

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Studium interakcí quorum sensing látek s kvasinkami I

Diplomová práce

Hradec Králové, 2009

Jitka MACKOVÁ

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVÉ

Department of Biological and Medical Sciences

Study of interactions of quorum sensing with yeasts. Part I

Diploma thesis

Hradec Králové, 2009

Jitka MACKOVÁ

PODĚKOVÁNÍ

Za odborné vedení, pomoc a cenné rady bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., dále děkuji Ing. Lucii Křivčíkové za cenné rady a odborné vedení v laboratoři, studentce Joaně Lopez za spolupráci při měření výsledků a laborantce Idě Dufkové za technickou pomoc v laboratoři.

Práce byla podpořena Centrem základního výzkumu č. LC531 MŠMT.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium interakcí quorum sensing látek s kvasinkami I“ vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Vladimíra Buchty, CSc. a použila jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v bibliografii.

V Praze dne 15. května 2009

.....

PODPIS

Obsah

Souhrn.....	1
Abstract.....	2
Seznam zkratk.....	3
1. Úvod	4
2. Teoretická část	5
2.1 Houby jako původci onemocnění	5
2.2 <i>Candida albicans</i>	6
2.2.1 Popis a výskyt.....	6
2.2.2 Morfologie.....	6
2.2.3 Kandidóza.....	9
2.3 Mezibuněčná komunikace u kvasinek	11
2.3.1 Quorum sensing molekuly u prokaryot.....	12
2.3.2 Quorum sensing molekuly u eukaryot.....	12
2.3.3 Interakce mezi kvasinkami a bakteriemi	13
2.4 Farnesol	14
2.4.1 Struktura farnesolu, chemické a fyzikální vlastnosti.....	15
2.4.2 Tvorba farnesolu v buňce	16
2.4.3 Vliv farnesolu na morfolonii kvasinky <i>Candida albicans</i>	16
2.4.4 Účinky farnesolu na živočišné, houbové a rostlinné buňky	17
2.4.5 Vliv farnesolu na účinky antimykotik	18
2.5 Laboratorní diagnostika kvasinek	19
3. Praktická část	23
3.1 Kmeny	23
3.2 Média a chemikálie	23
3.2.1 Mykologické kultivační a testovací půdy.....	24
3.2.2 Příprava farnesolu.....	25

3.3 Metody	26
3.3.1 Test klíčních hyf.....	26
3.3.2 Modifikace testu klíčních hyf.....	26
4. Výsledky	32
4.1 Standardizace testu indukce klíčních hyf.....	32
4.2 Vliv farnesolu na tvorbu klíčních hyf	37
5. Diskuse	43
6. Závěr	46
7. Použitá literatura.....	47
8. Seznam obrázků.....	52
9. Seznam tabulek	52
10. Seznam příloh	53

Souhrn

Autor: Jitka Macková

Název: Studium interakcí quorum sensing látek s kvasinkami I

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Farmacie

Cíl práce:

Cílem diplomové práce je shrnout dosud publikované poznatky o quorum sensing v komunikaci kvasinky *Candida albicans*. Působení quorum sensing bylo studováno u farnesolu na modelu konverze blastospor v klíční hyfy *C. albicans*.

Metody:

Byly testovány čtyři kmeny *C. albicans*, z toho dva referenční a dva získané z pacientek s vulvovaginální kandidózou. K experimentálním účelům byla standardizována metoda indukce klíčních hyf pro hodnocení vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf, včetně možnosti testování vlivu preinkubace v přítomnosti nebo absenci farnesolu.

Výsledky:

Podmínky testu indukce klíčních hyf jsou rovnocenné v případě růstových médií SGA a YPD pro přípravu inokula. Pro indukci klíčních hyf se pro standardizaci pokusů ukázalo vhodnější indukční médium NYP než bovinní sérum při hustotě suspenze kvasinek 10^6 cfu/ml. Pokusy je vhodné provádět ve skleněných zkumavkách.

Test s farnesolem ukázal, že inhibice tvorby klíčních hyf závisí na vlastnostech kmene. Test s preinkubací s farnesolem neprokázal žádný vliv na tvorbu klíčních hyf.

Závěry:

Farnesol působil na buňky *C. albicans* kmenově specificky v závislosti na použitém indukčním médiu a jeho koncentraci.

Abstract

Author: Jitka Macková

Title: Study of interactions of quorum sensing with yeasts. Part I

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty Of Pharmacy in Hradec Králové

Study programme: Pharmacy

Background:

The aim of the work is to sum up findings about quorum sensing in *Candida albicans* communication. The quorum sensing effects were studied on farnesol on model of conversion of blastospores into germ tubes in *C. albicans*.

Methods:

Four strains of *C. albicans* were tested, two of them were from American Type Culture Collection and two were obtained from the patients suffering from vulvovaginal candidosis. The method of germ tube test was standardized to evaluate the farnesol effects on germ tube induction including the possibility for testing effects of preincubation in presence or absence of farnesol.

Results:

There was no significant difference in the production of germ tubes between Sabouraud glucose agar and YPD medium used for the preparation of inoculum. The chemically defined medium NYP provided more consistent results than bovine serum in terms of germ tube induction if the cell density of a yeast was 10^6 cfu/ml. It is better to hold experiments in test tubes made of glass than plastic.

Experiments with farnesol showed that germ tube inhibition was strain-dependent. Preincubation with farnesol had no effects on germ tube inhibition.

Conclusions:

The effect of farnesol on *C. albicans* was strain-specific and depended on composition of medium and on concentration used.

Seznam zkratek

BS	hovězí sérum (angl. bovine serum)
cfu	životaschopná jednotka tvořící kolonii (angl. colony forming unit)
GPP	glukozofosfátprolin
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NYP	indukční médium pro klíční hyfy (z angl. N-acetyl-glukosamine, yeast extract, proline)
PCR	polymerázová řetězcová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RPMI 1640	tkáňové médium (z angl. Roswell Park Memorial Institute medium)
SGA	Sabouraudův glukózový agar
YM agar	agar obsahující kvasnicový extrakt a maltózu (z angl. yeast malt)
YNB	kvasnično-dusíkatá báze (z angl. yeast nitrogen base)
YPD	médium obsahující kvasnicový extrakt, pepton a glukózu (angl. yeast, pepton, dextrose medium)

1. Úvod

Problematika terapie mykotických onemocnění je v dnešní době aktuální a naštěstí nepřehlížené téma. S pokrokem možností v oblasti zachytu, diagnostiky a léčby onemocnění způsobených houbami se objevují nové otázky týkající se životního cyklu hub a jejich interakcí s hostitelem. Do této oblasti patří například i problematika tvorby biofilmů.

Cílem rešeršní části diplomové práce je shromáždit poznatky o morfologických formách kvasinky *Candida albicans* a způsobu spuštění přeměny jedné morfologické formy v jinou. Quorum sensing představuje mechanismus komunikace mikroorganismů, díky kterému mohou koordinovaně reagovat změnou morfologie na počet buněk v dané lokalitě. Signál je zprostředkován malými molekulami, které buňky uvolňují do mezibuněčného prostoru. Jednou z quorum sensing molekul u *C. albicans* je farnesol.

Farnesol je pro *C. albicans* běžný metabolit. Pokud farnesol v okolí kvasinky dosáhne prahové koncentrace, kvasinka zůstává ve formě blastospor a nepřechází do stádia hyfy. Protože kvasinka se nachází v hyfálním stádiu hlavně v situaci, kdy je invazivní a způsobuje onemocnění - kandidózu, existuje hypotéza, že zabráněním přeměny na hyfu lze zmenšit patogenitu *C. albicans*. Prostředkem k „uzamčení“ kvasinky v morfologii blastospory by mohl být právě farnesol. Bohužel farnesol má na *C. albicans* komplexní účinky a patogeneze kvasinky není jednoduchý proces, proto je třeba zjistit více o mechanismu a účincích farnesolu.

Úkolem praktické části bylo standardizovat test indukce klíčnicích hyf za účelem testování účinků farnesolu na tvorbu klíčnicích hyf na čtyřech kmenech *C. albicans*. Protože *C. albicans* je jediná kvasinka tvořící klíčnicí hyfy v daných podmínkách do čtyř hodin, používá se tento test pro rychlý laboratorní průkaz této kvasinky. Naším úkolem bylo najít vhodné podmínky pro testování vlivu farnesolu s ohledem na variabilitu jednotlivých kmenů této kvasinky.

2. Teoretická část

2.1 Houby jako původci onemocnění

V říši hub můžeme najít mnoho rozmanitých forem jednobuněčných i mnohobuněčných organismů. Jsou kosmopolitní a využívají různé způsoby soužití s ostatními organismy od komenzálního, saprofytického až k parazitismu. Houby mohou způsobit onemocnění rostlin, živočichů i člověka. Choroby člověka mohou být způsobené jak parazitováním hub přímo v těle člověka nebo jejich přímým (alergie) nebo nepřímým kontaktem (mykotoxiny) s hostitelským organismem.

Onemocnění člověka způsobená houbami nejčastěji dělíme na mykózy, mykotoxikózy, mycetismy a mykoalergie. Jejich původci jsou většinou mikromycety, tzn. vláknité houby (plísňe) a kvasinky. Menší podíl na onemocněních člověka mají makromycety, což jsou houby, které tvoří typicky velké plodnice (např. hřib, muchomůrka).

Mykózy mají mezi onemocněními způsobených houbami nejdůležitější postavení. Způsobují infekční onemocnění postihující kůži a sliznice anebo hluboká onemocnění orgánová a systémová. Povrchová onemocnění jsou nejčastěji dermatofytózy, tinea nigra, černá a bílá píedra, pityriasis versicolor, kožní kandidózy a další. Z hlubokých mykóz sem náleží systémová kandidóza, aspergilóza, zygomykóza, chromoblastomykóza, endemické mykózy, mycetom a spousta dalších. Důležitost mykóz stoupá hlavně kvůli zvýšení cestovních možností, kdy se původně endemické druhy přenášejí mezi kontinenty. Dalším faktorem je užívání nových silně účinných léčiv a zákroků u širšího spektra pacientů. Léčiva ovlivňující imunitu jsou např. kortikoidy, širokospektrá antibiotika, cytostatika. Rizikové pacienti ohrožení mykózou jsou zejména pacienti po transplantaci, na jednotce intenzivní péče, chroničtí pacienti např. nemocní s cystickou fibrózou a se získaným syndromem imunodeficitu (AIDS).

Mykotoxikózy jsou vyvolané metabolickými produkty hub. Jsou to houbové intoxikace většinou vyvolané požitím plodnic makromycet (např. otrava muchomůrkou hlízovitou). Mezi mykotoxikózy patří též opakované otravy nízkými dávkami mykotoxinů uvolňovanými mikromycetami do okolí (např. aflatoxikóza), včetně napadených potravin.

Mykoalergie označuje přecitlivělost pacienta na houbové antigeny, hlavně na spórách. Projevují se podobně jako ostatní alergické reakce.

2.2 *Candida albicans*

2.2.1 Popis a výskyt

Candida albicans je kvasinka, jejíž soužití s obratlovci i s člověkem je velmi úzké. Je to komenzální organismus, u kterého se ovšem za určitých podmínek může zvýšit virulence a způsobit tak závažné onemocnění u vnímavého pacienta [2].

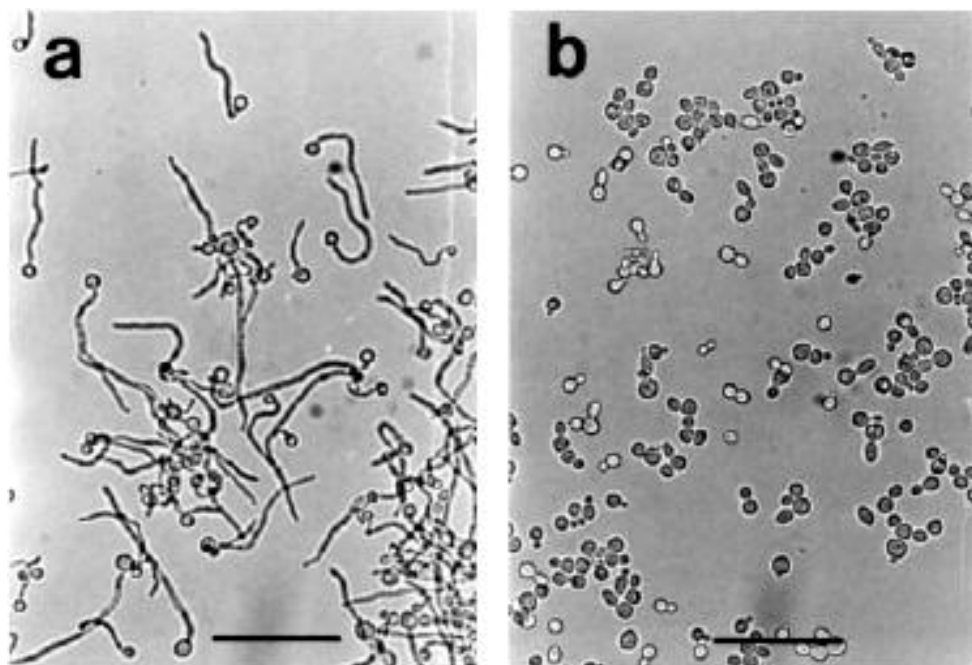
Candida albicans patří do říše *Fungi* (Houby), kmen *Mycophyta*, podkmen *Eumycetes* (Pravé houby), třída *Ascomycetes* (Vřeckaté houby), řád *Saccharomycetales* (Kvasinkotvaré), čeleď *Saccharomycetaceae* (Kvasinkovité), rod a druh *Candida albicans*.

Candida je kosmopolitní mikroskopická houba, v přírodě ji najdeme ojediněle v půdě, u člověka je součástí přirozené mikroflory na povrchu kůže a na viditelných sliznicích, např. v ústní dutině, na tonzilách, ve vagině i v gastrointestinálním traktu [8]. Roste také na arteficiálních površích přístrojů nebo jiných umělých těles, jako například zubní protézy, katetry, umělé cévky. Z toho vyplývá, že nález tohoto mykoorganismu u pacienta vždy neznamena průkaz původce onemocnění, dokonce ani, je-li prokázán ve větším množství. Za určitých podmínek však může dojít k překonání obranyschopnosti hostitele, zvláště při poklesu jeho odolnosti hostitele, za vzniku lokální nebo systémové někdy i život ohrožující mykózy [2].

2.2.2 Morfologie

Přechod ze saprofytického způsobu života k parazitickému je obvykle doprovázen změnou morfologie. *C. albicans* je polymorfní houba, což znamená, že existuje v několika morfo-fyziologických typech [2]. Kvasinkovité buňky blastospor jsou oválné či kulaté, velikosti 3-5 μm . Ty převládají při saprofytickém způsobu života. Pseudohyfy jsou protáhlé buňky tvořící řetízky. Pravé hyfy jsou také složené z více buněk, mají mezi sebou septa, ovšem nemají v místě sept konstrikcí, stěny zůstávají paralelní v celé délce hyfy a větvení je kolmé na buněčnou stěnu [6]. Méně častá, resistentní forma jsou chlamydospor. Jsou to větší silnostěnné buňky umístěné na koncích i po stranách hyf [2]. Nejlépe zdokumentovaná morfologická přeměna u kvasinek je konverze blastospor v hyfu. Hyfy se jeví jako mikroskopické rourky s nebo bez větví. Ke vzniku hyf je třeba, aby pučící buňka změnila růstový program na kontinuální vrcholový (apikální) růst klíční hyfy (angl. germ tubes), které se prodlužují a následovně mohou tvořit septa a větvit se. Pseudohyfy vznikají unipolárním

pučením a buňka zůstává připojená k matečné buňce [6]. Podstatou virulence *C. albicans* je schopnost koordinovaného přepínání mezi pučením a hyfálními stádii, které je spojeno se změnou virulence, invasivity růstu a schopností vyhnout se imunitnímu systému. Uvedené morfologické pochody jsou také důležité pro formování biofilmu.



Obr. 1. Morfologická stádia kvasinky *Candida albicans*. a. Hyfy b. Blastospory [20].

Candida albicans je sice jednobuněčný eukaryotní organismus, ovšem dokáže tvořit biofilmy, tzn. vysoce organizované povlaky složené z různých vrstev. Tyto biofilmy jsou z medicínského hlediska velmi důležité, protože mnohé kandidové infekce jsou asociované s tvorbou biofilmů na povrchu implantátů [5]. Biomateriály jako stenty, protézy (hlasivkové či srdeční chlopně, kolenní protézy), implantáty (čochky, prsní implantáty a zubní protézy), endotracheální trubice, pacemakery a různé typy katetrů jsou potenciálním cílem pro tvorbu biofilmů.

Biofilm kvasinky *C. albicans* tvoří na povrchu z umělých hmot blastospory, hyfy a pseudohyfy. Skládá se ze dvou odlišných vrstev. První je tenký bazální region z těsně zhuštěných blastospor, které kotví biofilm k povrchu. Druhá vrstva je tlustší, je složená hlavně ze zapletených hyf [1]. Tvorba biofilmu představuje pro mikroorganismy výhodnou adaptaci oproti samostatným buňkám. Zahrnuje obranu proti okolí, výhody v kolonizaci teritoria, přísun živin k buňkám, které to zrovna nejvíce potřebují, vznik subpopulací vysoce

odolných buněk a vznik buněk se specializovanými funkcemi [37]. Studie na kvasinkách z přírody potvrdily, že mohou produkovat extracelulární matrix.

Jednotlivě žijící kvasinky rostou jako blastospory, pokud mají vhodné podmínky pro růst, zejména dostatek živin a energetických zdrojů (cukry). Ke změně na tvorbu hyf je třeba vysoký poměr CO₂ k O₂, neutrální pH a omezené zdroje uhlíku a dusíku. Záleží také na růstovém mediu, blastospory se tvoří na mediích obohacených aminokyselinami a glukosou při kyselém pH. Induktorem růstu hyf je sérum [23], N-acetylglukosamin [41] nebo L-prolin [4]. Porovnání podmínek růstu a morfologie je shrnuto v tabulce 1.

Tab. 1. Vliv podmínek růstu na morfologii kvasinky *Candida albicans*.*

	Podmínky podporující růst blastospor	Podmínky podporující růst hyf
Medium	bohaté na živiny (2% roztok cukrů)	chudé na živiny; L-prolin; sérum; N-acetylglukosamin
pH	kyselé (4-6)	neutrální
Poměr CO₂ a O₂	aerobní růst	10% CO ₂ [21], anaerobie
Teplota	25°C	37°C
Hustota buněk	> 10 ⁶ cfu/ml	≤ 10 ⁶ cfu/ml

* upraveno podle [15,35].

Komunikace kvasinek může být zprostředkována nízkomolekulárními difuzibilními látkami, které se nazývají quorum sensing. Signalizaci na delší vzdálenosti mezi koloniemi zprostředkuje u *Candida mogii* těkavý amoniak [36]. Kvasinkové kolonie tvoří amoniak v pulsech, mezi nimiž je fáze acidifikace substrátu. Kvasinky alkalizují růstové medium, když hladovějí, tento signál se šíří do okolí a aktivuje buněčné mechanismy snižující stres u ostatních kolonií [36]. Tento způsob komunikace řídí i apoptózu jádra kolonie, pokud je stres příliš velký pro přežití všech buněk. Jádro kolonie sice odumře, ovšem okraje přežívají, expandují a profitují z živin získaných z odumřelých buněk.

Další druh komunikace mezi buňkami je quorum sensing. Je to jev, při kterém mikrobiální populace reaguje synchronizovaně prostřednictvím malých signálních molekul jako odpověď na změny v hustotě populace, které obvykle odrážejí změny prostředí. Tato komunikace byla širěji studována u bakterií a nyní se zájem výzkumníků přenesl i na kvasinky [38]. Quorum sensing molekuly umožňují mikroorganismům monitorovat jejich růst a kontrolovat jevy závislé na buněčné hustotě.

2.2.3 Kandidóza

Candida albicans je kosmopolitní kvasinka, která je součástí normální lidské mikroflory. Patří mezi oportunní houby, které jsou za běžných okolností saprofytické a teprve za určitých podmínek se stávají parazity, kteří mohou vážně ohrožovat zdraví a nezdědka i život postiženého. Změna kolonizující kvasinky na parazitující je složitý proces, na němž se podílejí tři hlavní faktory. Jednak jsou to celkový stav napadeného hostitele, dále vlastnosti vyvolávajícího kmene a konečně i podmínky prostředí, v němž se tento proces odehrává [2]. *Candida albicans* může způsobit onemocnění kandidózu, která je buď lokalizovaná nebo celková. Tato infekce vyvolaná nejčastěji kvasinkami rodu *Candida* postihuje především vlhké lokality jako sliznice nebo kůže.

Candida albicans je běžnou florou v ústní dutině, trávicím ústrojí, na genitálu a kůži, proto je někdy těžké rozhodnout, zda je její nálezn v lokalizacích známkou infekce nebo kolonizace. Kandidóza je častým onemocněním diabetiků a imunosuprimovaných pacientů, může se projevit při podávání systémových antibiotik, kortikosteroidů, cytostatik, v těhotenství, při užívání kontraceptiv. Někdy se označuje jako nemoc nemocných.

Rozlišujeme několik forem kandidózy. Známe slizniční, kožní a systémovou formu. Slizniční onemocnění je velmi časté, hlavní dvě lokalizace jsou ústa – orofaryngeální kandidóza a gynekologická lokalizace – vulvovaginální kandidóza.

Nejčastější formou kandidózy ústní dutiny je pseudomembranózní forma (tzv. soor), tvořící povlak na bukalní sliznici a jazyku, který lze snadno setřít. Méně častá je akutní atrofická forma s erytematózní bolestivou sliznicí. Chronická atrofická forma se projevuje např. jako erytém pod zubními náhradami. Nemoc je častá u kojenců v prvním měsíci věku a u dospělých s poruchami imunity a zubními protézami. Angulární forma kandidózy (cheilitida) postihuje koutky úst, projevuje se bolestivými, začervenalými, popraskanými, někdy bělavými povlaky.

Kandidóza na poševní sliznici se projevuje jako vulvovaginitida charakterizovaná bělavým hustým tvarohovitým výtokem, zarudnutím genitálu a svěděním. U mužů, hlavně u diabetiků, probíhá nemoc pod obrazem balanitidy a balanopostitidy.

Kožní kandidóza vzniká v zapádkových místech kůže – kandidóza intertriginózní, mezi prsty – interdigitální a častá je i plenková kandidóza u kojenců. Intertriginózní forma se projevuje jako jasně červené, mokvající plochy na periférii s límečkem šupin přecházející

v satelitní pustuly v okolí, které se po stržení mění v eroze s odlučováním epidermis na okraji. Nejčastěji postiženými kožními řasami jsou genitourální rýha, řasy břicha a plocha pod prsy. Projevy svědí a pálí.

Interdigitální eroze je častý nález u osob pracujících ve vlhku (uklízečky, kuchařky), kdy typicky ve třetím meziprstí vzniká červená eroze. Paronychie charakterizují bolestivé, zduřelé, zarudlé nehtové valy, z nichž bývá možné vytlačit kapku hnisu. Potíže vznikají ve vlhku, při máčení rukou. Pravidelně se jedná o smíšené infekce, na nichž se podílejí bakterie.

Chronická mukokutánní kandidóza je perzistující úporná infekce kůže, sliznic a nehtů postihující imunosuprimované a imunodeficitní jedince. Dochází ke střídání nebo současnému výskytu různých forem kandidózy, které na kůži mohou vést až ke vzniku erytémoskvamózních ložisek s histologickým nálezem granulomatózní zánětlivé reakce [43].

Systémová kandidóza se vyskytuje hlavně u pacientů s oslabenou imunitou, ložisko může postihovat jeden i více orgánů současně, nález kvasinek v krvi pacienta se nazývá kandidémie. Patří sem viscerální kandidóza, např. plicní kandidóza, meningitida, endokarditida, enteritida.

Kandidémie patří k nejzávažnějším nosokomiálním infekcím. Jde o velmi vážné onemocnění, které se těžko diagnostikuje a bývá často refrakterní na terapii. Pacienti s nosokomiální kandidémií mnohem častěji umírají během hospitalizace než při jiných infekcích krevního řečiště. Klinicky se kandidémie projevuje tachypnoí, tachykardií, hypertermií, leukocytózou a oligurií až anurií. Ložisko podmiňující kandidémii lze zjišťovat pomocí CT, sonografií, nukleární rezonancí a oftalmoskopií. K původcům kandidémií nutno počítat celé spektrum kvasinek, jednoznačně však dominuje *C. albicans* [45]. V České republice má počet kandidémií stoupající tendenci, ohroženi jsou pacienti na jednotkách intenzivní péče, anesteziologicko-resuscitačních odděleních a hlavně pacienti starší padesáti let [11].

Léčba se řídí lokalizací, rozsahem postižení, celkovým stavem pacienta a citlivostí kvasinky k antimykotikům. Nutná je léčba doprovodných celkových onemocnění (kompenzace diabetu apod.). Průběh je nezhvězda zdlouhavý a recidivy časté, zvláště pokud se nedaří odstranit predisponující a rizikové faktory [43].

2.3 Mezibuněčná komunikace u kvasinek

Jednobuněčné organismy sice dokážou žít jako individua nezávislá na jiných jedincích svého druhu, ovšem pro šíření a rozmnožování je výhodnější shlukovat se do větších celků. Populace mohou těžit z koordinovaného řízení některých fyziologických pochodů důležitých pro růst a přežití. To s sebou nese potřebu koordinovaného chování a mezibuněčné komunikace. Tato komunikace může být založena na přímém kontaktu buněk nebo na uvolňování malých molekul do mezibuněčného prostoru. Zkoumají se také signály vedené na delší vzdálenost např. mezi jednotlivými koloniemi [37, 38].

Bakterie produkují mnoho malých molekul zahrnujících sekundární metabolity (antibiotika a chelátory železa), produkty metabolismu a signální molekuly, které fungují jako feromony tzn. látky, které jsou produkovány do okolí buněk a nesou signál důležitý pro reprodukci. Mezi ně patří i quorum sensing molekuly. Některé ze signálních molekul se nazývají autoinduktory, pokud účinkují mimo jiné i na zvýšení svojí vlastní produkce [49].

Termín „quorum sensing“ zavedl Fuqua *et al.* v roce 1994 [9]. V některých pramenech je nazýván „efekt velikosti inokula“. Je to mechanismus komunikace, kdy jednobuněčné organismy dokážou synchronizovaně reagovat na buněčnou hustotu pomocí difuzibilních molekul produkovaných jedinci. Slovo „quorum“ znamená v angličtině nejnižší počet účastníků pro právoplatné hlasování [39]. Stejně tak populace mikroorganismů, ve které každý jedinec produkuje signál, může reagovat až po dosažení prahové koncentrace signálu. Signál je zprostředkován malými molekulami, které se koncentrují v extracelulárním prostoru. Jejich struktura se liší podle druhu a rozdíly mezi druhy jsou velké [13].

Quorum sensing molekuly mají čtyři základní charakteristiky: (1) k produkci quorum sensing signálu dochází ve specifických stádiích růstu, za určitých fyziologických podmínek nebo při odpovědi na změny životního prostředí, (2) quorum sensing signál se hromadí ve vnějším prostředí a mikroorganismy ho rozpoznávají pomocí specifického receptoru, (3) nahromadění prahové koncentrace quorum sensing signálu spustí jednotnou reakci u většiny jedinců, (4) signální molekuly nejsou pro buňky toxické a mohou být fyziologicky odbourány [50].

2.3.1 Quorum sensing molekuly u prokaryot

Koordinované chování a komunikace mezi bakteriemi je známa už od začátku minulého století. Quorum sensing mechanismus byl poprvé popsán u bakterií už v 60. letech u feromonů. Teprve v 90. letech byla objevena jeho chemická podstata. Jako první byly identifikovány účinky N-acylhomoserinových laktonů [49].

Quorum sensing ovlivňuje u prokaryot různé děje, které zahrnují vazbu na povrch, produkci extracelulární hmoty, syntézu surfaktantů, tvorbu spor, bioluminiscenci a produkci látek štěpících potravu a virulenčních faktorů [29, 31]. Bakterie při tvorbě biofilmu také v malé hustotě produkují hodně mezibuněčné hmoty, pokud hustota buněk a tedy i koncentrace quorum sensing molekul dosáhne prahové velikosti, některé buňky přestanou produkovat mezibuněčnou hmotu a způsobí tak uvolnění jedinců do oběhu a možnost šíření nákazy krevní cestou.

Nejrozšířenější quorum sensing molekulou u Gram negativních bakterií jsou N-acylhomoserinové laktony. Další nízkomolekulární hydrofóbní molekuly fungující jako signální molekuly byly zjištěny chinolony, mastné kyseliny a methylestery mastných kyselin [20, 49]. Jako quorum sensing molekuly u Gram pozitivních bakterií působí postranlačně modifikované peptidy [20]. Obvykle jsou tvořeny 5 až 34 aminokyselinami a obsahují neobvyklá chemická uskupení [49].

2.3.2 Quorum sensing molekuly u eukaryot

Poprvé byl u eukaryot pozorován quorum sensing u houby *Histoplasma capsulatum* v roce 2000 [24, 42]. *Histoplasma* žije v půdě jako saprofytická houba tvořící podhoubí a šířící se spórami. Vdechnutím konidií se v hostiteli přepne na růst do kvasinkové formy, která má schopnost přežívat v makrofázích. K udržení kvasinkové formy je nutná nadprahová produkce α -(1,3)-glukanu, která je závislá na hustotě kultury. Podobný mechanismus reakce závislý na velikosti inokula byl pozorován u jiných hub: *Ceratocystis ulmi* [14], *Uromyces phaseoli*, *Glomerella cingulata*, *Saccharomyces cerevisiae* a *C. albicans*. U kvasinek je quorum sensing systém závislý rovněž na hustotě populace. Do komplexního souboru reakcí patří ovlivnění morfologických změn (přeměna blastospor na hyfální růst), zvýšení transkripce stresových faktorů (zvyšuje se oxidačnímu stresu) a zvyšuje se eflux léčiv (antimykotik) z buňky. Quorum sensing molekuly jsou esenciální pro vznik biofilmů.

Quorum sensing molekuly se liší podle druhu mikroorganismu. *Saccharomyces cerevisiae* prochází změnou morfologie působením nadprahové koncentrace dvou

aromatických alkoholů fenylethanolu a tryptofolu odvozených od aminokyselin [19]. Quorum sensing molekuly u kvasinky *C. albicans* jsou farnesolová kyselina [34], farnesol [15] a tyrosol [6,20]. Farnesolová kyselina a farnesol inhibují tvorbu klíčnicích hyf po kultivaci v podmínkách spouštějících tvorbu klíčnicích hyf [15,35]. Zdá se, že se farnesolová kyselina tvoří jen u některých kmenů *C. albicans*.

Tyrosol na druhou stranu zkracuje lag fázi růstu hyf při naočkování buněk na nový agar po 24hodinové inkubaci. To znamená, že tyrosol umožňuje vstoupit do exponenciální fáze hned po naočkování do nové půdy v malé hustotě. Tyrosol podporuje růst klíčnicích hyf. Tvoří tak protiklad k farnesolu. Zajišťuje správný poměr mezi klíčovými buňkami a blastosporami, zajišťuje rovnováhu při tvorbě biofilmu.

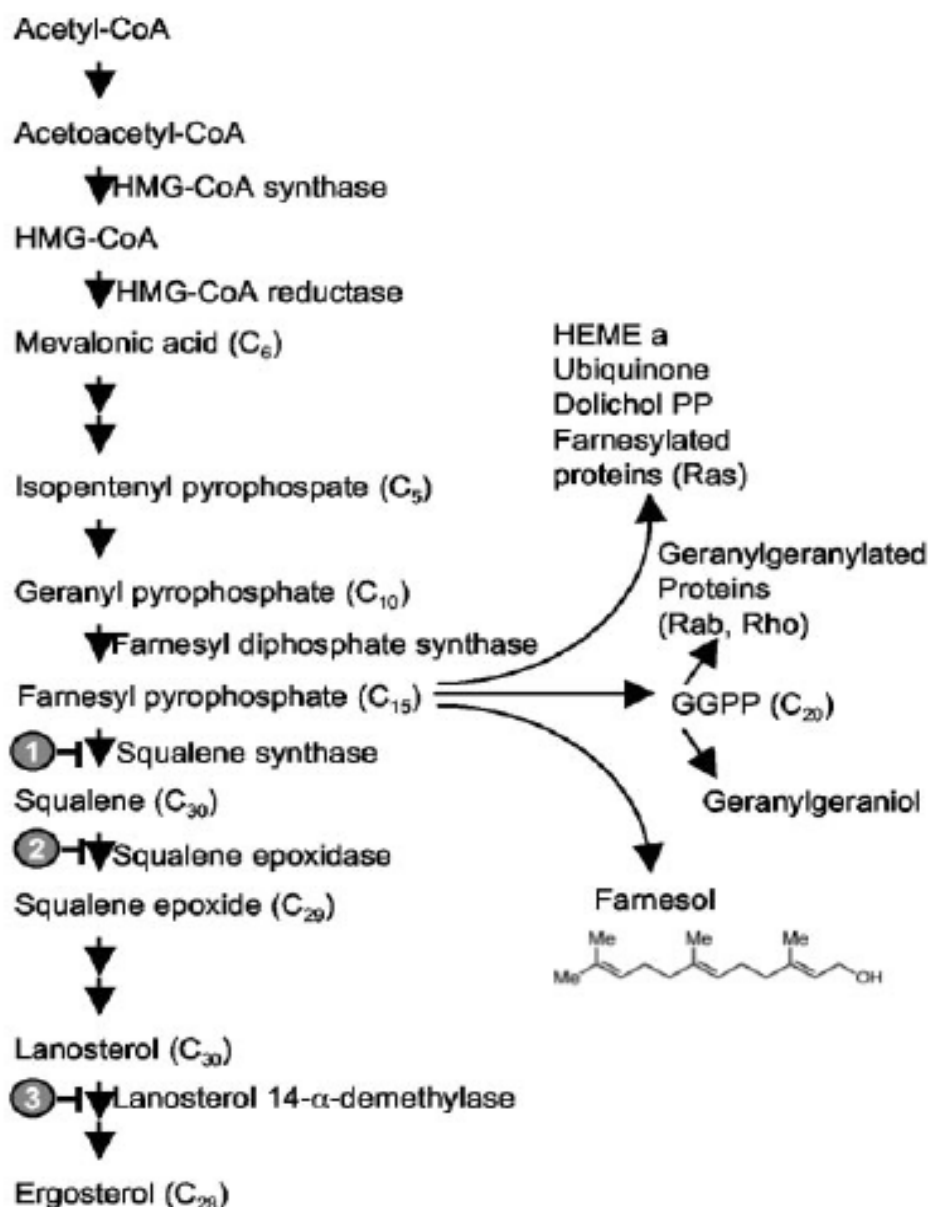
2.3.3 Interakce mezi kvasinkami a bakteriemi

Quorum sensing molekuly koordinují reakce mikroorganismů druhově specificky. Neomezují se ovšem pouze na jedince stejného druhu. Zprostředkují komunikaci mezi různými druhy mikroorganismů žijícími na jednom místě, kompetici o prostor a živiny. Ještě zajímavější je komunikace mezi mikroorganismy a jejich hostiteli [18].

Kompetici mezi kvasinkou a bakterií lze sledovat na výzkumu společného výskytu *Pseudomonas aeruginosa* a *C. albicans* u pacientů trpících cystickou fibrózou [26]. *Pseudomonas* ovlivňuje morfologii kvasinky pomocí malých signálních molekul N-acylhomoserinových laktonů tím, že ničí její hyfy. *Candida albicans* na druhou stranu produkuje farnesol, který zmenšuje hladiny chinolonových signálů u *Pseudomonas* a zmenšuje motilitu a shlukování bakterií. Studium interakcí lze dojít k novým možnostem v léčbě kolonizovaných pacientů.

2.4 Farnesol

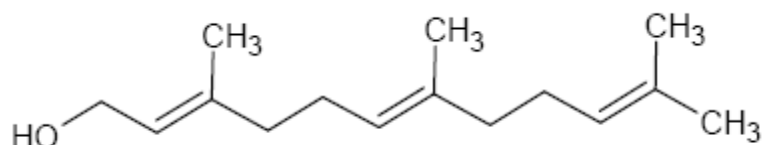
Farnesol byl první indentifikovaná quorum sensing molekula u *C. albicans*. Potlačuje tvorbu hyf u kvasinek. Vzniká v buňce kvasinky ve sterolové dráze viz Obr. 2. Místem účinku je extracelulární prostor a jeho koncentrace se zvyšuje s velikostí inokula. To znamená, že v malé hustotě (pod 10^6 buněk na ml) se tvoří klíční hyfy a při větší hustotě buňky rostou jako blastospory [15].



Obr. 2. Biosyntéza steroidních sloučenin a místo vzniku farnesolu. Čerpáno z citace [33]. Číslo v kroužku značí cílové enzymy antimykotik. 1. je cíl pro zaragozovou kyselinu, 2. pro terbinafin 3. pro azolové deriváty.

2.4.1 Struktura farnesolu, chemické a fyzikální vlastnosti

Farnesol je seskviterpenický alkohol. Farnesol obsahuje dvanáctiuhlíkatý řetězec, tři dvojně vazby a alkoholovou skupinu -OH, jak ukazuje Obr. 3. Dvojně vazby jsou oxidovatelné, toho lze využít při jeho důkazu oxidačním činidlem KMnO_4 , některé jiné druhy hub je dokáže degradovat na peroxidové skupiny. Může se vyskytovat ve čtyřech izomerech, ale pouze E,E isomer je aktivní. V kultuře *Candida* se objevuje E,E isomer, technický farnesol je k dostání v čisté podobě nebo jako směs isomerů.



Obr. 3. Strukturní vzorec farnesolu.

Uhlovodíkový řetězec zajišťuje lipofilitu, hydroxylová skupina je hydrofilní část. Celá molekula je hlavně lipofilní, rozpustnost ve vodě je nízká, pouze 1,2 mmol/l [15]. Molekula je difuzibilní a z buněk se dá odstranit vymýváním. Je extrahovatelný do organických rozpouštědel, např. do ethylacetátu nebo hexanu. Pro pokusy se užívá 10% roztok v methanolu. Samotný farnesol je těkavý a má příjemnou vůni. Teplota varu je 111°C. V roztoku musí být uložen v chladu nejlépe pod inertní atmosférou dusíku nebo argonu [33], aby se zabránilo jeho oxidaci. Shrnutí vlastností farnesolu ukazuje Tab. 2.

Farnesol je velmi odolný k teplotním změnám, je stabilní 30 minut při 100°C i při autoklávování (121°C). Aktivní zůstává i 3 roky při 4°C a nerozloží se ani po 12 cyklech zmrazování a rozmrazování [15].

Tab. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti farnesolu.*

IUPAC název	3,7,11-trimethyldodeka-2,6,10-trien-1-ol
Molekulový vzorec	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$
Molekulová hmotnost	222,37 g/mol
Hustota	0,887 g/cm ³
Bod varu	111°C při 0,35 mmHg

* upraveno podle [7].

2.4.2 Tvorba farnesolu v buňce

Farnesol najdeme v buňkách eukaryot u kvasinek (*Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*), u některých rostlin i živočichů. Vzniká z farnesyldifosfátu, který je jedním z meziproductů v biochemické cestě pro syntézu isoprenoidů, hlavně cholesterolu.

Výchozí sloučeninou pro tuto cestu je acetyl-CoA. Z něj se přes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) účinkem HMG-CoA-reduktasy syntetizuje mevalonová kyselina. Poté probíhají další reakce a vzniká aktivní isopren čili isopentenylidifosfát (5 uhlíků) a jeho isomer 3,3-dimethylallyldifosfát (5 uhlíků). Jejich kondenzací vzniká nejprve geranyldifosfát (10 uhlíků) a dále farnesyldifosfát (15 uhlíků). Kondenzací dvou molekul farnesyldifosfátu vznikne skvalen (30 uhlíků). Ze skvalenu se po dalších změnách tvoří cholesterol. Cholesterol je důležitou součástí biomembrán, dále je výchozí sloučeninou pro steroidní hormony u živočichů a karotenoidy u rostlin [48].

Farnesyldifosfát představuje klíčový meziproduct v biosyntéze isoprenoidů umístěný v regulačním bodě, ze kterého se mohou isoprenové jednotky přejít do mnoha dalších biochemických cest, viz Obr. 2. Mohou z něj vznikat dolicholy, koenzym Q, geranylgeranylované a farnesylované proteiny, farnesol a geranylgeraniol [10]. Farnesol vzniká z farnesyldifosfátu pomocí enzymu pyrofosfatasy.

Externě přidaný farnesol urychluje degradaci enzymu HMG-CoA reduktasy, který je hlavním regulačním enzymem sterolové biosyntézy. Isoprenoidy zprostředkují regulační mechanismus, který řídí produkci intracelulárního farnesolu a výzkum Meigse a Simoniho [27] podporuje hypotézu, že farnesol je nesteroidní regulátor degradace HMG-CoA reduktasy.

Farnesol lze extrahovat z olejů rostlin jako jsou citrusy, hlavně citroník pomerančový pergamský (lat. *Citrus aurantium ssp. bergamia*), brambořík (lat. *Cyclamen*), tuberosa (lat. *Polianthes tuberosa*) nebo i z živočišných zdrojů, např. z análních žlázek nutrie (*Myocastor coypus*). Má příjemnou vůni a používá se na aromatizaci tabáku a výrobě parfémů.

2.4.3 Vliv farnesolu na morfologii kvasinky *Candida albicans*

Farnesol působí jako quorum sensing molekula u kvasinky *C. albicans*. Po naočkování buněk *in vitro* do podmínek podporujících tvorbu klíčnicích hyf je schopen zabránit přechodu k hyfálnímu růstu. Po dodání dostatečné koncentrace farnesolu lze docílit úplného zastavení růstu hyf. Potřebné koncentrace se liší podle použitého média. Média indukující tvorbu hyf

jsou nejčastěji tekutá média obohacená N-Acetylglukosaminem, GPP – glukosafosfát prolinem, YPD – yeast peptone dextrose a RPMI 1640 (chemicky definované médium). Média, která obsahují sérum, vyžadují řádově vyšší koncentrace farnesolu ke stejné inhibici tvorby hyf. Předpokládá se, že je to způsobeno vazbou farnesolu na albumin, který váže většinu špatně rozpustných látek [30].

Tato vlastnost ovšem funguje pouze krátkodobě, dokud jsou buňky totipotentní. Pokud se odstartuje v buňce růst klíční hyfy, farnesol už na ni neúčinkuje [33, 30]. Farnesol nemá vliv na prodlužování hyf nebo na růst a množení buněk. Čím později po inokulaci buněk přidáme farnesol, tím menší je počet buněk, které jsou vnímavé k farnesolu. Po přidání hned po inokulaci, je inhibováno 100% buněk, po 60 minutách 60%, po 90 minutách je většina buněk nevnímavých. K totipotenci se buňky vrací po určité době nejspíš neorganizovaně, každá buňka jindy.

Mosel *et al.* [30] zjistil koncentrace farnesolu nutné k 50% inhibici tvorby hyf v tekutých médiích. Bez obsahu séra to byl 1 $\mu\text{mol/l}$ farnesolu, s obsahem séra 9 $\mu\text{mol/l}$. Ramage *et al.* [40] porovnával inhibici hyfálního růstu v biofilmech v médiu RPMI 1640. Farnesol účinkoval pouze při přidání na začátku inkubace, koncentrace 30 $\mu\text{mol/l}$ stačila k 50% inhibici, 300 $\mu\text{mol/l}$ zajišťovalo úplnou inhibici hyfálního růstu. K vnímavosti se část buněk vrátila až po 24 hodinách inkubace.

Farnesol je důležitý pro vznik biofilmů. Při normálním vývoji se biofilm skládá z vrstev diferencovaných buněk, jak bylo popsáno výše. Pokud inkubujeme biofilm v podmínkách, kdy přes něj médium protéká a unáší quorum sensing molekuly, biofilm se skládá jen z hyf, a proto je velmi tenký a není přichycen k povrchu. Naopak pokud ho ošetříme farnesolem nebo ho inkubujeme v supernatantu z média, ve kterém už dříve rostl kvasinkový biofilm, biofilm se nevytvoří vůbec a kvasinky tvoří pouze blastosporry nebo pseudohyfy, protože farnesol zabraňuje vzniku hyf [40].

Chen a Fink [19] zjistili, že produkce quorum sensing molekul není v průběhu života kvasinek stejná. Zjistili, že produkce farnesolu se zvýší při nedostatku dusíku v růstovém médiu, který indukuje i růst hyf, to znamená, že reakce na živiny v médiu je komplexní [19].

2.4.4 Účinky farnesolu na živočišné, houbové a rostlinné buňky

Farnesol je nyní studován pro mnoho účinků jako důležitý intracelulární metabolit. Je jedním ze zpětnovazebných regulátorů sterolové syntézy působících na aktivitu HMG-CoA

reduktázy. Exogenní farnesol také ovlivňuje několik jiných fyziologických procesů zahrnujících [44] 1. inhibici syntézy fosfatidylcholinu, 2. postup buněčným cyklem a 3. indukci biochemických změn spojených s apoptózou [28, 25, 12]. Tyto účinky jsou intenzivně studovány u rakovinných buněk, bakteriálních a houbových patogenů. Farnesol se nyní zkouší jako antimikrobní látka v kombinaci s tradičními antibiotiky, antiseptiky.

2.4.5 Vliv farnesolu na účinky antimykotik

Vliv farnesolu na účinky antimykotik je dosud málo probádanou oblastí. Cagnacci *et al.*, 2008 [3] zkoumali vliv antimykotik, γ záření a vazbu buněk v kolagenovém gelu na *C. albicans*. Zjistili, že amfotericin B inhibuje růst blastospor, kdežto ketokonazol byl toxický k filamentárním formám. Proto amfotericin B účinkoval hlavně na kvasinky v tekutém médiu, kdežto ketokonazol účinkoval na kvasinky zakotvené do kolagenového gelu, kde tvořila biofilmy s hyfami. Dále zkusili zralé kolonie v kolagenovém gelu nejdříve ošetřit farnesolem 26,6 $\mu\text{g/ml}$, což je pro možnost porovnání 119 $\mu\text{mol/l}$, a poté přidat amfotericin B a ketokonazol. Účinnost ketokonazolu u kolonií ošetřených farnesolem se snížila, protože farnesol inhibuje tvorbu hyf a ketokonazol účinkuje hlavně na hyfy. Účinnost amfotericinu B se mírně zvýšila.

Hornby *et al.*, 2003 [16] navrhl hypotézu, že fungicidní vlastnosti zaragozové kyseliny jsou způsobeny mimo jiné i akumulací farnesolu. Zaragozová kyselina je totiž inhibitorem skvalen synthasy, jejímž substrátem je substrát pro syntézu farnesolu viz Obr. 3. Pokud zablokujeme syntézu sterolů, zvýší se syntéza farnesolu. Toto Hornby potvrzuje i v roce 2004 a 2005 [32, 17] u dalších antifungálních látek, hlavně azolů.

2.5 Laboratorní diagnostika kvasinek

Laboratorní diagnostika hub má za úkol rozlišit původce onemocnění, nečastěji dermatofyty, dimorfní a oportunní houby. Dermatofyty jsou parazitické vláknité houby, které patří do rodů *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Na Sabouraudově glukózovém agaru (SGA) tvoří bohatá mycélia, jejich izolace i identifikace trvá poměrně dlouhou dobu, izolace 5 – 14 dní, identifikace až 30 dní. Způsobují kožní mykózy.

Dimorfní houby jsou schopné růst jako vláknité houby i jako mycélia v závislosti na podmínkách prostředí. Patří mezi ně rody *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides* a *Sporothrix*. Jako vláknité houby rostou při 25°C v přírodě. Jako kvasinku je najdeme ve tkáni hostitele a při kultivaci při 37°C. Izolace a identifikace trvá podobně dlouhou dobu jako u dermatofytů. *Sporothrix* způsobuje mykózu kůže a podkoží, ostatní jmenované rody způsobují převážně mykózy vnitřních orgánů.

Oportunní houby žijí saprofytický v přírodě nebo jsou součástí přirozené mikroflóry člověka. Na invazivní formy způsobující onemocnění se mění většinou pouze u oslabených většinou imunoalterovaných pacientů. Patří mezi ně rody *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* a *Mucorales*. Podobně jako dimorfní houby dokáží tvořit mycelia i kvasinkové formy. U rodu *Candida* je oproti očekávání forma kvasinková součástí přirozené mikroflory a forma myceliální je invazivní (způsobuje onemocnění) [22]. V dalším textu se budu věnovat hlavně diagnostice kvasinek zaměřené na druh *C. albicans*.

Laboratorní diagnostika kvasinek zahrnuje metody přímé, nepřímé a testování citlivosti k antimykotikům. K přímým metodám řadíme mikroskopii, kultivaci, PCR (polymerázová řetězcová reakce), detekci antigenů a metabolitů. Mezi nepřímé metody patří serologie (hledání protilátek). Mezi metody testování citlivosti patří agarové difúzní metody a mikrodiluční bujónová metoda [47].

Kultivační hodnocení

Kvasinky se kultivují většinou při 25 i 37°C na šikmém Sabouraudově glukózovém agaru, jehož selektivita se zvyšuje přidáním antibiotik. Rostou většinou rychle, rod *Candida* za 24-48 hodin, ostatní rody do 2-10 dnů. *Candida albicans* roste nejčastěji ve dvou fenotypech, fenotyp tvořící bílé krémovité hladké kolonie je většinou izolován z klinického materiálu. Matný fenotyp pochází z vnějšího prostředí.

Mikroskopie

Mikroskopický preparát se zhotovuje z okrajové části kolonie s kouskem agaru. V preparátech obarvených dle Grama se u *C. albicans* nachází směs pučících blastospor a hyf, které mohou tvořit konglomeráty. Z vaginálního sekretu lze vytvořit preparát s 10% hydroxidem draselným, v kterém jsou projasněny kvasinky.

Aerobní hemokultivace se provádí pro důkaz výskytu kvasinky v krvi pacienta. Hodnotí se kultivačně a mikroskopicky.

Test klíčních hyf

Test klíčních hyf se v mykologické laboratoři používá pro identifikaci *C. albicans*. Základní schéma testu klíčních hyf je: do zkumavek s několika kapkami lidského séra se přenese malá část kolonie. Poté se zkumavky inkubují při 35°C po dobu 2,5 až 4 hodin [51]. Po inkubaci se mikroskopicky hodnotí nárůst hyf. Klíční hyfy tvoří v séru pouze *C. albicans* (a velmi vzácně kmeny *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*, pokud se nedodrží parametry testu), specifita a senzitivita jsou 99% [46]. Provedení testu je jednoduché a rychlé a spolehlivě oddělí vzorky *C. albicans* od jiných kandid či *Cryptococcus neoformans*.

Biochemické hodnocení

Auxanogramy jsou asimilační testy pro zjištění druhu non-*albicans* kandid. Při testu se suspenze kvasinek zalije agarem, na který se po utužení kladou disky napuštěné různými cukry, inkubuje se 24-48 hodin při 27°C. Využití daného cukru se projeví bílým zákalem okolo disku. Každý druh *Candida* využívá jiné cukry.

Zymogramy jsou testy taktéž na určení non-*albicans* druhů na základě schopnosti fermentovat určité cukry. Provádějí se ve zkumavkách a hodnotí se zákal a tvorba plynu.

Rychlé testy na chromogenních agarech

Chromogenní agary jsou určeny pro odlišení *C. albicans* od ostatních druhů *Candida* na základě barvy kolonií vyrostlých na agaru. Agar obsahuje fluorogenní nebo chromogenní složku, která je lyzována hexoaminidázovou aktivitou *C. albicans* a umožňuje tak změnu barvy vyrostlé kolonie [46]. Dostupné testy jsou CandiSelect, CHROMagar, Hi-Crome Candida Agar aj. [47]. Některé z testů umožňují i odlišení některých dalších druhů, např. *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei*.

Důkaz antigenů či protilátek

Dokazuje se kandidový manan ze séra pacienta metodou ELISA. Index pozitivity je nad 1,0. Možný je i důkaz antimananových protilátek stejnou metodou.

Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Tato metoda není pro rod *Candida* uvedena do praxe. Představuje spolehlivou a rychlou metodu pro zjištění patogena v odebraných tělních tekutinách na základě PCR metody. Specifita je vyšší než u hemokultivace a výsledek je znám ve velice krátkém čase (asi 10 hodin). Nevýhodou je finanční náročnost metody a problémy s její standardizací.

Agarová difúzní metoda

Agarová difúzní metoda zahrnuje dvě často používané metody pro určení citlivosti mikroorganismů k antimikrobním látkám. Kvalitativní metoda je diskový test a kvantitativní metoda je gradientový test, tzv. E-test.

Princip diskového testu spočívá v aplikaci disku impregnovaného antimykotikem na povrch naočkované Müller-Hintonovy agarové půdy. Antimykotikum difunduje do okolí a vytváří koncentrační gradient, který brání testovanému kmenu mikroba v růstu podle stupně jeho citlivosti. Růst rezistentního kmene v okolí disku není inhibován. Zdrojem antimykotika jsou komerčně vyráběné testovací disky.

Po inkubaci se odečítá průměr inhibiční zóny v mm. Hodnoty se porovnávají s hodnotami referenčních kmenů pro kontrolu standardizace metody a podle stanovených hraničních hodnot se interpretují jako citlivé, intemediátní nebo rezistentní [46].

E-test je kvantitativní test pro stanovení MIC. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace antimikrobní látky, která zastavuje růst testovaného kmene viditelný pouhým okem. Na agar se přikládá kalibrovaný proužek obsahující diskontinuální gradient koncentrací antimykotika. Antimykotikum difunduje do okolí a vytváří kontinuální gradient v okolí proužku. Inhibiční zóna má kapkovitý tvar a MIC se odečítá v místě, kde se dotýká proužku [46].

Bujónová diluční metoda

Bujónová diluční metoda se používá ke stanovení MIC a minimální fungicidní koncentrace. Minimální fungicidní koncentrace je koncentrace, při které dochází k devitalizaci mykoorganismu [35]. Prakticky se provádí buď ve zkumavkách – zkumavková metoda nebo v mikrotitrační destičce – mikrodiluční metoda.

Při zkumavkové metodě se do zkumavek, které obsahují bujón a koncentrační řadu antimykotika, přidává suspenze mikroba, jehož citlivost chceme měřit. Koncentrace antimykotika v první zkumavce bez viditelného zákalu značí MIC.

Mikrotitrační bujónová metoda se provádí v mikrotitrační destičce stejně jako zkumavková. Její výhoda je zmenšení nákladů na materiál, menší pracnost a možnost automatického vyhodnocení ve spektrofotometru. Nevýhodou je vyšší relativní chyba [46].

3. Praktická část

3.1 Kmeny

Do pokusů byly zarnuty referenční kmeny *Candida albicans* ATCC 90028 a *C. albicans* ATCC 44859, dále kmen *Candida albicans* VVK 25188 získaný z pacientky s akutní vulvovaginální kandidózou a *Candida albicans* M 1008/08 získaný z pacientky s vulvovaginální kandidózou s prokázanou rezistencí k azolům.

Všechny kmeny byly uchovávány v konzervách na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové při teplotě 4°C na šikmém Sabouraudově agaru přelitým parafinem.

3.2 Média a chemikálie

Mikrobiologické půdy:

Yeast-pepton-D-glucosové médium - YPD (Scharlau)

Sabouraudovo glukózové médium - SGA (Oxoid)

NYP (Difco)

Hovězí sérum - BS

Chemikálie a ostatní:

Farnesol (Fluka)

Methanol (Penta)

Destilovaná voda, voda pro inj.

Vybavení laboratoře:

Laminární box ESCO, třída II

Inkubátor Binder

Inkubátor Heidolph 1000

Třepačka Titramax Heidolph 1000

Minitřepačka MS2 IKA

Odstředivka

Densi-la-meter Lachema

Mikroskop Olympus BX 40

Pipety Akura

3.2.1 Mykologické kultivační a testovací půdy

YPD tekutý bujón – YPD (l)

Složení: pepton 2%, kvasnicový extrakt 1%, D-glukosa 2%, destilovaná voda

Postup: Komerčně vyrobená sypká směs byla smíchána s vodou, zahřáta do rozpuštění a sterilizována v autoklávu 15 min. na 121°C. pH 6,8±0,2.

YPD pevný agar – YPD (s)

Složení: pepton 2%, kvasnicový extrakt 1%, D-glukosa 2%, agar 2%, dest. voda

Postup: Komerčně vyrobená sypká směs byla smíchána s agarem a vodou pro inj., zahřáta do rozpuštění, sterilizována v autoklávu 15 min. na 121°C a rozlita do Petriho misek. pH 6,8±0,2.

SGA tekutý bujón – SGA (l)

Složení: pepton 1%, D-glukosa 4%, dest. voda

Postup: viz YPD tekutý bujón, pH 5,6±0,2.

SGA pevný agar – SGA (s)

Složení: pepton 1%, D-glukosa 4%, agar 1,5%, dest. voda

Postup: viz YPD pevný agar, pH 5,6±0,2.

Hovězí sérum (BS)

Uchováváno při 4°C na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

NYP tekutý bujón

Složení:	N-acetylglukosamin (Sigma)	0,0221 g
	L-prolin (Roanal)	0,0115 g
	chlorid sodný	0,45 g
	YNB (yeast nitrogen base, Difco)	0,335 g
	destilovaná voda	do 100 g

Postup: Navážené složky byly smíchány, doplněny destilovanou vodou, rozpuštěny a sterilizovány v autoklávu 15 min. na 121°C. pH bylo upraveno na hodnotu v rozmezí 6,7-6,77 roztokem hydroxidu sodného 10 mol/l.

3.2.2 Příprava farnesolu

Byla připravena koncentrační řada farnesolu. Nejdříve byl připraven roztok farnesolu v methanolu. Roztok se připravoval každý den čerstvý kvůli malé stabilitě farnesolu v methanolu.

$$\text{Vzorce: } n = c \cdot V \quad \begin{array}{l} n \text{ [mol]} \\ c \text{ [mol/l]} \\ V \text{ [l]} \end{array} \quad (1)$$

$$m = M \cdot n \quad \begin{array}{l} m \text{ [g]} \\ M \text{ [g/mol]} \\ n \text{ [mol]} \end{array} \quad (2)$$

$$V_{\text{výsl.}} = m / \rho \quad \begin{array}{l} V_{\text{výsl.}} \text{ [ml]} \\ m \text{ [g]} \\ \rho \text{ [g/cm}^3\text{]} \end{array} \quad (3)$$

$$\text{Výsledný vzorec: } V_{\text{výsl.}} = c \cdot V \cdot M / \rho \quad \begin{array}{l} c \text{ [mol/l]} \\ V \text{ [l]} \\ M \text{ [g/mol]} \\ \rho \text{ [g/cm}^3\text{]} \end{array} \quad (4)$$

Pro koncentrační řadu bylo potřeba 500 μl roztoku o koncentraci 300 mmol/l (molekulová hmotnost $M = 222,37 \text{ g/mol}$, hustota farnesolu $\rho = 0,887 \text{ g/cm}^3$). Výsledný objem farnesolu byl 37,6 μl .

Bylo smícháno 37,6 μl farnesolu a 462,4 μl methanolu. Dále byla připravena řada zkumavek s klesající koncentrací farnesolu ředěním methanolem 1:9, odebráním 50 μl roztoku z první zkumavky a vložení do další s 450 μl methanolu, vzniklo pět zkumavek s koncentrací farnesolu 300 mmol/l, 30 mmol/l, 3 mmol/l, 300 $\mu\text{mol/l}$ a 30 $\mu\text{mol/l}$.

3.3 Metody

3.3.1 Test klíčních hyf

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. 0,2 ml této suspenze byla doplněna tekutým růstovým médiem (YPD nebo SGA) do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Test klíčních hyf byl připravován v laminárním boxu. Buňky byly po 24hodinové inkubaci v tekutém médiu odstředěny 2 minuty při 3000 otáček/min., byt odsát supernatant, sediment byl naředěn vodou, protřepán a znovu odstředěn. Tento postup byl dvakrát opakován a na konci bylo přidáno 2 ml vody (dále jen „promytí suspenze buněk“). Poté byla připravena suspenze buněk o žádané koncentraci cfu/ml pomocí Bürkerovy komůrky.

Po promytí suspenze byla připravena suspenze s požadovanou koncentrací buněk v cfu/ml pomocí Bürkerovy komůrky. Do Eppendorfových zkumavek bylo napipetováno 50 μl suspenze kvasinek a 450 μl média indukujícího tvorbu hyf (dále jen indukční médium, NYP nebo BS). Inkubace probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání.

Po inkubaci byla suspenze důkladně roztřepána, aby se odloučily buňky přisedlé na stěnách zkumavek. Do Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 12 μl suspenze a byl proveden diferenciální rozpočet 100 buněk. Byly rozlišovány tři základní morfologické struktury: blastospory, pseudohyfy a hyfy.

3.3.2 Modifikace testu klíčních hyf

Vliv růstového média na tvorbu klíčních hyf

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. 0,2 ml této suspenze byla doplněna tekutým růstovým médiem YPD nebo SGA do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Po promytí buněk byla připravena suspenze buněk o hustotě 10^7 cfu/ml. Na obou kulturách inkubovaných na rozdílných růstových médiích byl proveden test klíčních hyf. Výsledná hustota buněk při testu byla 10^6 cfu/ml.

Inkubace probíhala v Eppendorfových zkumavkách 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv indukčního média na tvorbu klíčních hyf

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. 0,2 ml této suspenze byla doplněna tekutým růstovým médiem YPD do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Buňky byly promyty a byla z nich připravena suspenze o hustotě 10^7 cfu/ml. Do Eppendorfových zkumavek bylo vloženo 50 μl suspenze kvasinek a 450 μl indukčního média NYP nebo hovězího séra (BS).

Inkubace v Eppendorfových zkumavkách probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv velikosti inokula na tvorbu klíčních hyf

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. 0,2 ml této suspenze byla doplněna tekutým růstovým médiem YPD do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Buňky byly promyty a byly z nich připraveny suspenze buněk o hustotě 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^5 cfu/ml ředěním 1:9. Hustotu buněk byly kontrolovány pomocí Bürkerovy komůrky. Složení média pro inkubaci je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf zkoušení vlivu velikosti inokula.

Suspenze kvasinek		Výsl. konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	Médium (NYP) [μl]
Koncentrace [cfu/ml]	Objem [μl]		
10 ⁸	50	10 ⁷	450
10 ⁷	50	10 ⁶	450
10 ⁶	50	10 ⁵	450
10 ⁵	50	10 ⁴	450

Inkubace v Eppendorfových zkumavkách probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv materiálu zkumavek

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10⁶ cfu/ml. 0,2 ml této suspenze bylo doplněno tekutým růstovým médiem YPD do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Buňky byly promyty a byla z nich připravena suspenze o hustotě 10⁷ cfu/ml. Test klíčních hyf byl proveden v plastových Eppendorfových zkumavkách a ve skleněných zkumavkách. Do zkumavek byly vloženy složky podle Tab. 4. Inkubace probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv inkubace s farnesolem na tvorbu klíčních hyf

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10⁶ cfu/ml. 0,2 ml této suspenze byla doplněna tekutým růstovým médiem YPD do 2 ml. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 35°C s třepáním.

Dále byly do Eppendorfových zkumavek přidány složky podle Tab. 4. To znamená: indukční médium, roztok farnesolu v množství, aby výsledné koncentrace farnesolu byly 3 μmol/l, 30 μmol/l, 300 μmol/l a nakonec suspenze kvasinek. Pro kontrolu vlivu rozpuštědla byl použit čistý methanol a jako kontrolu vlivu farnesolu bylo místo farnesolového roztoku přidáno adekvátní množství indukčního média. Výsledná hustota buněk při testu byla 10⁶ cfu/ml.

Tab. 4. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf pro zkoušení vlivu farnesolu na morfologii *Candida albicans*.

Suspenze kvasinek Objem [μl]	Médium (NYP) [μl]	Roztok farnesolu v methanolu		Výsledná koncentrace farnesolu při inkubaci [μmol/l]
		Koncentrace [μmol/l]	Objem [μl]	
50	450	---	---	0
50	400	0+methanol	50	0
50	400	30	50	3
50	400	300	50	30
50	400	3 000	50	300

Inkubace probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném rozčepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv preinkubace s farnesolem na tekutém růstovém médiu

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. 0,2 ml této suspenze bylo doplněno tekutým růstovým médiem (YPD nebo SGA) do 2 ml. Bylo smícháno 0,2 ml této suspenze a 0,02 ml roztoku farnesolu (0, 3 a 30 mmol/l), 0,2 ml suspenze a 0,02 ml methanolu a jako kontrolu 0,2 ml suspenze a 0,02 ml indukčního média a doplněno do 2 ml médiem viz Tab. 5.

Tab. 5. Složky přidané do zkumavek pro preinkubaci farnesolem v tekutém médiu.

Suspenze kvasinek [ml]	Tekuté médium [ml]	Roztok farnesolu v methanolu		Výsledná koncentrace farnesolu při inkubaci [μmol/l]
		Koncentrace [mmol]	Objem [ml]	
0,2	1,80	---	---	0
0,2	1,78	0+methanol	0,02	0+methanol
0,2	1,78	0,3	0,02	3
0,2	1,78	3	0,02	30
0,2	1,78	30	0,02	300

Zkumavky jsme inkubovali 24 hodin při 35°C s třepáním.

Po promytí buněk byla připravena suspenze s koncentrací buněk 10^7 cfu/ml pomocí Bürkerovy komůrky. Dále byly do Eppendorfových zkumavek přidány složky podle Tab. 6. Byl přidán roztok farnesolu v takové koncentraci, aby výsledná koncentrace odpovídala množství při preinkubaci.

Tab. 6. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf s preinkubací farnesolem v tekutém médiu.

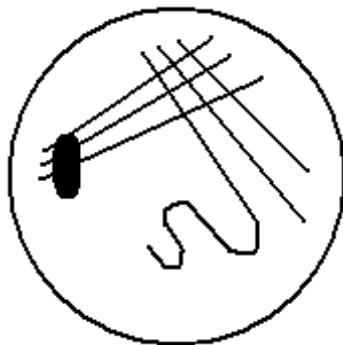
Suspenze kvasinek		Médium (NYP) [μ l]	Roztok farnesolu v methanolu		Výsledná koncentrace farnesolu při inkubaci [μ mol/l]
Konc.farnesolu při preinkubaci [μ mol/l]	Objem [μ l]		Koncentrace [μ mol/l]	Objem [μ l]	
0	50	450	---	---	0
0	50	400	0+methanol	50	0
0	50	400	30	50	3
0	50	400	300	50	30
0	50	400	3 000	50	300
0+methanol	50	450	---	---	0
0+methanol	50	400	0+methanol	50	0
3	50	450	---	---	0
3	50	400	30	50	3
30	50	450	---	---	0
30	50	400	300	50	30
300	50	450	---	---	0
300	50	400	3 000	50	300

U vzorku bez preinkubace byly vyzkoušeny všechny koncentrace farnesolu. Bylo přidáno tekuté médium a nakonec suspenze kvasinek. Výsledná hustota buněk při testu byla 10^6 cfu/ml. Výsledné koncentrace farnesolu byly 3 μ mol/l, 30 μ mol/l, 300 μ mol/l.

Inkubace probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

Vliv preinkubace s farnesolem na pevném růstovém médiu

Z 24hodinové kultury byla připravena suspenze buněk ve vodě o hustotě 10^6 cfu/ml. Byl připraven tuhý agar (YPD nebo SGA), na který byl po schlazení na 50°C aplikován roztok farnesolu v methanolu tak, aby výsledná koncentrace farnesolu v roztoku byla $3\ \mu\text{mol/l}$, $30\ \mu\text{mol/l}$ a $300\ \mu\text{mol/l}$. Byl proveden izolační roztěr suspenze kvasinek (viz Obr. 4). Inkubace probíhala 24 hodin při 35°C .



Obr. 4 Schéma izolačního roztěru na Petriho misce.

Po promytí buněk byla připravena suspenze o hustotě 10^7 cfu/ml. Do Eppendorfových zkumavek byly přidány složky podle Tab. 6. Výsledná hustota buněk při testu byla 10^6 cfu/ml, výsledné koncentrace farnesolu byly $3\ \mu\text{mol/l}$, $30\ \mu\text{mol/l}$, $300\ \mu\text{mol/l}$.

Inkubace probíhala 3 hodiny v termostatu při 37°C za stálého třepání. Po důkladném roztřepání byl v Bürkerově komůrce proveden diferenciální rozpočet 100 buněk.

4. Výsledky

4.1 Standardizace testu indukce klíčních hyf

Provedli jsme pokusy podle schémat v kap. Metody, jejich kompletní výsledky jsou uvedeny v Příloze č. 1. V následujících tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky.

Vliv růstového média na tvorbu klíčních hyf

Byly zkoumány rozdíly v poměru počtu hyf, pseudohyf a blastospor (diferenciální rozpočet) mezi jednotlivými růstovými médii i v rámci několika měření v jednom médiu. Směrodatná odchylka charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot měření od průměru u každého média. Výsledky ukazují i rozdíly mezi reakcemi kmenů kvasinek.

Tab. 7. Morfologie *Candida albicans* ATCC 90028 v růstových médiích.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
YPD (l)	69±15,2	0±0,4	31±15,2	7
YPD (s)	76±9,0	0±0,0	25±9,0	4
SGA (l)	61±20,6	0±0,4	39±19,8	7
SGA (s)	79±11,5	0±0,3	21±11,5	8
Všechna média	71	0	29	26

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 8. Morfologie *Candida albicans* VVK 25188 v růstových médiích.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
YPD (l)	11±5,2	0±0,0	89±5,2	3
YPD (s)	11±0,0	2±0,0	88±0,0	1
SGA (l)	16±0,0	0±0,0	82±0,0	1
SGA (s)	9±5,5	0±0,5	91±5,5	6
Všechna média	10	0	89	11

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 9. Morfologie *Candida albicans* ATCC 44859 v růstových médiích.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
YPD (l)	70±4,5	0±0,0	31±4,5	2
YPD (s)	77±11,1	1±0,8	22±11,6	3
SGA (l)	33±1,0	0±0,0	67±1,0	2
SGA (s)	52±19,6	0±0,0	48±19,6	3
Všechna média	59	0	41	10

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Typ růstového média neměl vliv na výsledky testu klíčnicích hyf. Odchyky mezi jednotlivými měřeními u stejného média se velmi lišily.

Rozdíly mezi reakcemi kmenů byly významné. Referenční kmen ATCC 90028 po indukci růstu klíčnicích hyf tvořil hlavně blastospory (poměr blastospory:hyfy byl průměrně 71:29) viz Tab. 7. Podobně reagoval i druhý referenční kmen ATCC 44859 (poměr 59:41) viz Tab. 9. Tento kmen tvořil atypické tvary buněk, u kterých se těžko rozlišoval morfologický typ, velké odchylky mezi měřeními proto mohou být způsobeny individuální chybou při mikroskopickém odečtu. Kmen získaný z pacientky VVK 25188 reagoval standardně tvorbou klíčnicích hyf (Tab. 8).

Vliv indukčního média a velikosti inokula na tvorbu klíčnicích hyf

Bylo testováno, zda má použití různých indukčních médií (v našem případě hovězí sérum jako zástupce biologického média a chemicky definované médium NYP) vliv na diferenciální rozpočet. Dále se sledoval vliv různých koncentrací suspenze kvasinek na inkubaci v séru.

Tab. 10. Morfologie *Candida albicans* ATCC 90028 v indukčních médiích v závislosti na velikosti inokula.

Indukční médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
NYP	10 ⁷	75±10,5	0±0,7	24±10,7	8
	10 ⁶	63±11,5	0±0,0	32±16,6	8
	10 ⁵	64±13,9	0±0,3	36±13,8	8
	10 ⁴	57±10,8	0±0,0	44±10,8	8
BS	10 ⁷	90±0,0	0±0,0	10±0,0	1
	10 ⁶	39±30,0	3±3,8	58±29,2	3
	10 ⁵	46±37,5	2±1,0	53±36,5	2
	10 ⁴	48±33,0	5±2,5	48±30,5	2

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP/BS, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 11. Morfologie *Candida albicans* VVK 25188 v indukčních médiích v závislosti na velikosti inokula.

Indukční médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
NYP	10 ⁷	77±4,0	1±0,4	23±3,8	4
	10 ⁶	11±3,1	1±0,9	88±3,9	4
	10 ⁵	9±6,9	1±0,7	89±8,9	4
	10 ⁴	21±19,8	0±0,9	79±20,5	4
BS	10 ⁷	16±12,5	0±0,0	85±12,5	2
	10 ⁶	3±0,5	1±1,0	97±0,5	2
	10 ⁵	5±4,5	1±0,5	95±5,0	2
	10 ⁴	9±8,5	0±0,0	87±13,5	2

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP/BS, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Výsledky ukazují, že hovězí sérum zvýšilo poměr hyf a pseudohyf k blastosporám. Při měřeních se tvořily neroztřepatelné shluky hyf a nebylo možno korektně spočítat jejich poměr k blastosporám. Kvůli tomu se výsledky u jednotlivých měření řádově lišily, což lze dokumentovat vysokými směrodatnými odchylkami viz Tab. 10 a 11.

V testech s farnesolem (data nejsou uvedena) bylo prokázáno, že farnesol s BS nesnižuje tvorbu klíčících hyf.

V médiu NYP probíhala indukce hyf podle očekávání. U hustoty suspenze kvasinek 10^7 cfu/ml se projevil quorum sensing efekt endogenního farnesolu, který zvýšil poměr blastospor k hyfám.

Vliv velikosti inokula na tvorbu klíčících hyf

Byla hledána nejvhodnější koncentrace suspenze kvasinek.

Tab. 12. Vliv velikosti inokula na morfologii *Candida albicans* ATCC 90028.

Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
10^7	75 ±10,5	0 ±0,7	24 ±10,7	8
10^6	63 ±11,6	0 ±0,0	32 ±16,6	8
10^5	64 ±13,9	0 ±0,3	36 ±13,8	8
10^4	57 ±10,8	0 ±0,0	44 ±10,8	8

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 13. Vliv velikosti inokula na morfologii *Candida albicans* VVK 25188.

Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
10^7	77 ±4,0	1 ±0,4	23 ±3,8	4
10^6	11 ±3,2	1 ±0,9	88 ±3,9	4
10^5	9 ±6,9	1 ±0,7	89 ±8,9	4
10^4	21 ±19,8	0 ±0,9	79 ±20,5	4

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 14. Vliv velikosti inokula na morfologii *Candida albicans* ATCC 44859.

Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
10 ⁷	57±23,5	1±0,5	43±23,0	2
10 ⁶	44±19,5	0±0,0	57±19,5	2
10 ⁵	33±10,5	1±0,0	67±10,0	2
10 ⁴	47±2,5	0±0,0	54±2,5	2

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Nejlépe výsledky poskytovala velikost inokula 10⁶cfu/ml viz Tab. 12, 13 a 14. Při menší koncentraci suspenze buněk nebyl při stanovování diferenciálního rozpočtu dostatečný soubor buněk pro průkazné výsledky. Při větší koncentraci se tvořily neroztřepatelné shluky hyf, které se lépe zachytávaly na stěnách zkumavky a velmi snižovaly možnost standardizace.

Vliv materiálu zkumavek

Vzhledem ke skutečnosti, že hyfy mají zvýšenou tendenci adherovat ke stěnám zkumavky oproti blastosporám, bylo třeba zvolit vhodný materiál, který by tento jev minimalizoval. Sklo se zdálo být vhodnou variantou k plastovým zkumavkám, které byly v průběhu experimentů používány.

Tab. 15. Vliv typu zkumavky na morfologii *Candida albicans* VVK 25188.

Materiál zkumavek	Konc.farnesolu při inkubaci [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
Sklo	0	23	1	76
	0+methanol	35	0	65
	3	42	0	58
	30	65	1	34
	300	99	0	1
Plast	0	18	0	82
	0+methanol	23	1	76
	3	14	0	86
	30	16	0	84
	300	35	0	65

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové/skleněné zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 15, adherence buněk na skleněný povrch byla značně omezena a v opakovaných pokusech se výsledky téměř nelišily. Proto jsme pro další testování použili skleněné zkumavky.

Standardní podmínky pro test indukce klíčních hyf

Byl standardizován test indukce klíčních hyf. Byly zvoleny následující podmínky. Jako růstové médium lze použít kterékoli ze čtyř testovaných, tzn. SGA a YPD, bujón i agar. Vhodné je indukční médium NYP, velikost inokula 10^6 cfu/ml, zkumavky ze skla.

4.2 Vliv farnesolu na tvorbu klíčních hyf

Vliv exogenního farnesolu na tvorbu klíčních hyf

Byl testován vliv farnesolu na potlačení tvorby klíčních hyf u *C. albicans*.

Tab. 16. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii *Candida albicans* ATCC 90028.

Konc.farnesolu při inkubaci [μ mol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
0	85 \pm 10,5	0 \pm 0,4	15 \pm 10,8	9
0+methanol	89 \pm 13,5	0 \pm 0,0	11 \pm 13,5	10
3	96 \pm 3,9	0 \pm 0,6	4 \pm 3,5	11
30	98 \pm 3,1	0 \pm 0,3	2 \pm 3,1	11
300	98 \pm 2,3	0 \pm 0,0	2 \pm 2,4	11

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 17. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii *Candida albicans* VVK 25188.

Konc.farnesolu při inkubaci [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
0	8±6,0	0±0,4	91±5,9	5
0+methanol	20±13,6	1±0,5	79±13,6	4
3	27±20,6	3±1,9	70±21,0	5
30	32±19,2	3±3,4	66±17,6	5
300	82±24,1	0±0,0	18±24,1	5

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 18. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii *Candida albicans* M 1008/08.

Konc.farnesolu při inkubaci [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
0	16±0,0	3±0,0	81±0,0	1
0+methanol	36±0,0	2±0,0	62±0,0	1
3	65±0,0	0±0,0	22±0,0	1
30	97±0,0	0±0,0	3±0,0	1
300	100±0,0	0±0,0	0±0,0	1

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tvorba klíčních hyf a reakce na farnesol závisí individuálně na zvoleném kmenu. Efekt farnesolu je zřetelný pouze u některých kmenů, které reagují útlumem tvorby klíčních hyf. Kmen ATCC 90028 tvořil klíční hyfy v malém množství, proto se efekt farnesolu téměř neprojevil viz Tab. 16. U kmenu VVK 25188 farnesol tlumil tvorbu klíčních hyf při nejvyšší koncentraci farnesolu (Tab. 17). Kmen M 1008/08 reagoval útlumem hyf přímo úměrným použité koncentraci farnesolu (Tab. 18).

Vliv preinkubace *C. albicans* s farnesolem na růstovém médiu na tvorbu klíčících hyf

Bylo testováno, zda přidání farnesolu do růstového média ovlivní tvorbu klíčících hyf při následné inkubaci v indukčním médiu.

Tab. 19. Vliv preinkubace *C. albicans* ATCC 90028 s farnesolem v tekutém médiu na tvorbu klíčících hyf v přítomnosti farnesolu.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]	Počet měření
0	0	80 ±7,9	0 ±0,5	20 ±8,3	5
0	0+methanol	94 ±3,9	0 ±0,0	7 ±3,9	4
0+methanol	0+methanol	92 ±8,4	0 ±0,8	7 ±7,7	5
0	3	95 ±2,8	0 ±0,4	5 ±2,6	5
3	3	99 ±1,1	0 ±0,0	1 ±1,1	5
0	30	96 ±3,4	0 ±0,0	4 ±3,4	5
30	30	100 ±0,4	0 ±0,4	0 ±0,0	5
0	300	97 ±2,6	0 ±0,0	3 ±2,6	5
300	300	100 ±0,0	0 ±0,0	0 ±0,6	5

Podmínky: růstové médium YPD (l), SGA (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Porovnáním hodnot u stejných koncentrací farnesolu při testu s preinkubací a bez ní bylo zjištěno, že preinkubace nemá významný vliv na diferenciální rozpočet viz Tab. 19.

Další pokusy byly proto rozšířeny o testování s preinkubací s farnesolem bez přídavku farnesolu do inkubačního média.

Tab. 20. Vliv preinkubace *C. albicans* ATCC 90028 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	90	0	10
0	0+methanol	98	0	2
0	3	98	0	2
0	30	98	0	2
0	300	100	0	0
0+methanol	0	88	0	12
0+methanol	0+methanol	91	0	9
3	0	97	0	3
3	3	99	0	1
30	0	89	1	10
30	30	96	0	6
300	0	81	1	18
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium YPD (s), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, skleněné zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 21. Vliv preinkubace *C. albicans* VVK 25188 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při inkubaci [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	0	0	100
0	0+methanol	1	0	99
0	3	3	3	94
0	30	7	4	84
0	300	86	0	14
0+methanol	0	7	0	93
0+methanol	0+methanol	8	0	92
3	0	12	1	87
3	3	9	0	91
30	0	2	0	98
30	30	3	1	96
300	0	5	0	95
300	300	69	1	30

Podmínky: růstové médium YPD (s), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, skleněné zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Tab. 22. Vliv preinkubace *C. albicans* 1008/08 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčících hyf v přítomnosti farnesolu.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při inkubaci [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	16	3	81
0	0+methanol	36	2	62
0	3	75	0	25
0	30	97	0	3
0	300	100	0	0
0+methanol	0	14	1	85
0+methanol	0+methanol	30	0	70
3	0	32	0	68
3	3	32	0	68
30	0	17	0	83
30	30	79	0	21
300	0	17	0	83
300	300	98	0	2

Podmínky: růstové médium YPD (s), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, skleněné zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Farnesol účinkuje pouze, pokud je přidán při inkubaci viz Tab. 20, 21, 22. Preinkubace neměla vliv na žádný z testovaných kmenů. *Candida albicans* na farnesol nejspíš reaguje pouze, pokud je přítomen v okolí, a nijak ho nezadržuje.

5. Diskuse

Problematika houbových onemocnění je stále aktuální a studie dokazují, že v dlouhodobém měřítku počet onemocnění způsobených vláknitými houbami i kvasinkami ve světě i České republice roste [11]. Účinnost a spektrum používaných antifungálních látek se díky novým antimykotikům zvyšují. Problémem jsou ovšem vznikající rezistence hub, časté a někdy i vážné nežádoucí účinky některých antimykotik, oslabování přirozené mikroflóry pacientů a vysoké náklady na léčbu mykóz. Proto se oblast výzkumu zaměřuje i na houbám vlastní látky, jejich roli v životním cyklu a při tvorbě biofilmů a možnost ovlivnění účinků antimykotik i diagnostických testů.

Jednou z takových látek u kvasinky *Candida albicans* je farnesol. Cílem diplomové práce je standardizovat test klíčních hyf pro hodnocení vlivu exogenně přidaného farnesolu na tvorbu klíčních hyf u *C. albicans*. Byl porovnán vliv jednotlivých parametrů testu na diferenciální rozpočet tří morfologických struktur kvasinky *C. albicans*.

Z růstových médií byl zkoušen Sabouraudův (SGA) tekutý bujón i pevný agar obohacené glukózou, dále nově zavedené médium YPD, tekuté i pevné. YPD obsahuje oproti SGA méně glukózy a peptonu a navíc obsahuje kvasnicový extrakt. Volba média neovlivnila znatelně výsledky testu. Ovšem variabilita v rámci každého média byla vysoká, proto jsme se pokusili tuto variabilitu snížit volbou vhodného indukčního média a velikosti inokula.

Jako indukční médium bylo testováno hovězí sérum a chemicky definované médium NYP. NYP je považováno za plnohodnotnou náhradu séra v testu klíčních hyf, v séru lze očekávat větší nárůst pseudohyf [46]. Hovězí sérum velmi silně indukovalo tvorbu klíčních hyf, ovšem hyfy během inkubace vytvořily neroztřepatelné shluky, které adherovaly na stěny zkumavky, a proto diferenciální rozpočet podával zkreslené informace o poměru hyf a blastospor. V séru se také tvořilo více pseudohyf než v NYP. V pokusech s farnesolem a hovězím sérem nebyl prokázán žádný vliv farnesolu v podobě zvýšení počtu blastospor oproti hyfám. V indukčním médiu NYP se ovlivnění diferenciálního rozpočtu farnesolem projevilo.

Naše výsledky odpovídaly výzkumu Mosela *et al.*, 2005 [30], který se věnoval výzkumu množství farnesolu potřebného pro 50% inhibici tvorby hyf. Uvedl, že potřebné koncentrace farnesolu při užití séra jako indukčního média byly řádově větší než při užití média YNB. Mosel použil jako indukční médium 10% roztok hovězího séra a YNB

obohacené N-acetylglukosaminem. Pro YNB s N-acetylglukosaminem stačila koncentrace 1 $\mu\text{mol/l}$ farnesolu pro poloviční inhibici tvorby hyf, pro 10% hovězí sérum bylo třeba 150 $\mu\text{mol/l}$. V našich pokusech jsme sérum neředili a ani koncentrace 300 $\mu\text{mol/l}$ nestačila k potlačení růstu klíčnicích hyf. Naproti tomu u NYP stačila koncentrace 3 $\mu\text{mol/l}$ k navození polovičního počtu hyf. Existuje několik hypotéz vysvětlujících příčiny potřeby vysokých koncentrací farnesolu k útlumu klíčnicích hyf v séru: 1. Sérum obsahuje albuminy, které nespecificky vážou lipofilní látky, tzn. i farnesol [30], 2. Sérum indukuje růst klíčnicích hyf mechanismem, na který farnesol nepůsobí [33]. Pro testování vlivu farnesolu je tedy důležitá volba správného indukčního média. Vhodnou variantou je médium NYP.

Dále byl sledován vliv velikosti inokula na test klíčnicích hyf. Hustota inokula, při které se začíná projevovat efekt quorum sensing je 10^6 cfu/ml [15]. Při nižších velikostech inokula bylo obtížné získat dostatek buněk pro diferenciální rozpočet. Při hustotě inokula větší než 10^6 cfu/ml se pravděpodobně uplatnil nežádoucí vliv endogenního farnesolu, který je produkován kvasinkami při vysoké denzitě buněk a který je odpovědný za zvýšení poměru počtu blastospor k hyfám.

V průběhu testování se projevila s nepříjemná vlastnost hyf - jejich schopnost adherovat na stěny používaných materiálů. Blastospory tuto schopnost neměly tak významnou, a proto v takových případech mohly odpovídat za falešně větší poměr s ohledem na klíčnicí hyfy. Problém byl minimalizován prodloužením doby roztřepávání před odběrem vzorku do Bürkerovy komůrky a změnou materiálu zkumavek. Místo plastových zkumavek byly použity skleněné.

Byl standardizován test indukce klíčnicích hyf pro testování vlivu farnesolu na klíčnicí hyfy. Byla ověřena rovnocennost nově zavedeného média YPD s médiem SGA. Jako růstové médium tedy může být použito kterékoli z testovaných, tzn. YPD a SGA, agar i bujón. Pro indukci klíčnicích hyf je výhodnější použít chemicky definované médium NYP. Koncentraci suspenze kvasinek jsme zvolili 10^6 cfu/ml. Pro zmenšení adhezivity hyf je vhodné prodloužit protřepávání před odběrem vzorku do Bürkerovy komůrky a použít skleněné zkumavky.

Testování s farnesolem bez preinkubace potvrdilo pozorování Mosela *et al.* [30], že farnesol brání přeměně blastospor na hyfy přímo úměrně jeho koncentraci, ale tento efekt je kmenově variabilní. Zatímco u jednoho kmenu došlo k inhibici tvorby hyf ze 70-80 % viz Tab. 17, u dalších se rozmezí lišilo (Tab. 16 a 18). Stejně tak se lišily potřebné koncentrace

farnesolu pro inhibici tvorby klíčních hyf o 50 %. U kmene ATCC 90028 se tato koncentrace pohybovala kolem 3 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 16) a u kmene VVK 25188 mezi 30 a 300 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 17).

Testy s preinkubací farnesolem na pevném i tekutém růstovém médiu vyloučily vliv preinkubace na indukci klíčních hyf. Farnesol nejspíš neovlivňuje morfologii bezprostředně, ale v závislosti na již nastartovaných fyziologických pochodech resp. fyziologickém statutu v jakém se kvasinkové buňky aktuálně nacházejí. Svou roli zde bude hrát nejspíše i samotná koncentrace farnesolu.

Farnesol má mnoho specifických účinků na kvasinku *C. albicans*, ovšem jeho působení můžeme sledovat i na jiných buňkách, ať už mluvíme o ostatních kvasinkách či bakteriích či lidských nádorových buňkách. Mechanismus jeho účinku na *C. albicans* ovšem ještě nebyl objasněn. Budoucí osud případného použití farnesolu v terapii kandidóz je zatím nejistý, podle některých hypotéz jej lze využít jako regulátoru patogenity kvasinek [33] či jako prostředku k zamezení vzniku biofilmů *C. albicans* [40].

Další práce zabývající se farnesolem jsou vedeny na katedře biologických a lékařských věd. Zjišťují minimální inhibiční koncentraci vybraných antimykotik u buněk *C. albicans* inkubovaných v přítomnosti farnesolu pomocí agarové difúzní metody a bujónové mikrodiluční metody, dále je to práce o vlivu farnesolu na tvorbu chlamydospor. Na katedře analytické chemie probíhá vývoj analytické metody pro stanovení farnesolu a tyrosolu v biologickém materiálu odebraném z pacientů s kandidovou infekcí.

6. Závěr

Shrnuli jsme nejdůležitější poznatky o quorum sensing molekule farnesolu a jeho účincích na *C. albicans*. Standardizovali jsme test indukce klíčních hyf pro testování vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf u *C. albicans*.

Navržené schéma testu: 24hodinovou kulturu *C. albicans* naočkujeme do bujónu SGA či YPD, inkubujeme 24 hodin s třepáním při 37°C; nebo z ní provedeme izolační roztěr na agar SGA či YPD, inkubujeme 24 hodin při 37°C. Poté buňky několikrát promyjeme vodou a připravíme z nich suspenzi ve vodě tak, aby výsledná velikost inokula při testu byla 10^6 cfu/ml. Do skleněné zkumavky napipetujeme tekuté médium NYP, roztok farnesolu v methanolu a suspenzi kvasinek. Podobným způsobem připravíme dvě kontrolní zkumavky, do první přidáme místo roztoku farnesolu živné médium, do druhé čistý methanol. Inkubujeme 3 hodiny při 37°C za stálého třepání. Před odběrem vzorku do Bürkerovy komůrky zkumavku důkladně protřepeme. Provedeme diferenciální rozpočet, tj. početní zastoupení blastospor, pseudohyf a hyf.

Pro indukci klíčních hyf bylo vhodnější indukční, chemicky definované médium NYP než bovinní sérum při optimální hustotě suspenze kvasinek 10^6 cfu/ml. Výsledky pokusů byly konzistentnější při provádění ve skleněných zkumavkách v porovnání s plastovými.

Studovali jsme vliv farnesolu na tvorbu klíčních hyf na čtyřech kmenech *C. albicans*. Farnesol inhiboval přeměnu blastospor na hyfy v závislosti na koncentraci a na použitém kmenu. U kmenu *C. albicans* VVK 25188 byla koncentrace farnesolu přímo úměrná inhibici růstu hyf.

Vliv složení média při preinkubaci testovaných kmenů s farnesolem na tvorbu klíčních hyf se pokusy nepotvrdil. Podobně, ani preinkubace s farnesolem neovlivňovala výsledky testu indukce klíčních hyf.

7. Použitá literatura

- [1] Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., Douglas, L. J. Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eucaryot. Cell*, 09/2006, s. 1770-1779.
- [2] Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vydání, Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [3] Cagnacci, S., Grasso, R., Marchese, A., Corvò, R., Debbia, E., Rossi, L. The Susceptibility of *Candida albicans* to Gamma-Radiations and Ketoconazole Depends on Transitional Filamentation. *Open Microbiol. J.*, 2008, 2. s. 66-73.
- [4] Dabrowa, N., Taxer S. S. S., Howard D. H. Germination of *Candida albicans* induced by proline. *Infect. Immun.* 13, 1976. s. 830–835.
- [5] Dorko, E., Baranová, Z., Boroš, E. Kandidové biofilmy na medicínských implantátoch. *Celostátní sjezd mikrobiologie a epidemiologie 2008*. Publikováno 16.9.2008 [cit. 6.1.2009]. Dostupné z <http://www.meritis.cz/dokumenty/kongresy/mikro-finalni-program.pdf>
- [6] Enjalbert, B., Whiteway, M. Release from Quorum-Sensing Molecules Triggers Hyphal Formation during *Candida albicans* Resumption of Growth. *Eucaryot. Cell*, 07/2005, s. 1203-1210
- [7] *Farnesol* [online]. Publikováno 7.12.2008 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/farnesol>
- [8] Fassatiová, O. *Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii: příručka k určování*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1979. 221 s.
- [9] Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria – the LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 1994, 176. s. 269-275.
- [10] Grünler, J., Ericsson, J., Dallner, G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 06/1994, 1212(3). s. 259-77.
- [11] Hamal, P. Kandidémie ve velkých českých nemocnicích: stále aktuální problém. *Celostátní sjezd mikrobiologie a epidemiologie 2008*. Publikováno 16.9.2008 [cit. 6.1.2009]. Dostupné z <http://www.meritis.cz/dokumenty/kongresy/mikro-finalni-program.pdf>

- [12] Haug, J. S., Goldner, C. M., Yazlovizskaya, E. M., Voziyan, P. A., Melnykovich, G. Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in the presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine. *Biochym Biophys Acta*, 08/1994, 1223(1). s. 133-40.
- [13] Hogan, Deborah A. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eucaryot. Cell*, 04/2006. s. 613-619.
- [14] Hornby, J. N. M., Jacobitz-Kizzir, S. M., McNeel, D. J., Jensen, E. C., Treves, D. S., Nickerson, K. W. Inoculum size effect in dimorphic fungi: Extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. s. 1356-1359.
- [15] Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K. W. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 07/2001. s. 2982-2992.
- [16] Hornby, J. M., Kebaara, B. W., Nickerson, K. W. Farnesol Biosynthesis in *Candida albicans*: Cellular Response to sterol inhibition by Zaragozic Acid B. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 07/2003. s. 2366-2369.
- [17] Hornby, J. M., Nickerson, K. W. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48. s. 2305-7.
- [18] Hughes, D. T., Sperandio, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.*, 02/2008, 6(2). s. 111-120.
- [19] Chen, H., Fink, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.*, 2006, 20. s. 1150-1161. ISSN 0890-9369/06.
- [20] Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., Fink, G., R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101. s. 5048-5052.
- [21] Isibor, J. O., Eghubare, A. E., Omoregie, R. Germ Tube Formation in *Candida Albicans*: Evaluation of Human and Animal Sera and Incubation Atmosphere. *Shiraz E-Medical Journal* 6, číslo 1 a 2, 01/2005 a 04/2005.
- [22] Jílek, P., Buchta, V., Kubanová, P., Forstl, M. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum 2002. 103 s. ISBN 80-246-0459-0.
- [23] Joshi, K. R., Bremner, D. A., Gavin, J. B., Herdson, P. B., Parr, D. N. The formation of germ tubes by *Candida albicans* in sheep serum and trypticase soya broth. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973, 60. s. 839-842.

- [24] Kügler, S., Sebghati, T. C., Eissenberg, L.G., Goldman, W. E. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97. s. 8794-8798.
- [25] Machida, K., Tanaka, T., Yano, Y., Otani, S., Taniquchi, M. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by cell cycle mechanism. *Microbiology*, 02/1999, 145(Pt 2). s. 283-9.
- [26] McAlester, G., O'Gara, F., Morrissey, J. P. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol*, 05/2008, 57(5). s. 563-9.
- [27] Meigs, T. E., Simoni, R. D. Farnesol as a regulator of HMG-CoA Reductase Degradation: Characterization and Role of Farnesyl Pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 09/1997, 345. s.1-9.
- [28] Miguel, K., Pradines, A., Tercé, F., Selmi, S., Favre, G. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal Biol. Chem.*, 10/1998, 273(40). s. 26179-86.
- [29] Miller, M., Bassler, B. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001, 55. s. 165–199.
- [30] Mosel, D. D., Dumitru, R., Hornby, J. M., Atkin, A. L., Nickerson, K. W. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71. s. 4938-4940.
- [31] Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S.A., Foster, K.R. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, 01/2008.
- [32] Navarathna, D. H. M. L. P., Hornby, J. M., Hoerrmann, N., Parkhurst, A. M., Duhamel, G. E., Nickerson, K. W. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of flukonazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, 56. s. 1156-1159.
- [33] Nickerson, K. W., Atkin, A. L., Hornby, J. M. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 06/2006. s. 3805-3813.
- [34] Oh, Ki-Bong, Miyazawa, H., Toschimichi, N., Hideaki, M. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *PNAS*, 05/2001. s. 4664-4668.
- [35] Otčenášek *et al.* *Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních*. Praha: Avicenum, 1990. 160 s. ISBN 80-201-0059-8.

- [36] Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 4.12.1997, s. 532-536
- [37] Palková, Z., Váchová, L. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30. s. 806-824.
- [38] Palonen, E. K., Brandt, A. M., Soini, J. T. In Search for Novel Quorum Sensing Molecules in Fermenting Fungi Using Oligonucleotide-based Microarrays. Publikováno 2006 [citováno 6.1.2009]. Dostupné z <http://www.quorumsensing.eu/index2.php?content=intro>
- [39] Popat, R., Crusz, A. S., Diggle, S. P. The social behaviours of bacterial pathogens. *Br. Med. Bull*, 2008, 87. s. 63-75.
- [40] Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11/2002. s. 5459-5463.
- [41] Shepherd, M. G., Sullivan, P. A. *Candida albicans* germ-tube formation with immobilized GlcNAc. *FEMS Microbiol. Lett.* 17, 1983. s. 167–170.
- [42] Sprague, G. F., Winans, S. C. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev.*, 2006, 20. s. 1045-1049.
- [43] Štork, Jiří. *Dermatovenerologie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2008. 502 s. ISBN 978-80-7262-371-6.
- [44] Thai, L., Rush, J. S., Maul, J. E., Devarenne, T., Rodgers, D. L., Chappell, J., Waechter, Ch. J. Farnesol is utilized for isoprenoid biosynthesis in plant cells via farnesyl pyrophosphate formed by successive monophosphorylation reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11/1999, 96(23). s. 13080-13085.
- [45] Tomšíková, A. *Nosokomiální mykózy*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003. 141 s. ISBN 80-246-0376-4.
- [46] Vejsová, M., Buchta, V. Presumptive identification of *Candida albicans* by rapid diagnostic tests. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 10/2006, 12(5). s. 180-3.
- [47] Vejsová, M., Voxová, B. *Laboratorní diagnostika houbových infekcí*. Přednáška. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2009.
- [48] Vodrážka, Z. *Biochemie*. 1. vydání, Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0439-4
- [49] Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2007, 362. s. 1119-1134.

- [50] Winzer, K., Hardie, K. R., Williams, P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry can't talk now – out to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, 5. s. 216-222.
- [51] Yeast identification. *Medical Mycology Procedure Manual*. Publikováno 21.7.2007 [citováno 25.3.2009] Dostupné z <http://www.doctorfungus.org/thelabor/sec12.pdf>

8. Seznam obrázků

Obr. 1. Morfologická stádia kvasinky Candida albicans.

Obr. 2. Biosyntéza steroidních sloučenin a místo vzniku farnesolu.

Obr. 3. Strukturní vzorec farnesolu.

Obr. 4. Schéma izolačního roztěru na Petriho misce.

9. Seznam tabulek

Tab. 1. Vliv podmínek růstu na morfologii kvasinky Candida albicans.

Tab. 2. Chemické a fyzikální vlastnosti farnesolu.

Tab. 3. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf zkoušení vlivu velikosti inokula.

Tab. 4. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf pro zkoušení vlivu farnesolu na morfologii Candida albicans.

Tab. 5. Složky přidané do zkumavek pro preinkubaci farnesolem v tekutém médiu.

Tab. 6. Složky přidané do zkumavek pro test klíčních hyf s preinkubací farnesolem v tekutém médiu.

Tab. 7. Morfologie Candida albicans ATCC 90028 v růstových médiích.

Tab. 8. Morfologie Candida albicans VVK 25188 v růstových médiích.

Tab. 9. Morfologie Candida albicans ATCC 44859 v růstových médiích.

Tab. 10. Morfologie Candida albicans ATCC 90028 v indukčních médiích v závislosti na velikosti inokula.

Tab. 11. Morfologie Candida albicans VVK 25188 v indukčních médiích v závislosti na velikosti inokula.

Tab. 12. Vliv velikosti inokula na morfologii Candida albicans ATCC 90028.

Tab. 13. Vliv velikosti inokula na morfologii Candida albicans VVK 25188.

Tab. 14. Vliv velikosti inokula na morfologii Candida albicans ATCC 44859.

Tab. 15. Vliv typu zkumavky na morfologii Candida albicans VVK 25188.

Tab. 16. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii Candida albicans ATCC 90028.

Tab. 17. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii Candida albicans VVK 25188.

Tab. 18. Vliv koncentrace farnesolu na morfologii Candida albicans M 1008/08.

Tab. 19. Vliv preinkubace C. albicans ATCC 90028 s farnesolem v tekutém médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

Tab. 20. Vliv preinkubace C. albicans ATCC 90028 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

Tab. 21. Vliv preinkubace C. albicans VVK 25188 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

Tab. 22. Vliv preinkubace C. albicans 1008/08 s farnesolem v pevném médiu na tvorbu klíčnicích hyf v přítomnosti farnesolu.

10. Seznam příloh

Příloha č. 1 – Výsledky pokusů při standardizaci testu indukce klíčnicích hyf.

Příloha č. 1 – Výsledky pokusů při standardizaci testu indukce klíčních hyf.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média, kmen ATCC 90028.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	71	0	29
	84	0	16
YPD (l)	65	0	35
	61	0	39
SGA (s)	82	1	17
	83	0	17
SGA (l)	77	0	21
	59	0	41

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média, kmen ATCC 44859.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	79	2	19
	90	1	9
YPD (l)	65	0	35
	74	0	26
SGA (s)	67	0	33
	64	0	36
SGA (l)	32	0	68
	34	0	66

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média a koncentrace suspenze kvasinek, kmen ATCC 90028.

Růstové médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	10 ⁷	72	0	15
	10 ⁶	63	0	37
	10 ⁵	71	0	29
	10 ⁴	58	0	42
YPD (l)	10 ⁷	62	0	38
	10 ⁶	41	0	59
	10 ⁵	74	0	26
	10 ⁴	46	0	54
SGA (s)	10 ⁷	59	1	40
	10 ⁶	60	0	40
	10 ⁵	71	0	29
	10 ⁴	50	0	50
SGA(l)	10 ⁷	72	0	28
	10 ⁶	60	0	40
	10 ⁵	59	0	41
	10 ⁴	81	0	19

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média a koncentrace suspenze kvasinek, kmen ATCC 44859.

Růstové médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	10 ⁷	80	0	20
	10 ⁶	63	0	37
	10 ⁵	22	1	77
	10 ⁴	44	0	56
SGA (s)	10 ⁷	33	1	66
	10 ⁶	24	0	76
	10 ⁵	43	0	57
	10 ⁴	49	0	51

Podmínky: růstové médium YPD (s), SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu indukčního média, kmen ATCC 90028.

Růstové médium	B [%]	PH [%]	H [%]
NYP	77	0	23
BS	28	8	64

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, BS, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média, indukčního média a koncentrace suspenze kvasinek, kmen ATCC 90028.

Růstové médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	Inkubační médium	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	10 ⁷	NYP	83	0	17
	10 ⁶		84	0	16
	10 ⁵		73	1	26
	10 ⁴		62	0	38
YPD (l)	10 ⁷	NYP	89	0	11
	10 ⁶		72	0	28
	10 ⁵		54	0	46
	10 ⁴		58	0	42
YPD (l)	10 ⁷	BS	-	-	-
	10 ⁶		9	0	91
	10 ⁵		8	3	89
	10 ⁴		15	7	78
SGA (s)	10 ⁷	NYP	88	0	12
	10 ⁶		68	0	32
	10 ⁵		78	0	22
	10 ⁴		52	0	48
SGA (l)	10 ⁷	NYP	71	2	27
	10 ⁶		58	0	42
	10 ⁵		34	0	66
	10 ⁴		45	0	55
SGA (l)	10 ⁷	BS	90	0	10
	10 ⁶		80	0	20
	10 ⁵		83	1	16
	10 ⁴		81	2	17

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, BS, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu růstového média, indukčního média a koncentrace suspenze kvasinek, kmen VVK 25188.

Růstové médium	Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	Inkubační médium	B [%]	PH [%]	H [%]
YPD (s)	10 ⁷	NYP	75	1	24
	10 ⁶		11	2	88
	10 ⁵		7	1	92
	10 ⁴		3	0	97
YPD (l)	10 ⁷	NYP	84	0	16
	10 ⁶		7	0	93
	10 ⁵		3	0	97
	10 ⁴		1	0	99
YPD (l)	10 ⁷	BS	3	0	97
	10 ⁶		2	2	96
	10 ⁵		0	0	100
	10 ⁴		0	0	100
SGA (s)	10 ⁷	NYP	74	0	26
	10 ⁶		11	0	89
	10 ⁵		6	1	93
	10 ⁴		29	0	71
SGA (l)	10 ⁷	NYP	76	0	24
	10 ⁶		16	0	82
	10 ⁵		21	2	74
	10 ⁴		49	2	49
SGA (l)	10 ⁷	BS	28	0	72
	10 ⁶		3	0	97
	10 ⁵		9	1	90
	10 ⁴		17	0	73

Podmínky: růstové médium YPD (l), YPD (s), SGA (l), SGA (s), inkubační médium NYP, BS, vel. inokula 10⁴ cfu/ml, 10⁵ cfu/ml, 10⁶ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu farnesolu na tvorbu klíčících hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	99	0	1
0+methanol	99	0	1
3	100	0	0
30	100	0	0
300	100	0	0

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	74	0	26
0+methanol	59	0	41
3	88	2	10
30	99	1	0
300	99	0	1

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf, kmen VVK 25188.

Konc.farnesolu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	8	0	92
0+methanol	-	-	-
3	27	6	67
30	45	9	53
300	92	0	8

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf, kmen VVK 25188.

Konc.farnesolu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	5	1	94
0+methanol	39	0	61
3	28	4	68
30	31	0	69
300	98	0	2

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu farnesolu na tvorbu klíčních hyf, kmen VVK 25188.

Konc.farnesolu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	10	1	89
0+methanol	18	1	81
3	64	3	33
30	60	1	39
300	100	0	0

Podmínky: růstové médium SGA (s), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu koncentrace suspenze kvasinek na účinek farnesolu, kmen ATCC 90028.

Konc. suspenze kvasinek [cfu/ml]	Konc.farnesolu při testu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
10^7	0+methanol	86	0	14
10^7	0	100	0	0
10^7	3	100	0	0
10^7	30	100	0	0
10^7	300	99	1	0
10^6	0+methanol	68	0	32
10^6	0	100	0	0
10^6	3	100	0	0
10^6	30	100	0	0
10^6	300	100	0	0
10^5	0+methanol	82	0	18
10^5	0	100	0	0
10^5	3	100	0	0
10^5	30	100	0	0
10^5	300	99	1	0
10^4	0+methanol	93	1	6
10^4	0	97	0	3
10^4	3	100	0	0
10^4	30	100	0	0
10^4	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium YPD (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu preinkubace s farnesolem na tvorbu klíčících hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu při preinkubaci [$\mu\text{mol/l}$]	Konc.farnesolu při testu [$\mu\text{mol/l}$]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	70	1	29
0	0+methanol	94	0	6
0+methanol	0+methanol	94	0	6
0	3	92	0	8
3	3	97	0	3
0	30	99	0	1
30	30	99	1	0
0	300	96	0	4
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium YPD (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10^6 cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu preinkubace s farnesolem na tvorbu klíčních hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	76	1	28
0	0+methanol	-	-	-
0+methanol	0+methanol	96	0	4
0	3	92	1	7
3	3	99	0	1
0	30	94	0	6
30	30	100	0	0
0	300	97	0	3
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium SGA (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu preinkubace s farnesolem na tvorbu klíčních hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	82	0	18
0	0+methanol	97	0	3
0+methanol	0+methanol	96	0	4
0	3	98	0	2
3	3	99	0	1
0	30	96	0	4
30	30	100	0	0
0	300	99	0	1
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium SGA (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu preinkubace s farnesolem na tvorbu klíčních hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	94	0	6
0	0+methanol	95	0	5
0	3	98	0	2
0	30	100	0	0
0	300	100	0	0
0	0+methanol	96	0	4
0+methanol	0+methanol	100	0	0
0	3	98	0	2
3	3	100	0	0
0	30	99	0	1
30	30	100	0	0
0	300	99	0	1
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium YPD (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.

Diferenciální rozpočet buněk, test vlivu preinkubace s farnesolem na tvorbu klíčních hyf, kmen ATCC 90028.

Konc.farnesolu při preinkubaci [μmol/l]	Konc.farnesolu při testu [μmol/l]	B [%]	PH [%]	H [%]
0	0	80	0	20
0	0+methanol	100	0	0
0	3	100	0	0
0	30	100	0	0
0	300	100	0	0
0	0+methanol	87	0	13
0+methanol	0+methanol	76	2	22
0	3	93	0	7
3	3	100	0	0
0	30	90	0	10
30	30	100	0	0
0	300	92	0	8
300	300	100	0	0

Podmínky: růstové médium YPD (l), inkubační médium NYP, vel. inokula 10⁶ cfu/ml, plastové zkumavky. B-blastospory, PH-pseudohyfy, H-hyfy.