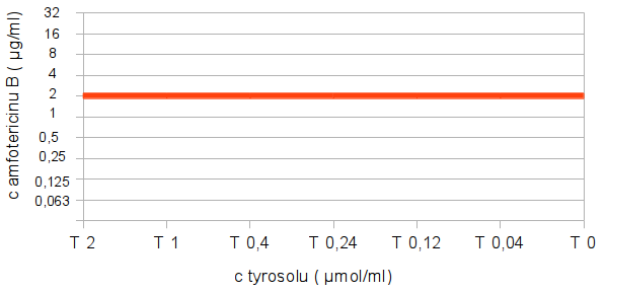


Obr. 11: Interakce AMB a T - vzorek 12, hnis z pochvy: Mírný nárůst MIC za přítomnosti všech koncentrací tyrosolu.

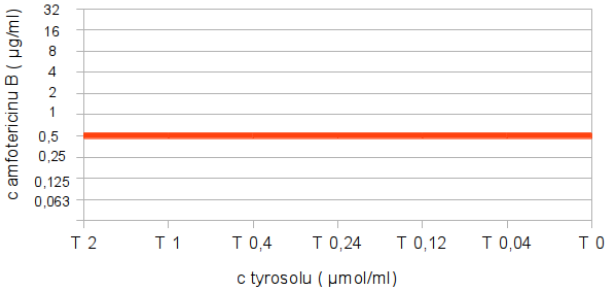


Obr. 12: Interakce AMB a T - vzorek 23, pochva: Mírný nárůst MIC při koncentraci tyrosolu 0,4 a 0,24 µmol/ml.

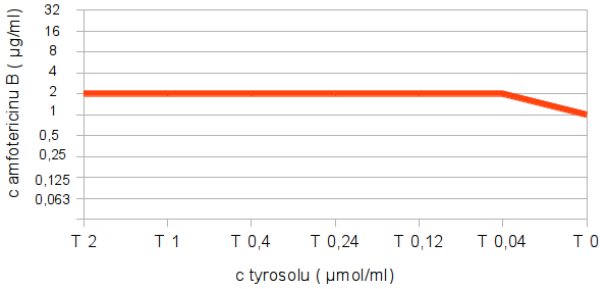
5.1.3 Klinické izoláty – bronchoalveolární laváž



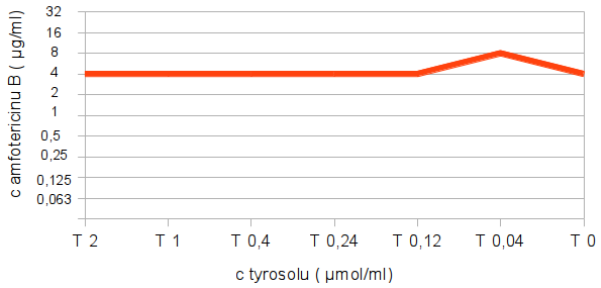
Obr. 13: Interakce AMB a T – vzorek 10, BAL: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 14: Interakce AMB a T - vzorek 13, BAL: Nedošlo ke změně MIC.

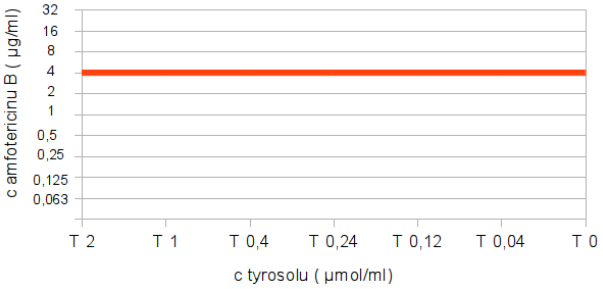


Obr. 15: Interakce AMB a T - vzorek 14, BAL: Mírný nárůst MIC při přítomnosti tyrosolu ve všech koncentracích.

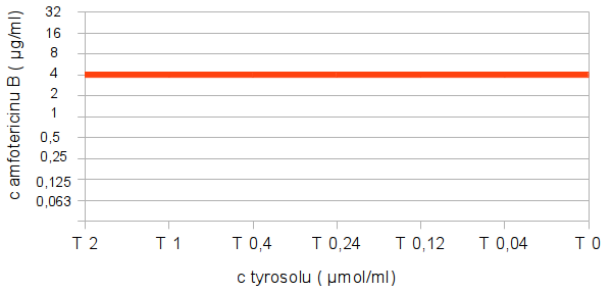


Obr. 16: Interakce AMB a T- vzorek 32, BAL: Mírné zvýšení MIC při koncentraci tyrosolu 0,04 µmol/ml.

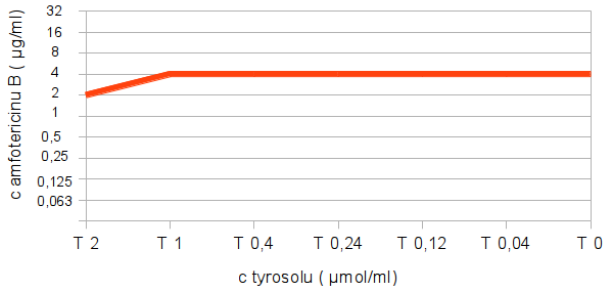
5.1.4 Klinické izoláty – tracheální aspirát



Obr. 17: Interakce AMB a T - vzorek 33, TAS: Nedošlo ke změně MIC.

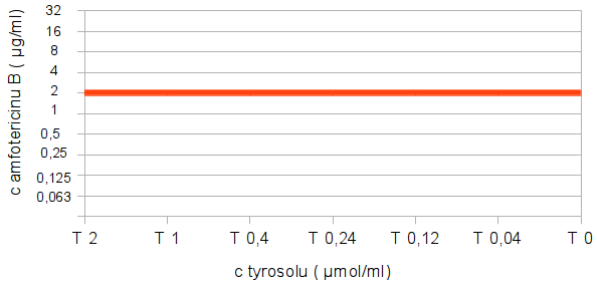


Obr. 18: Interakce AMB a T - vzorek 38, TAS: Nedošlo ke změně MIC.

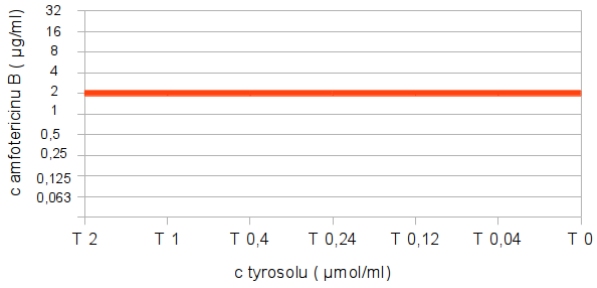


Obr. 19: Interakce AMB a T - vzorek 39, TAS: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml nastalo mírné snížení MIC.

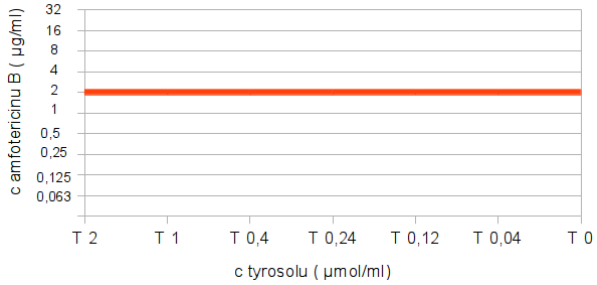
5.1.5 Klinické izoláty – hrtan



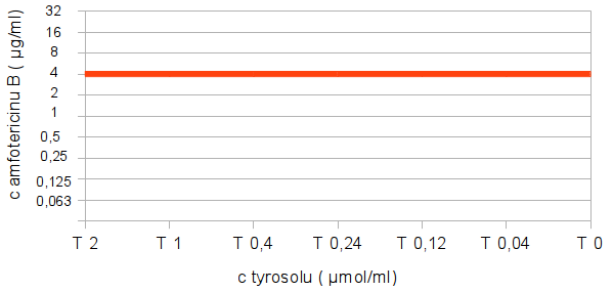
Obr. 20: Interakce AMB a T - vzorek 5, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 21: Interakce AMB a T - vzorek 15, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.

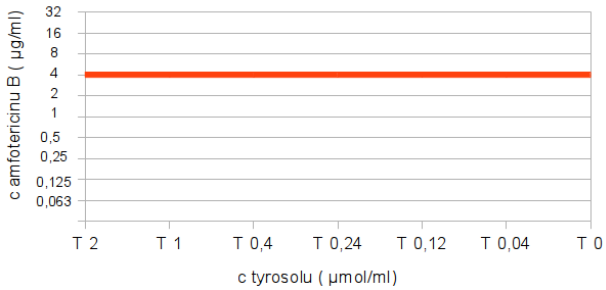


Obr. 22: Interakce AMB a T - vzorek 30, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.

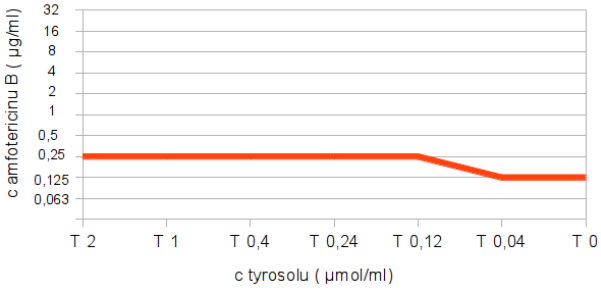


Obr. 23: Interakce AMB a T - vzorek 34, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.

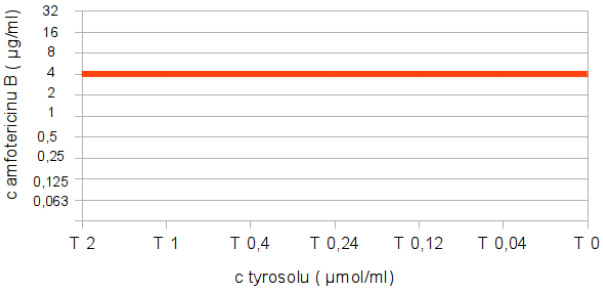
5.1.6 Klinické izoláty – nosohltan



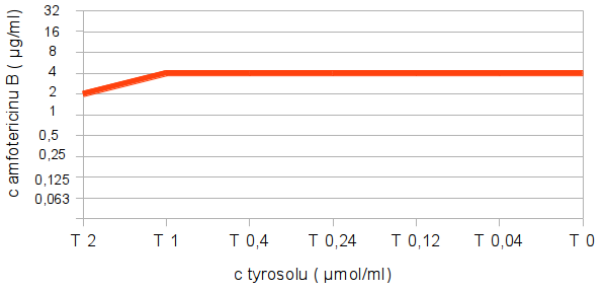
Obr. 24: Interakce AMB a T - vzorek 19, nosohltan: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 25: Interakce AMB a T - vzorek 21, nosohltan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 0,12 µmol/ml a vyšší došlo k mírnému nárůstu MIC.

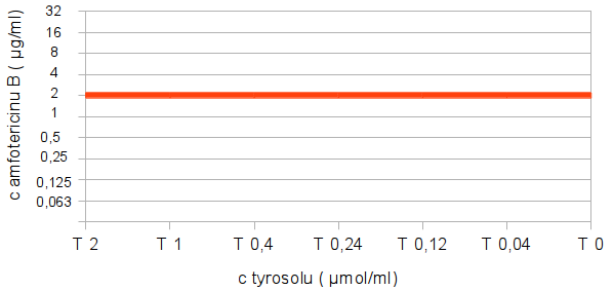


Obr. 26: Interakce AMB a T - vzorek 29, nosohltan: Nedošlo ke změně MIC.

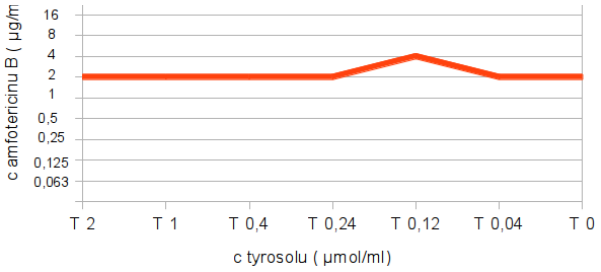


Obr. 27: Interakce AMB a T - vzorek 40, nosohltan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml nastalo mírné snížení MIC.

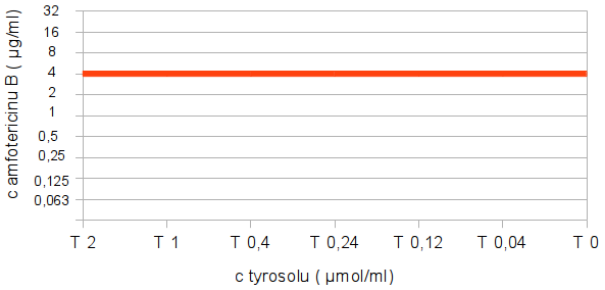
5.1.7 Klinické izoláty – sputum



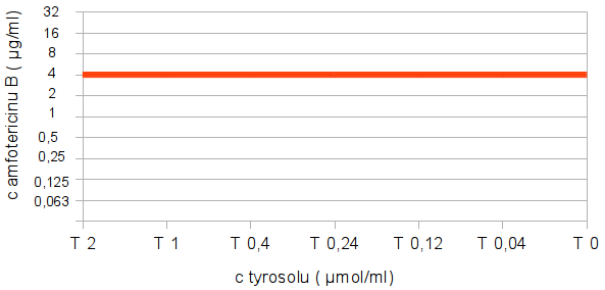
Obr. 28: Interakce AMB a T - vzorek 16, sputum: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 29: Interakce AMB a T - vzorek 24, sputum: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 0,12 µmol/ml nastalo mírné zvýšení MIC.

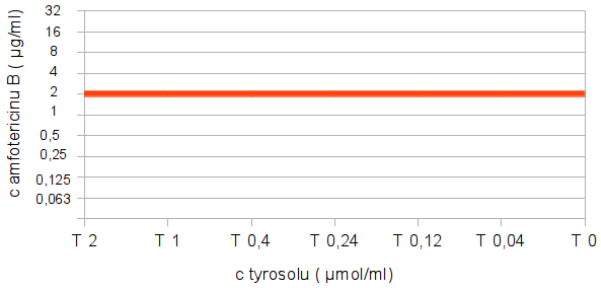


Obr. 30: Interakce AMB a T - vrozek 27, sputum: Nedošlo ke změně MIC.

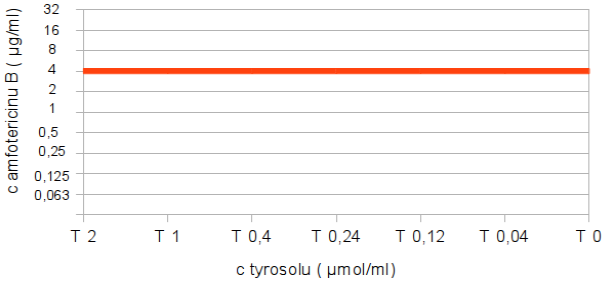


Obr. 31: Interakce AMB a T - vzorek 35, sputum: Nedošlo ke změně MIC.

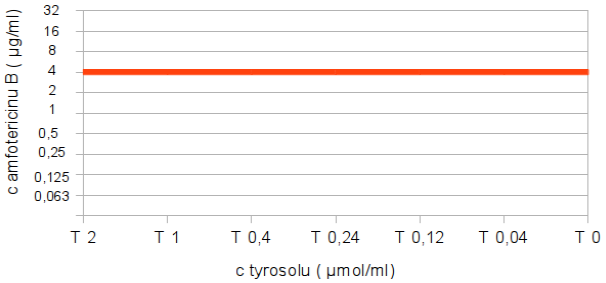
5.1.8 Klinické izoláty – ústní dutina



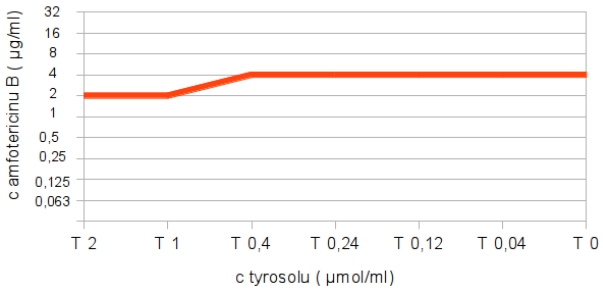
Obr. 32: Interakce AMB a T - vzorek 6, dáseň: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 33: Interakce AMB a T - vzorek 18, ústa: Nedošlo ke změně MIC.

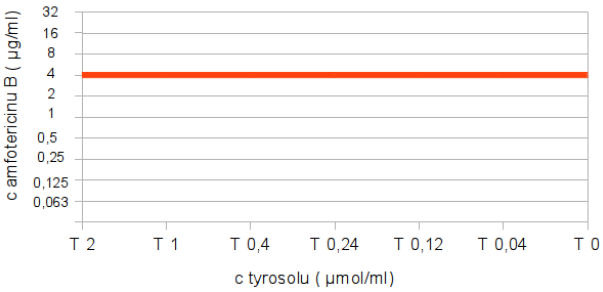


Obr. 34: Interakce AMB a T - vzorek 26, ústa: Nedošlo ke změně MIC.

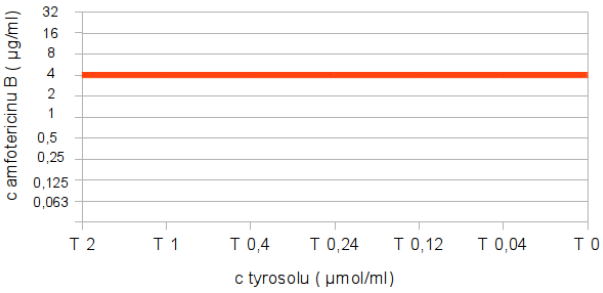


Obr. 35: Interakce AMB a T - vzorek 37, ústa: Za přítomnosti tyrosolu v koncentracích 1 a 2 µmol/ml nastalo mírné snížení MIC.

5.1.9 Klinické izoláty – plíce

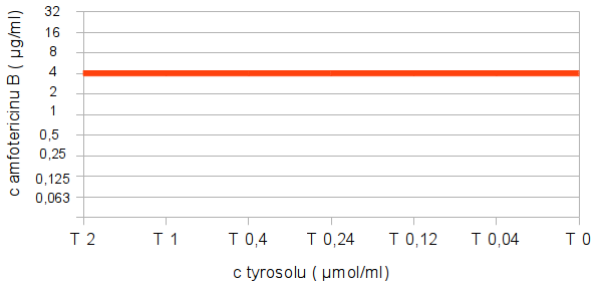


Obr. 36: Interakce AMB a T - vzorek 28, plíce: Nedošlo ke změně MIC.

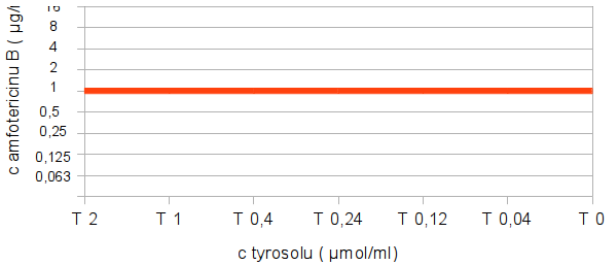


Obr. 37: Interakce AMB a T - vzorek 17, plíce: Nedošlo ke změně MIC.

5.1.10 Klinické izoláty – rektum

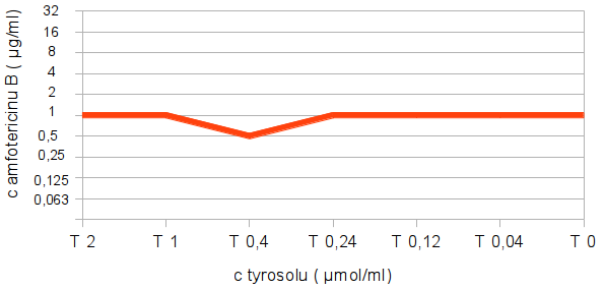


Obr. 38: Interakce AMB a T - vzorek 25, rektum: Nedošlo ke změně MIC.

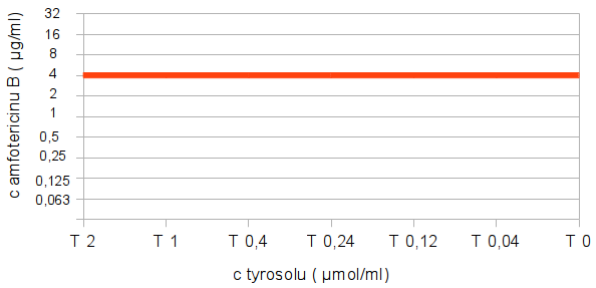


Obr. 39: Interakce AMB a T - vzorek 22, rektum: Nedošlo ke změně MIC.

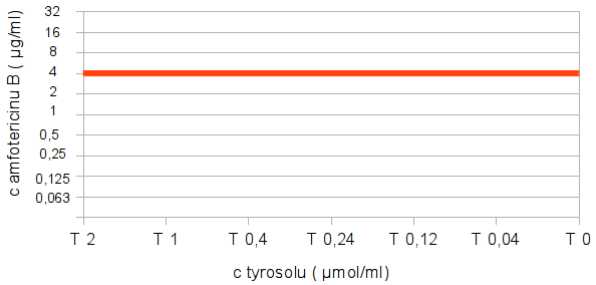
5.1.11 Klinické izoláty – moč



Obr. 40: Interakce AMB a T - vzorek 7, moč: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 0,4 µmol/ml došlo k mírnému snížení MIC.

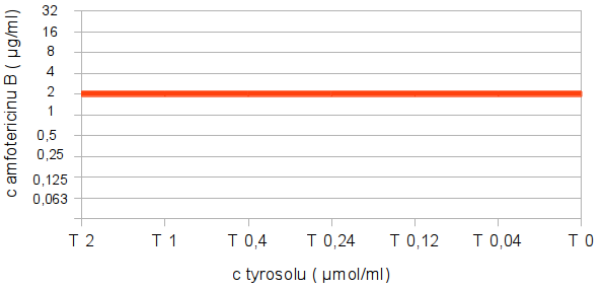


Obr. 41: Interakce AMB a T - vzorek 20, moč: Nedošlo ke změně MIC.



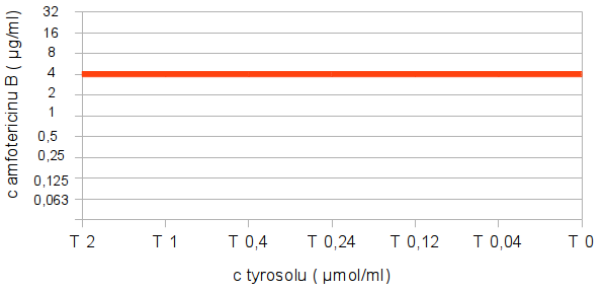
Obr. 42: Interakce AMB a T- vzorek 31, moč: Nedošlo ke změně MIC.

5.1.12 Klinické izoláty – nekrotická kost



Obr. 43: Interakce AMB a T - vzorek 8, nekrotická kost: Nedošlo ke změně MIC.

5.1.13 Klinické izoláty – centrální žilní katetr



Obr. 44: Interakce AMB a T - vzorek 36, centrální žilní katetr: Nedošlo ke změně MIC.

5.1.14 Shrnutí pro všechny kmeny

Změna MIC antimykotika je hodnocena následovně:

změna o 1 stupeň ředění – mírná změna

změna o 2 stupně ředění – střední změna

změna o 3 a více stupňů ředění – výrazná změna

Při použití amfotericinu B jako antmykotika byly u celkem 40 vzorků zjištěny následující výsledky:

U čtyř kmenů došlo oproti kontrole k mírnému zvýšení MIC v přítomnosti vyšších koncentrací tyrosolu.

U čtyř kmenů se MIC mírně zvýšila u některých nižších koncentrací tyrosolu, ale při nejvyšší koncentraci zůstala stejná jako kontrolní.

Tři kmeny reagovaly na nejvyšší a další koncentrace tyrosolu mírným snížením MIC.

U jednoho kmene došlo ke snížení MIC po nižší koncentraci tyrosolu, přičemž při nejvyšší koncentraci tyrosolu byla MIC stejná jako u kontrolního vzorku.

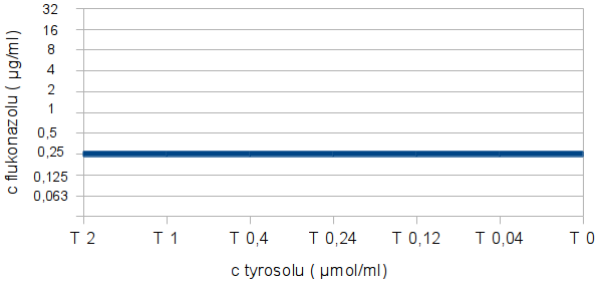
Dvacet osm kmenů zůstalo beze změny.

U žádného kmene nedošlo ke střední nebo výrazné změně MIC.

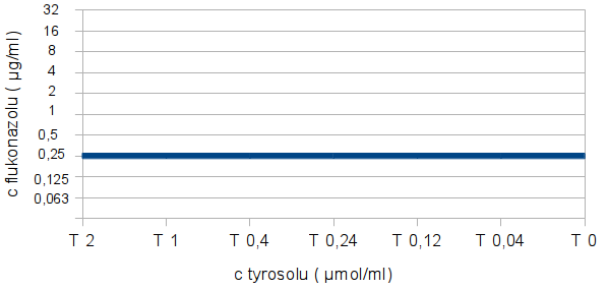
Graf 1: Změna MIC amfotericinu B v závislosti na přítomnosti tyrosolu

5.2 Flukonazol

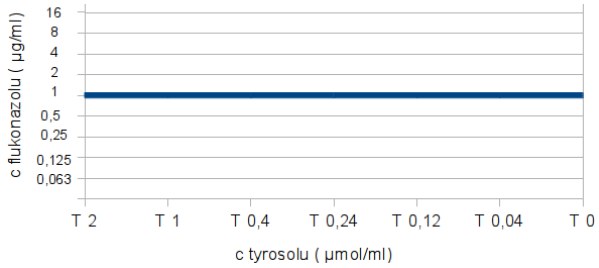
5.2.1 Sbírkové kmeny



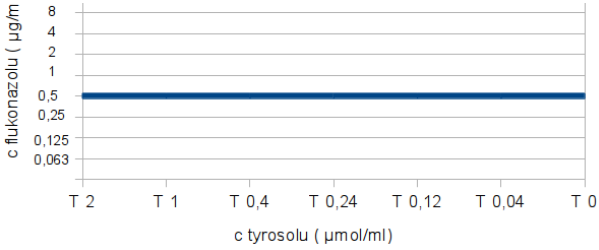
Obr. 45: Interakce FLZ a T - kmen 8712: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 46: Interakce FLZ a T - kmen 25 580: Nedošlo ke změně MIC.

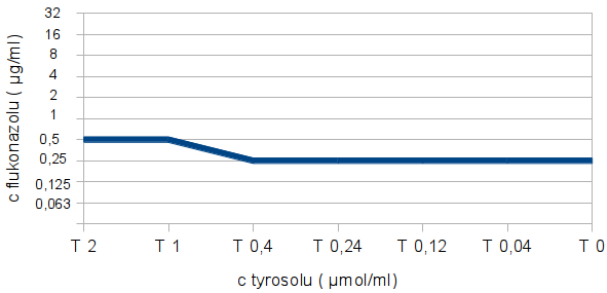


Obr. 47: Interakce FLZ a T - kmen 10 231: Nedošlo ke změně MIC.

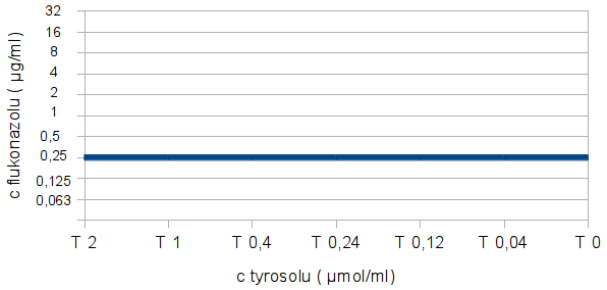


Obr. 48: Interakce FLZ a T - kmen 25 188: Nedošlo ke změně MIC.

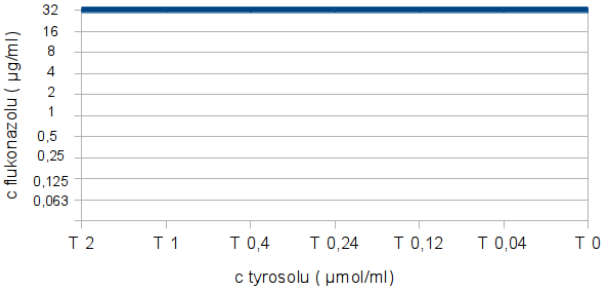
5.2.2 Klinické izoláty – pochva



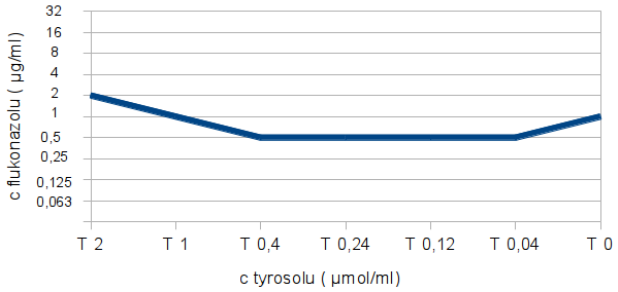
Obr. 49: Interakce FLZ a T - vzorek 9, akutní zánět: V přítomnosti tyrosolu o koncentraci 1 a 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.



Obr. 50: Interakce FLZ a T - vzorek 11, chronický zánět: Nedošlo ke změně MIC.

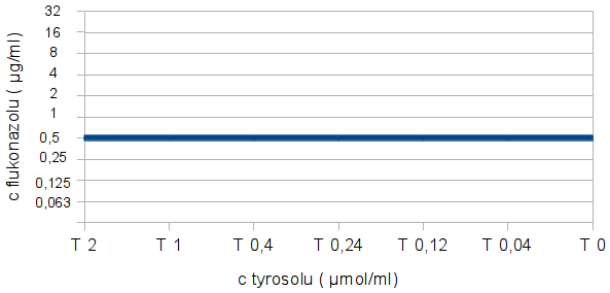


Obr. 51: Interakce FLZ a T - vzorek 12, hnis z pochvy: Kmen je rezistentní vůči flukonazolu v použitých koncentracích.

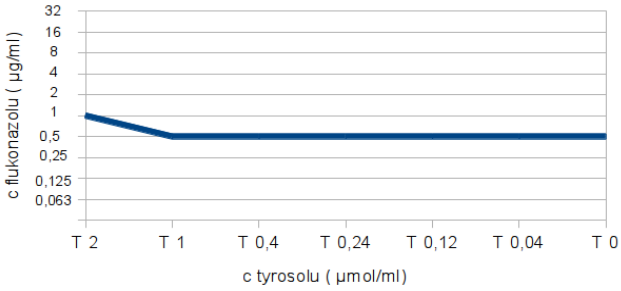


Obr. 52: Interakce FLZ a T - vzorek 23, pochva: u vysokých koncentrací T došlo k mírnému snížení MIC, v nízké naopak ke zvýšení MIC.

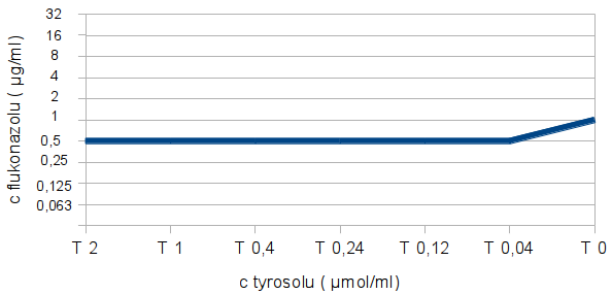
5.2.3 Klinické izoláty – bronchoalveolární laváž



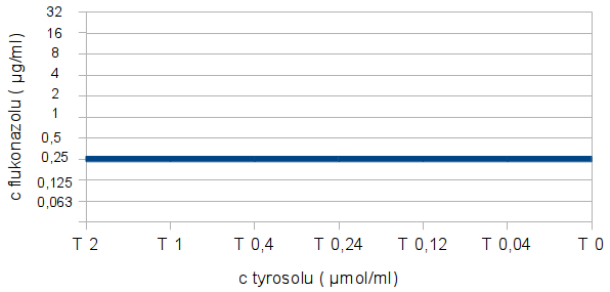
Obr. 53: Interakce FLZ a T - vzorek 10, BAL: Nedošlo ke změně MIC.



Obr. 54: Interakce FLZ a T - vzorek 13, BAL: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.

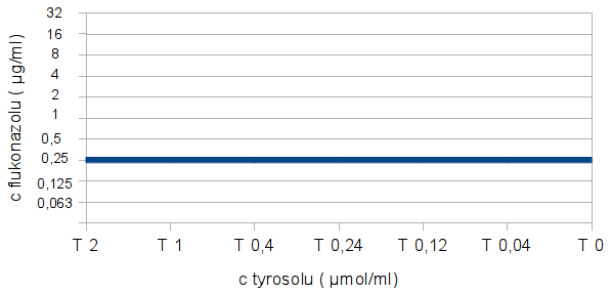


Obr. 55: Interakce FLZ a T - vzorek 14, BAL: Za přítomnosti tyrosolu ve všech koncentracích došlo k mírnému snížení MIC.

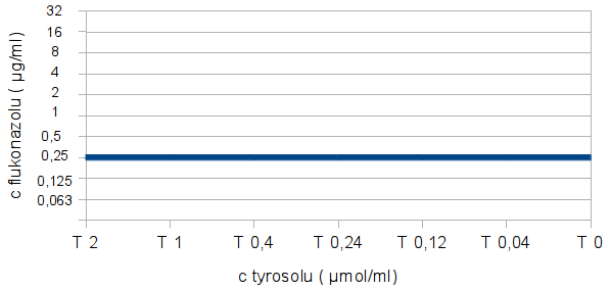


Obr. 56: Interakce FLZ a T - vzorek 32, BAL: Nedošlo ke změně MIC.

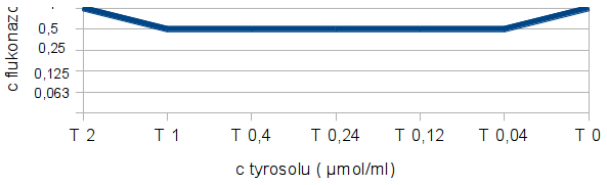
5.2.4 Klinické izoláty – tracheální aspirát



Obr. 57: Interakce FLZ a T - vzorek 32, TAS: Nedošlo ke změně MIC.

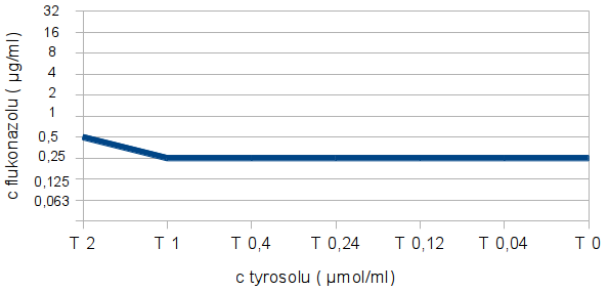


Obr. 58: Interakce FLZ a T - vzorek 38, TAS: Nedošlo ke změně MIC.

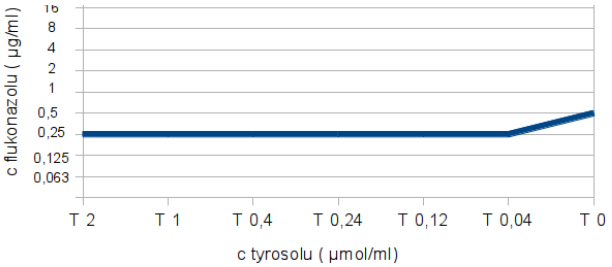


Obr. 59: Interakce FLZ a T - vzorek 39, TAS: Za přítomnosti tyrosolu v koncentracích 1-0,04 µmol/ml došlo k mírnému snížení MIC.

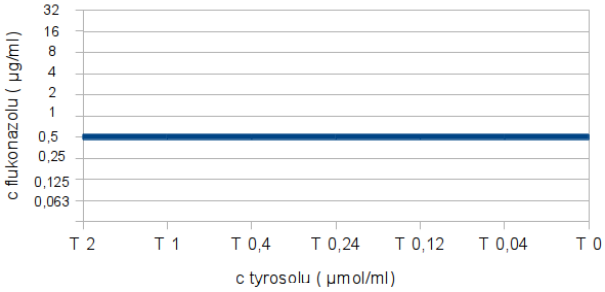
5.2.5 Klinické izoláty – hrtan



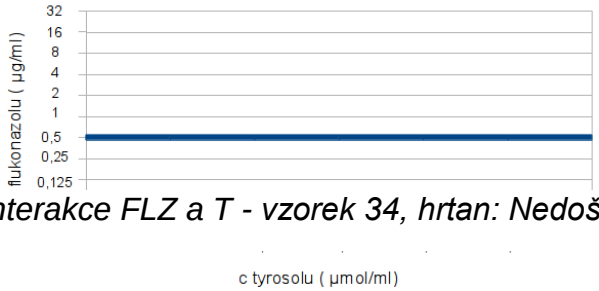
Obr. 60: Interakce FLZ a T - vzorek 5, hrtan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.



Obr. 61: Interakce FLZ a T - vzorek 15, hrtan: Za přítomnosti všech koncentrací tyrosolu došlo k mírnému snížení MIC.

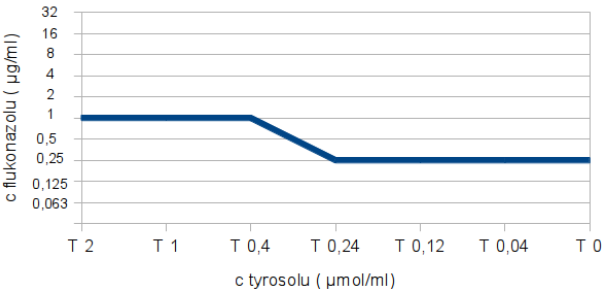


Obr. 62: Interakce FLZ a T - vzorek 30, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.

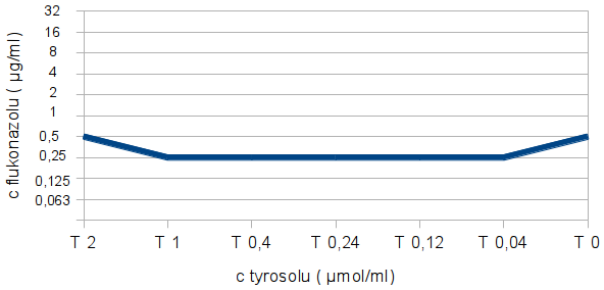


Obr. 63: Interakce FLZ a T - vzorek 34, hrtan: Nedošlo ke změně MIC.

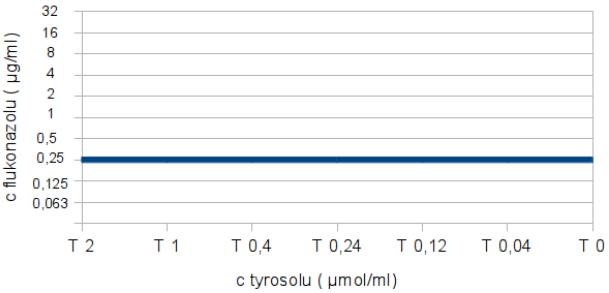
5.2.6 Klinické izoláty – nosohltan



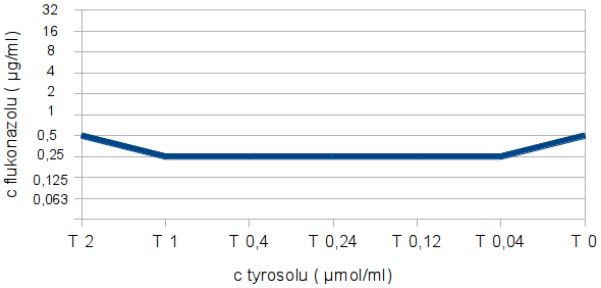
Obr. 64: Interakce FLZ a T - vzorek 19, nosohltan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 0,4 µmol/ml a vyšších došlo ke střednímu zvýšení MIC



Obr. 65: Interakce FLZ a T - vzorek 21, nosohltan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentracích 1-0,04 µmol/ml došlo k mírnému snížení MIC.

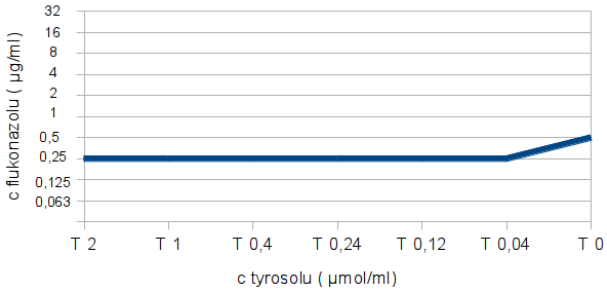


Obr. 66: Interakce FLZ a T - vzorek 29, nosohltan: Nedošlo ke změně MIC.

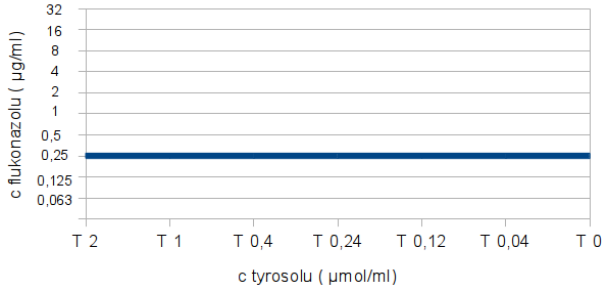


Obr. 67: Interakce FLZ a T - vzorek 21, nosohltan: Za přítomnosti tyrosolu v koncentracích 1-0,04 µmol/ml došlo k mírnému snížení MIC.

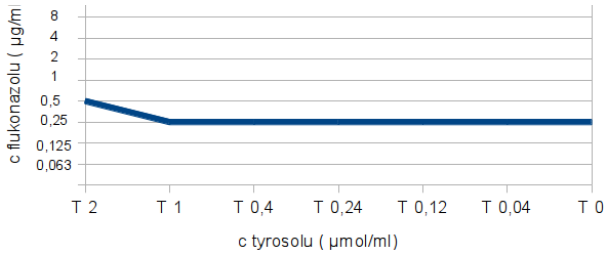
5.2.7 Klinické izoláty – sputum



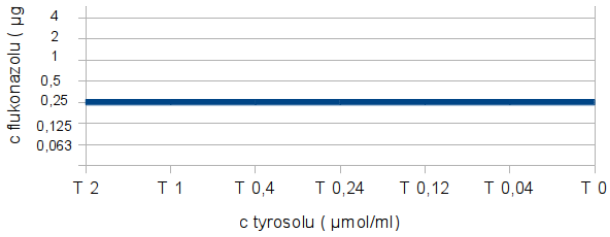
Obr. 68: Interakce FLZ a T - vzorek 16, sputum: Za přítomnosti všech koncentrací tyrosolu došlo k mírnému snížení MIC.



Obr. 69: Interakce FLZ a T - vzorek 24, sputum: Nedošlo ke změně MIC.

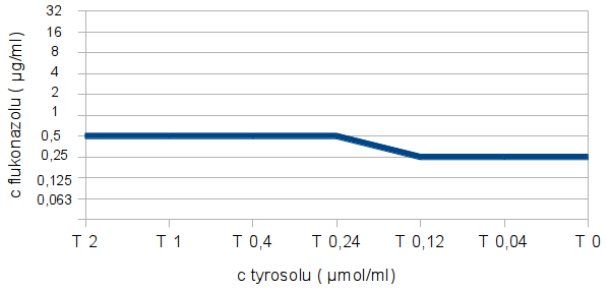


Obr. 70: Interakce FLZ a T - vzorek 27, sputum: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.

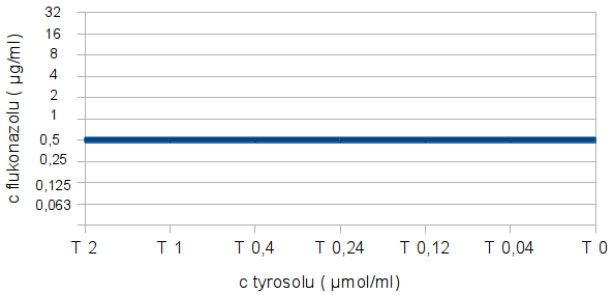


Obr. 71: Interakce FLZ a T - vzorek 35, sputum: Nedošlo ke změně MIC.

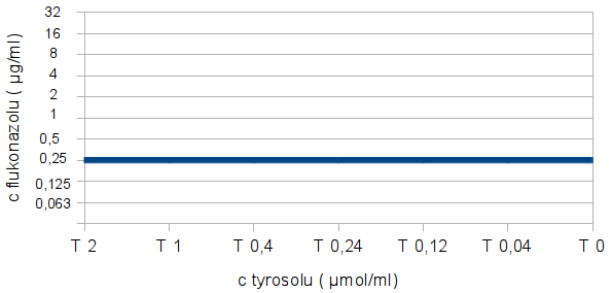
5.2.8 Klinické izoláty – ústa



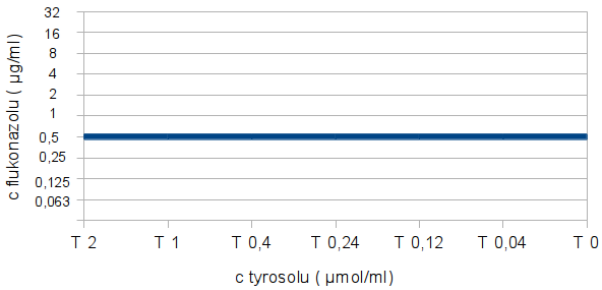
Obr. 72: Interakce FLZ a T - vzorek 6, dáseň: Za přítomnosti tyrosolu o koncentraci 0,24 µmol/ml a vyšší došlo k mírnému zvýšení MIC.



Obr. 73: Interakce FLZ a T - vzorek 18, ústa: Nedošlo ke změně MIC.

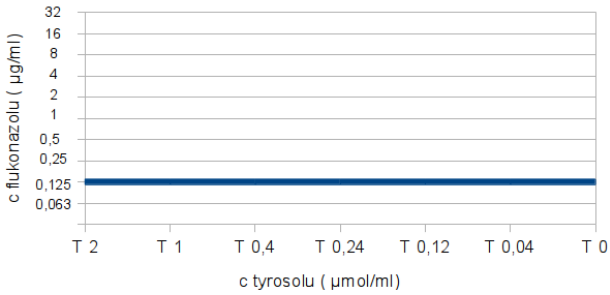


Obr. 74: Interakce FLZ a T - vzorek 26, ústa: Nedošlo ke změně MIC.

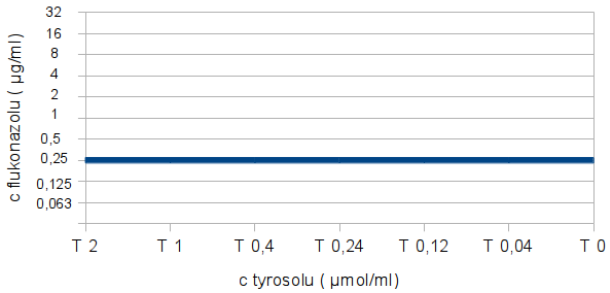


Obr. 75: Interakce FLZ a T - vzorek 37, ústa: Nedošlo ke změně MIC.

5.2.9 Klinické izoláty – plíce

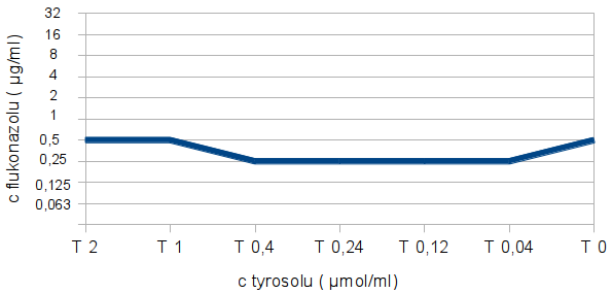


Obr. 76: Interakce FLZ a T - vzorek 28, plíce: Nedošlo ke změně MIC.

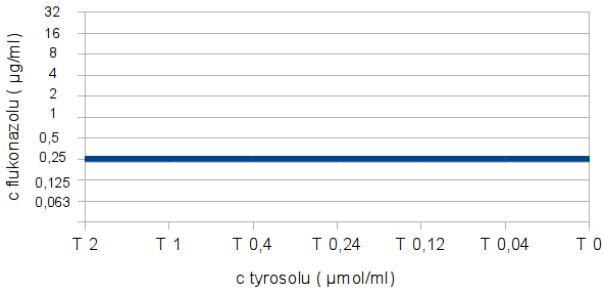


Obr. 77: Interakce FLZ a T - vzorek 17, plíce: Nedošlo ke změně MIC.

5.2.10 Klinické izoláty – rektum

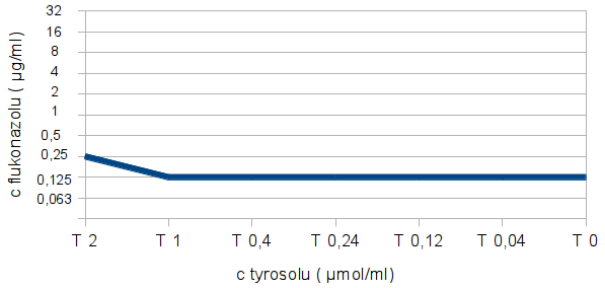


Obr. 78: Interakce FLZ a T - vzorek 22, rektum: Za přítomnosti tyrosou v koncentracích 0,4-0,04 µmol/ml došlo k mírnému snížení MIC.

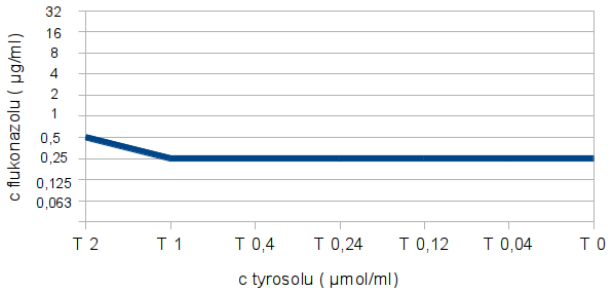


Obr. 79: Interakce FLZ a T - vzorek 25, rektum: Nedošlo ke změně MIC.

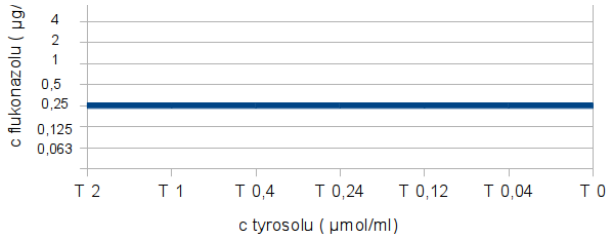
5.2.11 Klinické izoláty – moč



Obr. 80: Interakce FLZ a T - vzorek 7, moč: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.

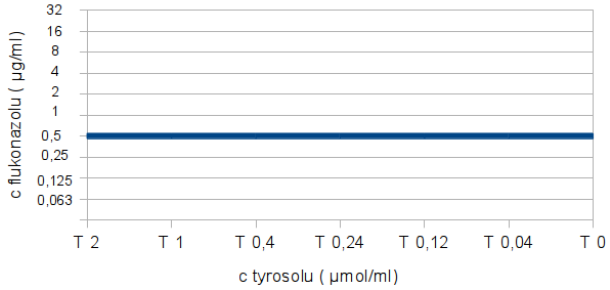


Obr. 81: Interakce FLZ a T - vzorek 20, moč: Za přítomnosti tyrosolu v koncentraci 2 µmol/ml došlo k mírnému zvýšení MIC.



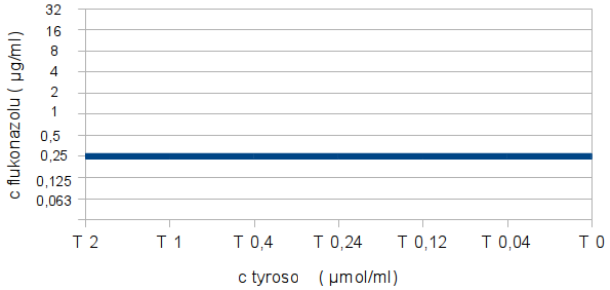
Obr. 82: Interakce FLZ a T - vzorek 31, moč: Nedošlo ke změně MIC.

5.2.12 Klinické izoláty – nekrotická kost



Obr. 83: Interakce FLZ a T - vzorek 8, nekrotická kost: Nedošlo ke změně MIC.

5.2.13 Klinické izoláty – centrální žilní katetr



Obr. 84: Interakce FLZ a T - vzorek 36, centrální žilní katetr: Nedošlo ke změně MIC.

5.2.14 Shrnutí pro všechny kmeny

Změna MIC antimykotika je hodnocena následovně:

změna o 1 stupeň ředění – mírná změna

změna o 2 stupně ředění – střední změna

změna o 3 a více stupňů ředění – výrazná změna

Při použití flukonazolu byly u 40 vzorků stejných kmenů jako v případě amfotericinu zjištěny následující výsledky:

U osmi kmenů se MIC zvýšila při použití nejvyšší a dalších koncentrací tyrosolu, z toho u jednoho kmene došlo ke střednímu zvýšení MIC flukonazolu.

U tří kmenů došlo při použití nejvyšší koncentrace tyrosolu ke snížení MIC.

U čtyř kmenů se MIC snížila při některé nižší koncentraci tyrosolu, ale při nejvyšší koncentraci zůstala stejná jako kontrolní MIC.

Jeden kmen reagoval na nejvyšší koncentraci tyrosolu zvýšením MIC, ale na některé nižší koncentrace snížením MIC.

Dvacet čtyři kmenů zůstalo oproti kontrole beze změny.

Graf 2: Změna MIC flukonazolu v závislosti na přítomnosti tyrosolu

5.3 Shrnutí pro obě antimykotika

Pět kmenů reagovalo změnou MIC u obou antimykotik.

Tři z těchto kmenů (vzorky 23, 39 a 40) reagovaly na obě antimykotika stejným způsobem – vzorek 23 (pochva) zvýšením MIC, vzorky 39 (TAS) a 40 (nosohltan) snížením MIC.

Dva kmeny reagovaly různou změnou MIC u obou antimykotik. Vzorek 7 (moč) vykázal sníženou MIC amfotericinu B a zvýšenou MIC flukonazolu. Vzorek 13 (BAL) vykázal zvýšenou MIC amfotericinu B a sníženou MIC flukonazolu.

6 Diskuze

Kvasinka *Candida albicans* je prvním eukaryotním organismem, u kterého byla prokázána mezibuněčná komunikace (quorum sensing). Dosud jsou u *Candida albicans* objeveny dvě quorum sensing molekuly, a to farnesol a tyrosol. Farnesol brání přechodu kvasinky do vláknitého stavu a tvorbě biofirmu. Tyrosol urychluje, ale sám nepůsobí přechod kvasinky do vláknitého stádia.

V této práci jsme sledovali jeho vliv na buňky *Candida albicans* v kombinaci s vlivem antimykotických látek, amfotericinu B a flukonazolu.

Mechanismus účinku obou zvolených antimykotik spočívá v působení na buněčnou stěnu. Flukonazol inhibuje tvorbu ergosterolu, který je potřebný pro správnou funkci membrány, zatímco amfotericin B se začleňuje do již vytvořené membrány a tvoří póry, kterými unikají živiny.

Protože tyrosol působí na přechod *Candida albicans* z kvasinkové do vláknité formy, ale není známo, že by měl vliv na stavbu buněčné stěny, předpokládali jsme žádný nebo jen malý vliv na účinek antimykotik.

Testovali jsme celkem čtyřicet kmenů – čtyři sbírkové kmeny a 36 klinických izolátů z pochvy, bronchoalveolární laváže, tracheálního aspirátu, plic, hrtanu, nosohltanu, sputa, úst, moče, rekta, nekrotické kosti a centrálního žilního katetru.

Pro test jsme zvolili modifikovanou mikrodiluční metodu, tzv. chess broth metodu, kdy se k suspenzi buněk v jamkách mikrotitrační destičky titrují koncentrační řady antimykotika a tyrosolu tak, aby byly v jamkách kombinace různých koncentrací obou látek.

Destičky po kultivaci jsme hodnotili vizuálně. Jako minimální inhibiční koncentraci (MIC) antimykotika jsme určili nejnižší koncentraci, při jejíž přítomnosti nedošlo k žádnému nárůstu buněk, pokud šlo o amfotericin B, nebo při jejíž přítomnosti došlo k polovičnímu nárůstu oproti jamce bez testovaných látek, pokud jsme testovali flukonazol.

Během experimentální části nedošlo k žádné změně MIC v 70 % případů (28 kmenů) při použití amfotericinu B a v 60 % případů (24 kmenů) při použití flukonazolu. V ostatních případech došlo ke změně MIC o jeden stupeň ředění antimykotika, což

hodnotíme jako mírnou změnu. Tu považujeme za statisticky nevýznamnou, nemůžeme u ní vyloučit ani nepřesnosti při pipetování.

K výraznější změně došlo pouze u jednoho vzorku při použití flukonazolu, kdy se MIC zvýšila o dva stupně ředění. Vzhledem k zatím nedokonale prozkoumaným účinkům tyrosolu na *Candida albicans* se nedá říci, co tuto reakci způsobilo, nedá se vyloučit chyba při testování tohoto kmene.

Převaha kmenů, u nichž se neprojevil žádný viditelný účinek tyrosolu, a nevýrazná reakce dalších kmenů potvrzuje naši hypotézu a souhlasí s výsledky studie Alem, Oteef et al., 2006. Tato studie sledovala vliv tyrosolu a farnesolu na tvorbu biofilmů u *Candida albicans* a ukázala, že tyrosol neměl na míru nárůstu buněk vliv. Jediným jeho prokazatelným účinkem byl vyšší podíl buněk ve vláknité fázi, a to pouze v počátečních stádiích růstu.

Je možné, že by se tento vliv tyrosolu mohl projevit i v našem experimentu, ale tato práce nesledovala morfologii buněk v průběhu testu a tudíž tuto teorii nemůžeme potvrdit.

Práce Landové (2011) sledovala vliv farnesolu na MIC amfotericinu B a flukonazolu. Farnesol, který je druhou známou quorum sensing molekulou *Candida albicans*, blokuje tvorbu nových klíčních hyf a tvorbu biofilmu. Práce Landové prokázala, že v přítomnosti farnesolu se snižuje MIC amfotericinu B a zvyšuje MIC flukonazolu.

Není ale prokázáno, že by tyrosol přímo podporoval tvorbu klíčních hyf, zatím je známo jen tolik, že urychluje jejich růst. To tyrosol odlišuje od farnesolu a vysvětluje, proč v experimentu nevykazuje opačné výsledky než farnesol.

Pouze pět kmenů v naší práci reagovalo změnou MIC u obou antimykotik, přičemž tyto reakce byly rozmanité – u dvou kmenů došlo v obou případech ke snížení MIC, u jednoho kmene ke zvýšení. Zbývající dva kmeny reagovaly na každé antimykotikum odlišně. Různost výsledků naznačuje, že efekt tyrosolu na MIC pravděpodobně nesouvisí s mechanismem účinku daného antimykotika

Naše práce ukazuje, že vliv exogenně přidaného tyrosolu na působení amfotericinu B a flukonazolu u kvasinky *Candida albicans* není významný.

7 Závěr

V této práci jsme se zabývali kvasinkou *Candida albicans*, její signální molekulou tyrosolem urychlující přechod do vláknité fáze a vlivem tyrosolu na minimální inhibiční koncentraci dvou antimykoticky působících látek, amfotericinu B a flukonazolu.

Modifikovanou mikrodiluční metodou jsme otestovali vliv různých koncentrací tyrosolu na antimykotika u celkem čtyřiceti kmenů.

Výsledky naší práce ukazují, že u nadpoloviční většiny testovaných kmenů nedošlo k žádné změně MIC antimykotik za přítomnosti tyrosolu. Žádnou změnu nevykázalo 70 % kmenů za použití amfotericinu B a 60 % kmenů za použití flukonazolu.

Jeden kmen při testování s flukonazolem vykázal zvýšení MIC o dva stupně ředění za přítomnosti vyšších koncentrací tyrosolu. Zbylé kmeny u obou antimykotik reagovaly mírnou změnou MIC, tzn. o jeden stupeň ředění. Celkově je možno vliv exogenně přidaného tyrosolu na testované kmeny označit za málo výrazný. To odpovídá předchozím studiím vlivu tyrosolu, zejména práci Alem, Oteef et al., 2006, která nezjistila žádný vliv tyrosolu na nárůst buněčných kolonií *Candida albicans*.

Tyrosol je molekula, jejíž působení ještě zdaleka není plně objasněno, ale tato práce prokazuje, že vliv na působení antimykotik není jeho významným účinkem.

K případnému využití tyrosolu v terapii je potřeba objasnit plně jeho mechanismus účinku, což, jak doufáme, bude předmětem dalších studií.

8 Seznam použité literatury

1. *web 1: Candida albicans* tyrosol biosynthesis. *Candida Genome Database* [online]. [2014] [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: http://pathway.candidagenome.org/CALBI/NEW-IMAGE?object=PWY3O-4108

2. web 2: Tyrosol. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. *ChemSpider* [online]. 2013 [cit. 2013-10-24]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9964.html

3. web 3: Farnesol. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. *ChemSpider* [online]. 2014 [cit. 2014-02-28]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3210.html

4. web 4: Amphotericin B. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem* [online]. [2009] [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280965

5. web 5: Fluconazole. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem* [online]. [2009] [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=134337918&viewopt=PubChem#x27

6. web 6: Sabouraud Dextrose Agar: Technical Data. In: *Himedia* [online]. 2011 [cit. 2014-01-05]. Dostupné z: http://himedialabs.com/TD/M063.pdf

7. web 7: RPMI-1640 Media Formulation. *Sigma-Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2014-01-29]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/rpmi-1640.html

8. ALEM, M. A. S., M. D. Y. OTEEF, T. H. FLOWERS a L. J. DOUGLAS. Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell* [online]. 2006-10-09, vol. 5, issue 10, s. 1770-1779 [cit. 2014-01-07]. DOI: 10.1128/EC.00219-06. Dostupné z: http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00219-06

9. ATHAR, M. A., and H. L. WINNER. 1971. The development of resistance by *Candida albicans* to polyene antibiotics in vitro. *J. Med. Microbiol*. 4:505-517.

10. BISWAS, S., P. VAN DIJCK, A. DATTA a L. J. DOUGLAS. Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of Candida albicans. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007-06-06, vol. 71, issue 2, s. 348-376 [cit. 2014-01-07]. DOI: 10.1128/MMBR.00009-06. Dostupné z: http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00009-06

11. BREJTBURG, Janina et al. Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action. *Antimicrobial Agents ans Chemotherapy.* 1990, roč. 34, č. 2.

12. CHEN, Hao, Masaki FUJITA, Qinghua FENG, Jon CLARDY a Gerald R. FINK. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2004 [cit. 2013-10-6]. Dostupné z: http://www.pnas.org/content/101/14/5048.full

13. CHIANG, Hsiu-Mei, Yin-Chih CHIEN, Chieh-Hsi WU, Yueh-Hsiung KUO, Wan-Chen WU, Yu-Yun PAN, Yu-Han SU a WEN. Hydroalcoholic extract of Rhodiola rosea L. (Crassulaceae) and its hydrolysate inhibit melanogenesis in B16F0 cells by regulating the CREB/MITF/tyrosinase pathway. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2014, vol. 65, s. 129-139 [cit. 2014-04-03]. DOI: 10.1016/j.fct.2013.12.032. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691513008545

14. CREMER, J. et al. 2,4-(hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by Candida spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. *PubMed* [online]. 1999 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933927?dopt=Abstract

15. COVAS, M.I., E. MIRÓ-CASAS a M. FITÓ. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under experimental and clinical research*. 2003, č. 5.

16. DOSEDĚL, Martin, Jiří VLČEK a Josef MALÝ. Lékové interakce statinů, jejich klinická závažnost a management. *Remedia*. 2011, roč. 2011, č. 5.

17. GALE, E. F. 1986. Nature and development of phenotypic resistance to amphotericin B in Candida albicans. *Adv. Microb. Physiol*. 27:278-320.

18. GREENWOOD, David, Richard C. SLACK a John F. PEUTHERER. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění : patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie.* 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-716-9365-0.

19. HAMILTON-MILLER J. M. T. 1972. Sterols from polyene-resistant mutants of Candida albicans. *J. Gen. Microbiol*. 73:201-203.

20. HERVE, M., J. C. DUBOUZY, E. BOROWSKI, B. CYBULSKA, and C. M. GARY-BOBO. 1989. The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. a 31 P-NMR study*. Biochim. Biophys. Acta* 980:261-272.

21. HORNBY, J. M., E. C. JENSEN, A. D. LISEC, J. J. TASTO, B. JAHNKE, R. SHOEMAKER a K. W. NICKERSON. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001-07-01, vol. 67, issue 7, s. 2982-2992 [cit. 2014-02-27]. DOI: 10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001. Dostupné z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001

22. HORNBY, J. M., B. W. KEBAARA a K. W. NICKERSON. Farnesol Biosynthesis in *Candida albicans*: Cellular Response to Sterol Inhibition by

Zaragozic Acid B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2003-07-01, vol. 47, issue 7, s. 2366-2369 [cit. 2014-03-03]. DOI: 10.1128/AAC.47.7.2366-2369.2003. Dostupné z: http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.47.7.2366-2369.2003

23. HUBE, B., SANGLARD, D., ODDS, F.C., HESS, D., MONOD, M., SCHAFER, W., BROWN, A.J., GOW, N.A. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infection and Immunity* 1997;65:3529-38.

24. HUBE, B., RUCHEL, R., MONOD, M., SANGLARD, D., ODDS, F.C. Functional aspects of secreted Candida proteinases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1998;436:339-44.

25. HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie díl VII/b: Protiinfekční léčiva.* Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0657-7

26. JEDLIČKOVÁ, Anna. *Systémové mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2006, 130 s. ISBN 80-734-5101-8.

27. JÍLEK, Petr, Vladimír BUCHTA, Petra KUBANOVÁ a Miroslav FÖRSTL. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví.* Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0459-0.

28. KOĎOUSEK, Rostislav. *Mykózy: lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0649-7.

29. KULÍKOVÁ, Zuzana. Kožní mykózy. *Postgraduální medicína* [online]. 2007, č. 5 [cit. 2014-03-17].
Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/kozni-mykozy-304610

30. LANDOVÁ, Radka. *Vliv quorum sensing molekul na minimální inhibiční koncentrace vybraných antimykotik*. Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta.

31. LO, H. J., KOHLER, J. R., DIDOMENICO, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous C. albicans mutansmutants are avirulent. Cell 90,939- 49.

32. MADHANI, Hiten D. a Joseph HEITMAN. Quorum Sensing in Fungi: Q. *PLoS Pathogens*. 2011-10-27, vol. 7, issue 10, e1002301-. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002301.

33. RAMAGE, G., S. P. SAVILLE, B. L. WICKES, J. L. LOPEZ-RIBOT, B. JAHNKE, R. SHOEMAKER, P. DUSSAULT a K. W. NICKERSON. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002-11-01, vol. 68, issue 11, s. 5459-5463. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002, 12954333.

34. RANDHAWA, Muhammad Akram. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Inhibits the Germination of *Candida albicans* and the Arthrospores of Trichophyton mentagrophytes. *Japanese journal of medical mycology*. 2008, č. 49.

35. SAMUEL, Samson Mathews, Mahesh THIRUNAVUKKARASU, Suresh Varma PENUMATHSA, Debayon PAUL a Nilanjana MAULIK. Akt/FOXO3a/SIRT1-Mediated Cardioprotection by n -Tyrosol against Ischemic Stress in Rat in Vivo Model of Myocardial Infarction: Switching Gears toward Survival and Longevity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008-10-22, roč. 56, č. 20, s. 9692-9698 [cit. 2014-01-28]. DOI: 10.1021/jf802050h.

36. SCHLEPIN, R. Quorum sensing in Candida albicans: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chemistry & Biology.* 2003, roč. 10, č. 8. 12954333.

37. SEMGHINI, C.P., J.M. HORNBY, R. DUMITRU, K.W. NICKERSON a S.D. HARRIS. Farnesol-induced apoptosis in Aspergillus nidulans reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular Microbiology*. 2006, č. 3.

38. STAAB, J.F,. BRADWAY S.D., FIDEL P.L., SUNDSTROM P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999;283:1535-8.

39. ST-LAURENT-THIBAULT, C., M. ARSENEAULT, F. LONGPRE a M. RAMASSAMY. Tyrosol and Hydroxytyrosol Two Main Components of Olive Oil, Protect N2a Cells Against Amyloid-β-Induced Toxicity. Involvement of the NF-κB Signaling. *Bentham Science Publishers* [online]. 2011, roč. 8, č. 5 [cit. 2013-10-23]. DOI: 10.2174/156720511796391845.

40. SUCHOPÁR, Josef et al. *Remedia Compendium*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Panax, 1997, xxxxii, 663 s. ISBN 80-902-1263-8.

41. TUCK, Kellie L., Matthew P. FREEMAN, Peter J. HAYBALL, Graham L. STRETCH a Ieva STUPANS. The In Vivo Fate of Hydroxytyrosol and Tyrosol, Antioxidant Phenolic Constituents of Olive Oil, after Intravenous and Oral Dosing of Labeled Compounds to Rats. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001 [cit. 2013-11-09].

42. VOTAVA, Martin a Jiří SLÍVA. Antimykotika. *Medicabáze.cz* [online]. 2010 [cit. 2013-12-28].
Dostupné z: http://www.medicabaze.cz/?&sec=term_detail&termId=3020&tname=Antimykotika

43. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.

44. YANG, Y. L. Virulence factors of Candida albicans. *Journal of microbiology*, immunology and infection. 2003, č. 36, s. 223-228.

45. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd ed., M27-A2.**.** 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

9 Seznam obrázků a grafů

Graf 1: Změna MIC amfotericinu B v závislosti na přítomnosti tyrosolu 47
Graf 2: Změna MIC flukonazolu v závislosti na přítomnosti tyrosolu 60

Obr. 1: Vzorec tyrosolu 13
Obr. 2: Vzorec farnesolu 14
Obr. 3: Vzorec amfotericinu B 21
Obr. 4: Vzorec flukonazolu (FLZ) 23
Obr. 5: Interakce AMB a T - kmen 8712..... 34
Obr. 6: Interakce AMB a T - kmen 25 580..... 34
Obr. 7: Interakce AMB a T - kmen 10 231..... 34
Obr. 8: Interakce AMB a T - kmen 25 188..... 35
Obr. 9: Interakce AMB a T - vzorek 9, akutní zánět pochvy 35
Obr. 10: Interakce AMB a T - vzorek 11, chronický zánět pochvy..... 35
Obr. 11: Interakce AMB a T - vzorek 12, hnis z pochvy 36
Obr. 12: Interakce AMB a T - vzorek 23, pochva 36
Obr. 13: Interakce AMB a T – vzorek 10, BAL. 36
Obr. 14: Interakce AMB a T - vzorek 13, BAL. 37
Obr. 15: Interakce AMB a T - vzorek 14, BAL 37
Obr. 16: Interakce AMB a T- vzorek 32, BAL 37
Obr. 17: Interakce AMB a T - vzorek 33, TAS. 37
Obr. 18: Interakce AMB a T - vzorek 38, TAS. 38
Obr. 19: Interakce AMB a T - vzorek 39, TAS 38
Obr. 20: Interakce AMB a T - vzorek 5, hrtan..... 38
Obr. 21: Interakce AMB a T - vzorek 15, hrtan..... 39
Obr. 22: Interakce AMB a T - vzorek 30, hrtan..... 39
Obr. 23: Interakce AMB a T - vzorek 34, hrtan..... 39
Obr. 24: Interakce AMB a T - vzorek 19, nosohltan. 39
Obr. 25: Interakce AMB a T - vzorek 21, nosohltan. 40
Obr. 26: Interakce AMB a T - vzorek 29, nosohltan. 40
Obr. 27: Interakce AMB a T - vzorek 40, nosohltan 40
Obr. 28: Interakce AMB a T - vzorek 16, sputum. 41
Obr. 29: Interakce AMB a T - vzorek 24, sputum 41

Obr. 30: Interakce AMB a T - vrozek 27, sputum. 41
Obr. 31: Interakce AMB a T - vzorek 35, sputum. 41
Obr. 32: Interakce AMB a T - vzorek 6, dáseň 42
Obr. 33: Interakce AMB a T - vzorek 18, ústa. 42
Obr. 34: Interakce AMB a T - vzorek 26, ústa. 42
Obr. 35: Interakce AMB a T - vzorek 37, ústa. 43
Obr. 36: Interakce AMB a T - vzorek 28, plíce. 43
Obr. 37: Interakce AMB a T - vzorek 17, plíce. 43
Obr. 38: Interakce AMB a T - vzorek 25, rektum. 44
Obr. 39: Interakce AMB a T - vzorek 22, rektum. 44
Obr. 40: Interakce AMB a T - vzorek 7, moč 44
Obr. 41: Interakce AMB a T - vzorek 20, moč. 45
Obr. 42: Interakce AMB a T- vzorek 31, moč. 45
Obr. 43: Interakce AMB a T - vzorek 8, nekrotická kost 45
Obr. 44: Interakce AMB a T - vzorek 36, centrální žilní katetr 46
Obr. 45: Interakce FLZ a T - kmen 8712. 48
Obr. 46: Interakce FLZ a T - kmen 25 580. 48
Obr. 47: Interakce FLZ a T - kmen 10 231. 48
Obr. 48: Interakce FLZ a T - kmen 25 188. 48
Obr. 49: Interakce FLZ a T - vzorek 9, akutní zánět. 49
Obr. 50: Interakce FLZ a T - vzorek 11, chronický zánět 49
Obr. 51: Interakce FLZ a T - vzorek 12, hnis z pochvy 49
Obr. 52: Interakce FLZ a T - vzorek 23, pochva. 50
Obr. 53: Interakce FLZ a T - vzorek 10, BAL. 50
Obr. 54: Interakce FLZ a T - vzorek 13, BAL 50
Obr. 55: Interakce FLZ a T - vzorek 14, BAL 51
Obr. 56: Interakce FLZ a T - vzorek 32, BAL. 51
Obr. 57: Interakce FLZ a T - vzorek 32, TAS. 51
Obr. 58: Interakce FLZ a T - vzorek 38, TAS. 52
Obr. 59: Interakce FLZ a T - vzorek 39, TAS. 52
Obr. 60: Interakce FLZ a T - vzorek 5, hrtan 52
Obr. 61: Interakce FLZ a T - vzorek 15, hrtan 52
Obr. 62: Interakce FLZ a T - vzorek 30, hrtan. 53
Obr. 63: Interakce FLZ a T - vzorek 34, hrtan. 53

Obr. 64: Interakce FLZ a T - vzorek 19, nosohltan..... 53
Obr. 65: Interakce FLZ a T - vzorek 21, nosohltan..... 54
Obr. 66: Interakce FLZ a T - vzorek 29, nosohltan..... 54
Obr. 67: Interakce FLZ a T - vzorek 21, nosohltan..... 54
Obr. 68: Interakce FLZ a T - vzorek 16, sputum 55
Obr. 69: Interakce FLZ a T - vzorek 24, sputum. 55
Obr. 70: Interakce FLZ a T - vzorek 27, sputum 55
Obr. 71: Interakce FLZ a T - vzorek 35, sputum. 55
Obr. 72: Interakce FLZ a T - vzorek 6, dáseň. 56
Obr. 73: Interakce FLZ a T - vzorek 18, ústa. 56
Obr. 74: Interakce FLZ a T - vzorek 26, ústa. 56
Obr. 75: Interakce FLZ a T - vzorek 37, ústa. 56
Obr. 76: Interakce FLZ a T - vzorek 28, plíce..... 57
Obr. 77: Interakce FLZ a T - vzorek 17, plíce..... 57
Obr. 78: Interakce FLZ a T - vzorek 22, rektum. 57
Obr. 79: Interakce FLZ a T - vzorek 25, rektum. 58
Obr. 80: Interakce FLZ a T - vzorek 7, moč. 58
Obr. 81: Interakce FLZ a T - vzorek 20, moč. 58
Obr. 82: Interakce FLZ a T - vzorek 31, moč 58
Obr. 83: Interakce FLZ a T - vzorek 8, nekrotická kost 59
Obr. 84: Interakce FLZ a T - vzorek 36, centrální žilní katetr 59

10 Přílohy

Příloha č.1 - Složení RPMI 5x koncentrovaného v g/l

Dusičnan vápenatý.3H2O.....0,5
L-glutamin..... 1,5
Cholin 0,015
Glutation..... .0,005
I- inositol..... .0,175
Glycin..... .0,05
Kyselina listová.....0,005
L-histidin HCl.H2O.....0,102
PABA..... 0,005
L-hydroxyprolin.....0,1
Niacin amid..... 0,005
L-isoleucin..... .0,25
D-Ca-kyselina pantotenová.....0,00125
Kyselina asparagová..... 0,1
Pyridoxin hydrochlorid..... 0,005
Kyselina glutamová..... 0,1
Riboflavin..... .0,001
L- leucin..... 0,25
Thiamin hydrochlorid..... 0,005
L-lysin hydrochlorid..... 0,2
D-glukosa..... 10,0
L- metionin..... 0,075
Fenol..... .0,05
L- fenylalanin.....0,075
L- prolin..... 0,1
Chlorid draselný..... 2,0
L- serin..... 0,15
Fosforečnan sodný bezvodý.....5,015
L-treonin..... 0,1
Síran hořečnatý.7H2O.....0,5
L- tryptofan..... 0,025
Chlorid sodný..... 30,0
L- tyrosin..... 0,1
L-arginin hydrochlorid.....1,21
L- valin..... .0,1
L-asparagin monohydrát.....0,27
Biotin..... 0,001
L-cystein..... 0,25
Kyanokobalamin.....0,000025

Příloha č.2 - Seznam kmenů

Sbírkové kmeny:	8712
	25580
	10231
	25188
Hrtan:	Vzorky č. 5, 15, 30, 34
Ústa:	Vzorky č 6 (dáseň), 18, 26, 37
Moč:	Vzorky č. 7, 20, 31
Nekrotická kost:	Vzorek č. 8
Pochva:	Vzorky č 9 (akutní zánět pochvy), 11 (chronický zánět pochvy), 23 (pochva), 12 (hnis z pochvy)
Bronchoalveolární laváž:	Vzorky č. 10, 13, 14, 32
Sputum:	Vzorky č. 16, 24, 27, 35
Plíce:	Vzorky č. 17, 28
Nosohltan:	Vzorky č. 19, 21, 29, 40
Rektum:	Vzorky č. 22, 25
Tracheální aspirát:	Vzorky č. 33, 38, 39
Centrální žilní katetr:	Vzorek č. 36

Příloha č.3 – Schéma mikrotitrační destičky

B – buněčná suspenze, ATM – antimykotikum, T – prosol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATM 32 T 2 B	ATM 16 T 2 B	ATM 8 T 2 B	ATM 4 T 2 B	ATM 2 T 2 B	ATM 1 T 2 B	ATM 0,5 T 2 B	ATM 0,25 T 2 B	ATM 0,125 T 2 B	ATM 0,063 T 2 B	ATM 0 T 2 B	ATM 0 T 2 0
B	ATM 32 T 1 B	ATM 16 T 1 B	ATM 8 T 1 B	ATM 4 T 1 B	ATM 2 T 1 B	ATM 1 T 1 B	ATM 0,5 T 1 B	ATM 0,25 T 1 B	ATM 0,125 T 1 B	ATM 0,063 T 1 B	ATM 0 T 1 B	ATM 0 T 1 0
C	ATM 32 T 0,4 B	ATM 16 T 0,4 B	ATM 8 T 0,4 B	ATM 4 T 0,4 B	ATM 2 T 0,4 B	ATM 1 T 0,4 B	ATM 0,5 T 0,4 B	ATM 0,25 T 0,4 B	ATM 0,125 T 0,4 B	ATM 0,063 T 0,4 B	ATM 0 T 0,4 B	ATM 0 T 0,4 0
D	ATM 32 T 0,24 B	ATM 16 T 0,24 B	ATM 8 T 0,24 B	ATM 4 T 0,24 B	ATM 2 T 0,24 B	ATM 1 T 0,24 B	ATM 0,5 T 0,24 B	ATM 0,25 T 0,24 B	ATM 0,125 T 0,24 B	ATM 0,063 T 0,24 B	ATM 0 T 0,24 B	ATM 0 T 0,24 0
E	ATM 32 T 0,12 B	ATM 16 T 0,12 B	ATM 8 T 0,12 B	ATM 4 T 0,12 B	ATM 2 T 0,12 B	ATM 1 T 0,12 B	ATM 0,5 T 0,12 B	ATM 0,25 T 0,12 B	ATM 0,125 T 0,12 B	ATM 0,063 T 0,12 B	ATM 0 T 0,12 B	ATM 0 T 0,12 0
F	ATM 32 T 0,04 B	ATM 16 T 0,04 B	ATM 8 T 0,04 B	ATM 4 T 0,04 B	ATM 2 T 0,04 B	ATM 1 T 0,04 B	ATM 0,5 T 0,04 B	ATM 0,25 T 0,04 B	ATM 0,125 T 0,04 B	ATM 0,063 T 0,04 B	ATM 0 T 0,04 B	ATM 0 T 0,04 0
G	ATM 32 T 0 B	ATM 16 T 0 B	ATM 8 T 0 B	ATM 4 T 0 B	ATM 2 T 0 B	ATM 1 T 0 B	ATM 0,5 T 0 B	ATM 0,25 T 0 B	ATM 0,125 T 0 B	ATM 0,063 T 0 B	ATM 0 T 0 B	ATM 0 T 0 0
H	ATM 32 T 0 0	ATM 16 T 0 0	ATM 8 T 0 0	ATM 4 T 0 0	ATM 2 T 0 0	ATM 1 T 0 0	ATM 0,5 T 0 0	ATM 0,25 T 0 0	ATM 0,125 T 0 0	ATM 0,063 T 0 0	ATM 0 T 0 0	ATM 0 T 0 0