

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Biofilmy patogenních kvasinek na hydrogelových kontaktních čočkách

Bc. Lucie Michalcová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Biofilms of pathogenic yeasts on hydrogel contact lens

Bc. Lucie Michalcová

Thesis
2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Michalcová**
Osobní číslo: **C16526**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie výroby a zpracování polymerů**
Název tématu: **Biofilmy patogenních kvasinek na hydrogelových kontaktních čočkách**
Zadávací katedra: **Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte rešerši na téma biofilmy tvořené patogenními kvasinkami.
2. Na základě postupů publikovaných v literatuře zaveďte metodu kvantifikace biofilmu patogenních kvasinek na mikrotitračních destičkách z plastových materiálů.
3. Zjistěte, jak patogenní kvasinky rodu *Candida* tvoří biofilm na běžně používaných hydrogelových kontaktních čočkách.
4. Dostupnými optickými a spektrálními metodami a fyzikálně mechanickými zkouškami zjistěte, jak se mění kvalita čočky.
5. Výsledky diskutujte
6. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Miroslav Večeřa, CSc.

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

Školitel diplomové práce:

RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

2. prosince 2017


Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



Ing. David Veselý, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval/a samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil/a, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11.5. 2018

Lucie Michalcová

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Miroslavu Večeřovi, CSc. za vstřícný přístup, odborné vedení a poskytnutí prostředků pro realizaci experimentální části diplomové práce. Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za intenzivní spolupráci při výzkumu a psaní diplomové práce, za její cenné rady a pomoc při zpracování této práce. Děkuji také RNDr. Lucii Bednárové, CSc. a Ing. Romaně Hadravové za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce.

ANOTACE

Tato práce se zabývá studiem biofilmů patogenních kvasinek na hydrogelových kontaktních čočkách. Konkrétně tu jsou popsány základní druhy rodu *Candida*, a to *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* a jejich schopnost vytvořit biofilm na plastových mikrotitračních destičkách. K těmto kvasinkám pak byla zvolena ještě bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Hlavní součástí práce pak je kontaminace hydrogelových kontaktních čoček těmito kvasinkami a studium kontaminovaných čoček. Cílem práce bylo zjistit, zda se hydrogelové čočky dokáží kontaminovat, kontaminaci dál šířit, a jaký vliv to na ně pak bude mít.

KLÍČOVÁ SLOVA

Candida albicans, *Candida parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, kontaktní čočky, biofilm, hilafilcon B.

ANNOTATION

This thesis deals with the study of biofilms of pathogenic yeasts on hydrogel contact lenses. Specifically, the basic types of *Candida*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* and their ability to form biofilms on plastic microtiter plates are described here. *Pseudomonas aeruginosa* was also selected in addition to these yeasts.

The main part of the thesis is the hydrogel contact lenses contamination with the yeasts and subsequent study of contaminated lenses. The aim of the work was to find out whether hydrogel lenses can be contaminated, to further spread the contamination, and what impact the contamination will have on them.

KEYWORDS

Candida albicans, *Candida parapsilosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, contact lenses, biofilm, hilafilcon B.

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 <i>Candida</i>	11
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.3 Biofilm	14
1.3.1 Biofilm u <i>C. albicans</i>	14
1.3.2 Biofilm u jiných druhů rodu <i>Candida</i>	15
1.3.3 Geny regulačních sítí pro různé fáze biofilmu kvasinek rodu <i>Candida</i>	15
1.4 Polymerní materiály	17
1.4.1 Úvod a rozlišení.....	17
1.4.2 Stereoizomerie	18
1.4.3 Struktura polymerů	19
1.4.4 Fázový stav	20
1.4.5 Molekulová hmotnost.....	21
1.4.6 Příprava syntetických polymerů	22
1.5 Používané polymerní materiály.....	24
1.5.1 Polystyren (PS).....	24
1.5.2 Polymery a kopolymery kyseliny akrylové a methakrylové	26
1.5.3 Hilafilcon B	28
1.6 Kontaktní čočky	29
1.6.1 Kontaminace kontaktních čoček.....	30
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
2.1 Chemikálie a přístroje	31
2.1.1 Chemikálie a roztoky potřebné pro práci s mikrotitračními destičkami	31
2.1.2 Chemikálie a roztoky potřebné pro izolaci DNA a následnou PCR	31
2.1.3 Roztok používaný pro omývání čoček	31
2.1.4 Látky používané pro rozpouštění kontaktních čoček	31
2.1.5 Používané kmeny.....	32
2.1.6 Agary a tekuté půdy.....	32
2.1.7 Přístroje.....	32
2.1.8 Ostatní materiály	33
2.2 Metodika	33

2.2.1	Kultivace mikroorganismů	33
2.2.2	Christensenova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách	34
2.2.3	Růžičkova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách.....	34
2.2.4	Kontaminace hydrogelových čoček kvasinkami <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i>	35
2.2.5	Izolace DNA z kontaminovaných čoček	35
2.2.6	PCR vzorků po izolaci DNA	36
2.2.7	Amplifikace úseků DNA vyizolovaných z kontaminovaných čoček.....	36
2.2.8	Inkubace kontaminované čočky v roztoku sacharózy	36
2.2.9	Kontaminace kontaktních čoček v časovém intervalu	37
2.2.10	Měření kontaminované a nekontaminované čočky pomocí infračervené spektroskopie metodou ATR FTIR.....	37
2.2.11	Omývání kontaminované čočky v roztoku přímo určenému pro kontaktní čočky	39
2.2.12	Rozpouštění kontaktních čoček	39
2.2.13	Botnání a stanovení extrahovatelného podílů kontaktních čoček	39
2.3	Výsledky a diskuze	40
2.3.1	Christensenova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách	40
2.3.2	Růžičkova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách.....	43
2.3.3	Kontaminace hydrogelových čoček kvasinkami <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i>	44
2.3.4	Izolace DNA z kontaminovaných čoček	46
2.3.5	Amplifikace úseků DNA vyizolovaných z kontaminovaných čoček.....	47
2.3.6	Inkubace kontaminované čočky v roztoku sacharózy	49
2.3.7	Kontaminace kontaktních čoček v časovém intervalu	51
2.3.8	Měření infračervených spekter kontaminované a nekontaminované kontaktní čočky	56
2.3.9	Omývání kontaminované čočky v roztoku přímo určenému pro kontaktní čočky	61
2.3.10	Rozpouštění kontaktních čoček	62
2.3.11	Botnání a stanovení extrahovatelného podílů kontaktních čoček	62
3	ZÁVĚR.....	65
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM TABULEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	77
	SEZNAM ZKRATEK	79

ÚVOD

Tato práce se zabývá tématem biofilmy patogenních kvasinek na hydrogelových kontaktních čočkách. Kontaktní čočky jsou v dnešní době velice využívanou náhradou za klasické dioptrické brýle. Především pro jejich praktické používání a odpadnutí nevýhod, které jsou s brýlemi spojeny. V dnešní době se kontaktní čočky vyrábějí především z hydrogelových, nebo silikon-hydrogelových polymerních materiálů, které zaručují propustnost kyslíku, a proto by tak při jejich nošení v přímém kontaktu s lidským okem nemělo docházet k poškození. Nevýhodou těchto kontaktních čoček je ale to, že při nedodržování správné hygieny a správného zacházení s nimi může dojít ke kontaminaci ať už bakteriemi, nebo kvasinkami. Při takové kontaminaci, právě z důvodu přímého kontaktu čočky s okem, může při lehké infekci dojít k zánětu spojivek, a ten při neléčení, nebo při dlouhodobé infekci vede až ke ztrátě oka. V této práci jsme se zabývali kontaminací hydrogelových kontaktních čoček kvasinkami *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Kvasinky rodu *Candida* jsou totiž častým mikroorganismem, který se běžně vyskytuje na kůži lidí, zvířat, ale i např. v přírodě na povrchu některých rostlin. Pro běžného člověka tyto kvasinky nejsou ohrožující, ale výrazně ohrožují pacienty, kteří mají sníženou imunitní schopnost. Často jsou infekce, které jsou způsobeny těmito kvasinkami, nazývány jako nozokomiální infekce, a to proto, že se jimi lidé nakazí v nemocnici většinou po kontaktu s plastovými pomůckami např. nitrožilními katétry. Dalším mikroorganismem, se kterým jsme pracovali byla *Pseudomonas aeruginosa*, což je gram-negativní bakterie, která stejně jako *C. albicans* způsobuje infekce u lidí s oslabenou imunitní schopností. Tato bakterie se často vyskytuje v plicích pacientů, kteří mají cystickou fibrózu. Produkuje pigment pyocyanin, který zhoršuje infekce způsobené touto bakterií, protože poškozuje řasinkový epitel v plicích. V experimentální části jsme se nejdříve zabývali produkcí biofilmu u kvasinek *C. albicans*, *C. parapsilosis* a bakterie *P. aeruginosa* na polystyrenových mikrotitračních destičkách a v druhé části kontaminací hydrogelových kontaktních čoček kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis* a jejich dalšími zkouškami. Cílem práce bylo zjistit, zda tyto kvasinky a bakterie produkují biofilm, v jaké míře a pak zda dokáží tyto kvasinky biofilm tvořit i na kontaktních čočkách.

1 TEORETICKÁ ČÁST

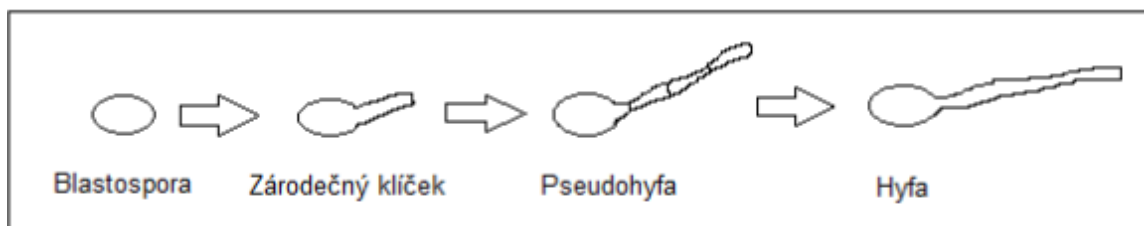
1.1 *Candida*

Houby jsou v přírodě všudypřítomné a existují jako volně žijící organismy, z nichž některé mohou parazitovat na zvířatech a lidech, nebo mohou mít s lidmi a s jejich přirozenou mikroflórou komenzální vztah [1]. Mezi tyto mikroorganismy patří také několik zástupců rodu *Candida*. Tento rod je velice různorodý a zahrnuje okolo 150 druhů kvasinek. Zhruba 15 z těchto druhů je známo svou schopností způsobit onemocnění. Nejdůležitější je bezesporu *Candida albicans*, zodpovědná za většinu kvasinkových infekcí zaznamenaných v celosvětovém měřítku [2]. K dalším klinicky významným druhům rodu *Candida* patří ještě *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* a *Candida krusei* [3].

Patogenní kvasinky rodu *Candida* žijí jako komenzálové u zdravých lidí v dutině ústní, v gastrointestinálním traktu a u žen ve vaginálním kanálu. *Candida albicans* se kromě lidí vyskytuje i u jiných primátů, domácích zvířat a ptáků [4]. *C. albicans* může způsobit infekci a to, pokud je narušena rovnováha přirozené mikroflóry například při dlouhodobém užívání antibiotik, při oslabení imunitního systému hostitele, nebo při poškození epiteliálních bariér organismu např. intravenózními katétry, operacemi [5]. Tyto infekce se dělí na povrchové infekce kůže a sliznic a invazivní kandidózy, kdy se houba může šířit v celém krevním oběhu a infikovat prakticky jakýkoliv orgán [6].

Infekce, které může *C. albicans* způsobovat, jsou podmíněny vstupem do tělních dutin a následným rozšířením v těle. Infekce může být buď potlačena, nebo může vést k onemocněním, které jsou způsobeny poškozením buněk konkurenčním metabolismem, produkcí toxických metabolitů kvasinkou, replikací houby, nebo imunitní odpovědí. I když je k dispozici mnoho informací o molekulární bázi bakteriální patogeneze, je méně známo o mechanismech patogenity houby [1].

U *C. albicans* můžeme nalézt schopnost tvoření pseudohyf a hyf, což je vláknitá forma kvasinky a jedná se tedy o morfologickou přeměnu (Obr. 1) z klasické kulaté formy [3]. Tato schopnost je považována za jeden z faktorů virulence, který u kvasinky pozorujeme [5]. Schopnost tvorby hyf není spojená jenom s virulencí, ale hyfy se také začnou tvořit, pokud má buňka omezený přístup k živinám a takto si je lépe může získat z okolí [3].

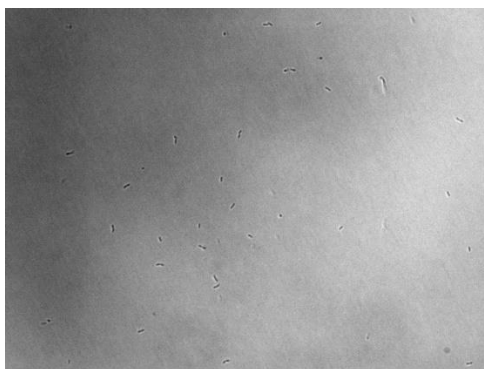


Obrázek 1 Morfologické přeměny *C. albicans*.

Mezi další faktory virulence a činnosti, které přispívají k patogenitě, můžeme zařadit tvorbu adhezínů (molekuly, které zprostředkovávají adhezi a invazi kvasinky do hostitelského organismu), sekreci hydrolytických enzymů (proteázy, lipázy, hemolyziny), tvorbu biofilmu a řadu dalších atributů [2,7]. Právě schopnost tvorby biofilmu je jedním předmětem experimentální části diplomové práce.

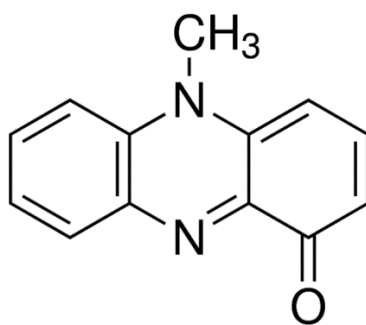
1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (Obr. 2) je aerobní, nefermentující bakterie, s jasnou morfoloickou, biochemickou a antigenní charakteristikou, která se řadí mezi gram-negativní bakterie, a která stejně jako *C. albicans* patří mezi oportunní patogeny. Osidluje sliznice, hlavně dýchacích cest a močových cest, u hostitelů se sníženou imunitou. Způsobuje nozokomiální infekce a u pacientů s cystickou fibrózou může způsobovat chronické plicní infekce. Ve velkém množství se tedy může vyskytovat v prostředí nemocnic, kde jsou touto bakterií kontaminovány dýchací přístroje, katétry atd. Při infekci se ze strany bakterie uplatňují faktory, které jsou přímo vázané na buňku bakterie (slizová vrstva, extracelulární polysacharid, stěnový lipopolysacharid) a extracelulární produkty, což jsou toxiny, enzymy, pigmenty. Dochází tedy k vytvoření neprostupného biofilmu a k uvolňování velkého množství arzenálu faktorů virulence, což způsobuje zvýšení odolnosti vůči velkému rozmezí antibiotik a ztěžuje se tak její odstraňování z organismu [8,9]. Odolnost vůči antibiotikům je do určité míry způsobena i tím, že membrána bakterie má nízkou propustnost a tím pádem se zpomaluje rychlost pronikání molekul antibiotika do buněk [10].



Obrázek 2 Bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Mezi pigmenty které *P. aeruginosa* může vytvářet patří pyomelanin, pyocyanin, pyoverdin a pyorubin. Modrozelený pyocyanin (5-*N*-methyl-1-hydroxyfenazin) se řadí jako jeden z faktorů virulence, protože při jeho vytvoření bakterií v dýchacích cestách způsobuje poškození řasinkového epitelu, což u pacientů s oslabenou imunitou při dlouhodobé kolonizaci může způsobit až smrt [11]. Pigmenty, které *P. aeruginosa* produkuje fungují jako agresivní činidla. Toxicita pyocyaninu je přičítána jeho schopnosti vytvářet reaktivní druhy kyslíku v důsledku redoxního cyklu. Pyocyanin podléhá neenzymatické redukci NAD(P)H a redukovaný pigment rychle reaguje s produkovaným molekulárním kyslíkem na superoxid, který dismutuje na peroxid vodíku. Přítomnost těchto oxidantů může indukovat oxidační stres v citlivých buňkách [12]. Při terapii je nutné rozlišovat kratší kolonizaci bakterií a vzniklou infekci, která je nutná léčit ihned. Mezi používaná antibiotika nazývaná protipseudomonádové peniciliny patří tikarcilin, piperacilin, azlocilin, popřípadě v kombinaci s inhibitory β -laktamázy gantamicin, kolistin, polymyxin B, ciprofloxacin, ceftazidin a ofloxacin, [9,13,14].



Obrázek 3 Strukturní vzorec pigmentu pyocyanin (převzato z [15]).

1.3 Biofilm

Biofilm je mnohobuněčný shluk, který roste na povrchu tkání, nebo na abiotických površích, např. na zdravotnických prostředcích, jako jsou katétry, zubní protézy a také na různých površích v přírodě. Buňky v biofilmech vykazují vyšší lékovou rezistenci ve srovnání s geneticky identickými planktonickými buňkami (nepřichycené buňky, které rostou v kapalně kultuře), což je způsobeno různorodostí morfologie (kvasinky, pseudohyfy, hyfy) a metabolického stavu (aktivní a pasivní růst) v populaci. Kromě toho materiál extracelulární matrix, který je charakteristický pro biofilmy, může zabraňovat antifungálním lékům v pronikání k buňkám, a snižovat tak jejich účinnou koncentraci. A také má schopnost udržovat živiny uvnitř biofilmových buněk [2]. Společenstva buněk v biofilmech se rovněž zapojují do signalizačních procesů, včetně *quorum sensing*, odpovědi na hustotu buněk, která ovlivňuje jejich růst a morfogenezi, která pravděpodobně podporuje přežití v hostiteli [3]. Je důležité si také uvědomit skutečnost, že biofilmy mají proměnlivou strukturu a složení matrix, lišící se mezi druhy a kmeny [2].

1.3.1 Biofilm u *C. albicans*

Předpokládá se, že jedním z hlavních důvodů, které přispívají k virulenci rodu *Candida* je jeho všestrannost, schopnost přizpůsobit se různorodým prostředím a vytvářet povrchově spojené mikrobiální shluky, známé jako biofilmy. Vývoj biofilmu u rodu *Candida* je složitý proces zahrnující jemné změny exprese genů, které vyžadují komplexní a dobře koordinované regulace. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. glabrata* jsou dobrými producenty biofilmu, a právě přítomnost biofilmu během infekce souvisí s vyšší úmrtností a morbiditou, ve srovnání s izoláty neschopnými tvořit biofilm [2].

Chandra a kol. [16] analyzoval časové průběhy vývoje biofilmu u *C. albicans* a došel k názoru, že vývoj biofilmu probíhá ve fázích. Použil inokulum kvasinkových buněk, protože jejich výskyt v této formě je častější než výskyt dlouhých vláknitých buněk, které mají schopnost se šířit dále do nových lokalit. V počátečním stádiu se k substrátu adherovaly jednotlivé kvasinkové buňky. Poté proliferovaly a vytvořily mikrokolonie a koalescencí (shlukováním) mikrokolonií se vytvořila bazální vrstva biofilmu. Vývoj biofilmu pak vstoupil do prostřední fáze vysoké metabolické aktivity charakteristické vznikem hyf a produkcí extracelulární matrix. V konečném stupni dozrávání došlo k rozsáhlé akumulaci materiálu extracelulární matrix. Zjistil také, že v době přechodu do meziprojektu bylo dosaženo výrazného snížení citlivosti na flukonazol, amfotericin B, nystatin a chlorhexidin současně se zvýšením metabolické aktivity a akumulace matrixového materiálu. Toto zjištění je v souladu

s novějšími studii, které odhalují, že vazba léků extracelulární matrix je hlavním zdrojem rezistence k biofilmům [17].

Za konečný krok při tvorbě biofilmu lze považovat uvolňování buněk, což umožňuje osidlování nových míst a s tím spojené rozšiřování infekce. Uppuluri a kol. [18] zjistili, že buněčná disperze (buňky které se volně pohybují a nemnoží se) se vyskytuje při celém procesu vývoje biofilmu a nepředstavuje časově odlišnou fázi. Buňky uvolněné z biofilmů byly převážně kvasinkové buňky, nikoliv hyfální. Překvapivě byly uvolněné buňky fenotypicky odlišné od buněk pěstovaných v planktonické kultuře po stejné časové období ve stejném médiu. Tyto buňky dále vykazovaly vyšší úroveň adheze k plastům, nebo endoteliálním buňkám, pravděpodobně kvůli jejich zvýšené tvorbě hyf v prostřední fázi vývoje biofilmu. Navíc uvolněné buňky byly virulentnější než planktonické buňky. Tedy biofilmová disperze (shluky buněk, které vytvořily biofilm a dále se z něj uvolňující nové buňky) poskytuje jedinečné kvasinkové buňky, se zvýšenou schopností vyvářet nové biofilmy a způsobovat infekci [17,19].

1.3.2 Biofilm u jiných druhů rodu *Candida*

U *C. albicans* struktura biofilmu obvykle sestává ze dvou vrstev: vrstva bazálních blastospor pokrytá hustým matrixovým filmem s hyfálními formami buněk [20]. Ve srovnání s *C. albicans* jsou biofilmy *C. parapsilosis* mnohem méně tlusté, tvořené agregovanými kvasinkovými buňkami a pseudohyfy [21]. V případě *C. tropicalis* jsou zralé biofilmy obvykle charakterizovány hustou sítí kvasinkových buněk se zřetelnými filamentózními morfologiemi. Na rozdíl od tohoto druhu jsou biofilmy *C. glabrata* charakterizovány kompaktní mono, nebo vícevrstvou pouze s blastosporami, protože tento druh není schopen tvořit vláknité formy [22].

Sacharidy, proteiny, fosfor a hexosaminy jsou hlavními složkami biofilmové matrix *C. albicans*. V případě *C. parapsilosis*, Silva a kol. [21] uvádí, že extracelulární matrix obsahují velké množství sacharidů, množství bílkovin je však nižší než u jiných druhů. Matrix *C. glabrata* a *C. tropicalis* jsou také složeny z proteinů a sacharidů, ale *C. glabrata* má vyšší hladiny ve srovnání s *C. tropicalis* [2].

1.3.3 Geny regulačních sítí pro různé fáze biofilmu kvasinek rodu *Candida*

Slizniční infekce mohou souviset s biofilmy v tom, že patogen přilne k povrchu a produkuje extracelulární matrix [23]. Tento vztah dal impulz k testování hypotézy, že geny potřebné pro tvorbu biofilmu *in vitro* mohou být také nutné pro slizniční infekci. Závěry z těchto

studií potvrdily užitečnost tohoto zkoumání tím, že existuje několik běžných genetických požadavků na tvorbu a vývoj biofilmů na abiotických (neživých) a mukózních površích [24].

Samostatné vývojové fáze biofilmů (adheze, kolonizace, zrání a rozptýlení) jsou řízeny komplexními molekulárními ději. Tvorba biofilmu je silně závislá na podmínkách prostředí, což neumožňuje srovnání regulačních genetických změn mezi druhy *Candida* [2]. Je třeba také poznamenat, že celý genom je znám u *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* a *C. lusitaniae* [25].

Přilnavost buněk *Candida* na slizniční povrchy a/nebo syntetický materiál je počáteční krok vedoucí k proliferaci a následně k tvorbě biofilmu a infekci [21]. Adhezní mechanismus je založen na interakci mezi buněčnou stěnou mikroorganismu a buněčnými povrchy hostitele. Tímto způsobem se na adhezi podílejí hostitelské buňky, houbové buňky a také podmínky prostředí [26].

Změna řízení tvorby biofilmu konkrétně adhezního procesu může být dosažena mikrobiálními adheziny, receptory hostitelských buněk, nebo fyzikálními a chemickými manipulacemi [27]. Přítomnost specifických proteinů buněčné stěny, označovaných normálně jako adheziny, je spouštěcím faktorem v modulaci adhezního procesu [22].

U *C. albicans* je adheze zprostředkována proteiny Als (agglutinine-like sequence), konkrétně Als1-7 a 9, a všechny proteiny mají podobnou strukturu obsahující N-terminální sekreční signální sekvenci [7]. Als1 a Als3 proteiny se podílejí na připevňování povrchu biofilmu, jejich exprese se však liší v závislosti na morfologii buněk *C. albicans* [28]. V případě *ALS1* je exprese detekovatelná jak v morfologii kvasinek, tak v hyfální buňce, ale *ALS3* je nalezena pouze u hyfální buňky. Z osmi *ALS* genů se uvádí, že *ALS1*, *ALS3* a *ALS5* jsou zapojeny do adheze *C. albicans* k různým biotickým substrátům [2]. Rodiny adhezínů jsou u patogenních kvasinek rozsáhlejší než u *S. cerevisiae*, jak se ukázalo díky sekvenování genomů [29].

Eap1 je protein buněčné stěny, jenž je s povrchem buňky spojen tzv. GPI-kotvou (glykosylfosfatidylinositol-dependentní) a který se podílí na adhezi buňka-buňka u *C. albicans* [30]. Tento protein zprostředkovává povrchovou vazbu a jeho syntéza je regulována transkripčním faktorem *EFG1* [31].

Hwp1, hyfální protein buněčné stěny, je mannoprotein houbových buněčných stěn, který podporuje připojení buněk *Candida* na hostitelský povrch [32]. Byl to první buněčný povrchový protein popsáný jako *in vivo* pro tvorbu biofilmu *C. albicans* [33].

Buněčný povrchový protein Pga10 a sekretovaný protein Pbr1 jsou také popsány jako důležité pro plnou adhezi biofilmů *C. albicans* [34].

U *C. parapsilosis* byla adheze k epiteliálním a akrylovým povrchům spojena s hydrofobií na povrchu buněk, navíc *C. parapsilosis* má větší schopnost adherovat k epiteliálním buňkám než *C. albicans* [35].

U *C. tropicalis* bylo identifikováno 16 členů rodiny *ALS* v genomu, je však nutný dodatečný výzkum o jejich zapojení do vývoje biofilmu [29].

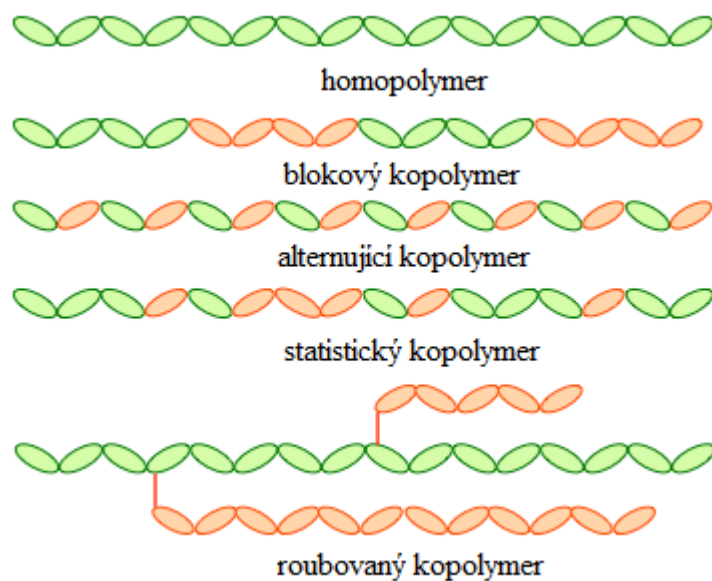
Podobně jako u *C. albicans* je adherence *C. glabrata* zprostředkována epiteliálními adheziny (Epa), které mají podobnou strukturu jako proteiny Als [22]. Rodina genů *EPA* se skládá ze 17-23 genů, v závislosti na kmeni, avšak *EPA1*, *EPA6* a *EPA7* jsou nejdůležitějšími adheziny [36].

1.4 Polymerní materiály

1.4.1 Úvod a rozlišení

Polymery jsou z chemického hlediska především organické látky přírodního, nebo syntetického původu. Jejich hlavním znakem je to, že obsahují makromolekuly, v nichž se opakuje základní konstituční jednotka mer. Délku daného polymeru (jeho makromolekuly) můžeme vyjádřit molekulovou hmotností. Neexistuje žádná hranice, která by byla stanovena při rozdělování látek na nízkomolekulární a makromolekulární, bere se však, že pokud má látka molekulovou hmotnost vyšší jak 10^3 g/mol, řadí se mezi makromolekulární [37].

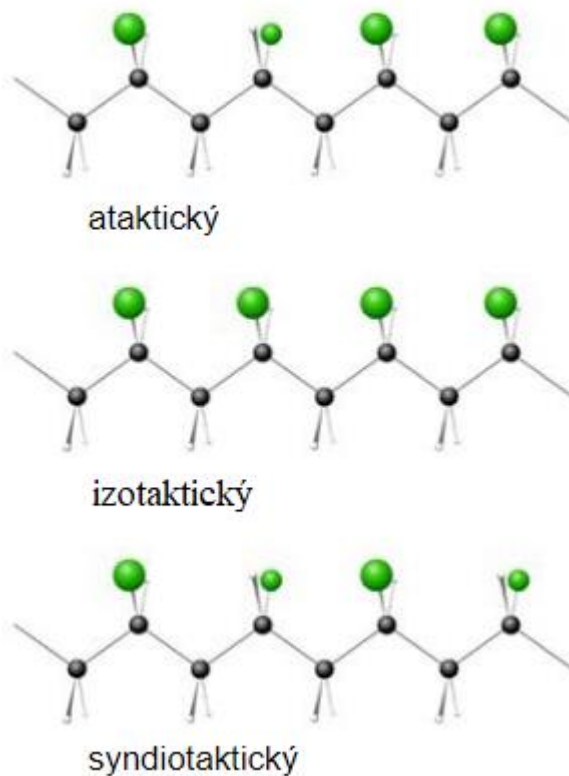
Některé makromolekulární látky obsahují ve svém řetězci mery jednoho druhu a některé různých druhů (Obr. 4). Makromolekulární látky, které obsahují mery jednoho druhu se nazývají homopolymery, k nimž patří např. polystyren, polybutadien, polyetylen a další. Ty, co obsahují ve svém makromolekulárním řetězci mery různého druhu se nazývají kopolymery, jenž dále můžeme dělit na statistické, blokové, alternující a roubované. Statistické řetězce jsou tvořeny nepravidelně, nahodile, blokové jsou tvořeny bloky, a to dvěma nebo více bloky meru stejného druhu, alternující obsahují dva monomery, které se střídají v pořadí a roubované mají v základním řetězci merů stejného druhu naroubovaný řetězec merů jiného druhu. Statistické se liší od roubovaných a blokových, protože kopolymerní bloky jsou velké na to, aby výsledný roubovaný, nebo blokový kopolymer neztratil vlastnosti, které odpovídají daným homopolymerům, ale aby sčítal jejich klady a zároveň měl vlastnosti, které nemá žádný z homopolymerů [38,39].



Obrázek 4 Možnosti uspořádání monomerů v makromolekulárním řetězci (převzato a upraveno z [40]).

1.4.2 Stereoizomerie

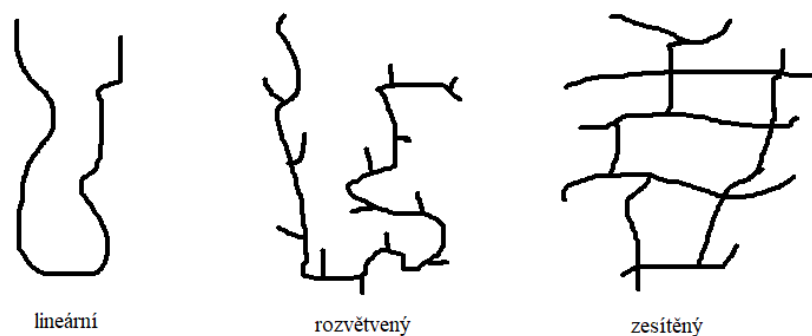
Stereoizomerie (Obr. 5) se nachází u polymerů, které vznikají z monomerů, u kterých je dvojná vazba a které mají tzv. asymetrický uhlík (atom ze kterého nevycházejí ani dvě rovnocenné vazby). Pokud vznikne polymer, kde se náhodně pospojují molekuly monomeru, vznikne struktura, která není symetrická a nazývá se ataktický polymer. Když se spojí molekuly monomeru a je tam určitá pravidelnost, vznikne taktický polymer, který se pak dále dělí na izotaktický a syndiotaktický. Izotaktický má substituenty na řetězci uspořádané v jedné rovině, syndiotaktický má substituenty řazené střídavě do jedné a druhé roviny, tedy se při pozorování jeví zrcadlově obrácené [38].



Obrázek 5 Schématické znázornění stereoizomerie u polypropylenu (převzato a upraveno z [41]).

1.4.3 Struktura polymerů

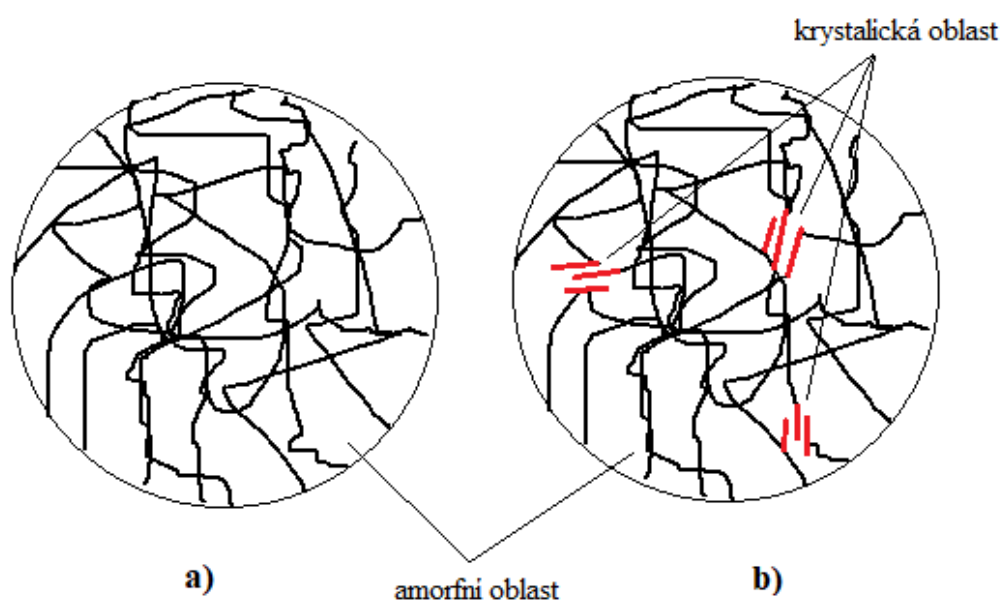
Makromolekuly mohou mít tvar lineární, rozvětvený nebo zesítěný (Obr. 6). Lineární polymery vznikají reakcí monomerů, které mají dvě funkční skupiny. Jsou tedy bez postranních řetězců a větvení. U rozvětvených polymerů nalezneme na hlavním makromolekulárním řetězci boční krátké substituenty. U takového polymeru dochází k zeslabování sil mezi makromolekulami a tím ke snížení pevnosti takového polymeru. Zesítěné polymery vznikají z lineárních, kdy se řetězce mezi sebou spojují příčnými vazbami. Takové polymery mají vyšší tvrdost, tepelnou odolnost a je snížena jejich rozpustnost a tavitelnost [37].



Obrázek 6 Struktura polymerů.

1.4.4 Fázový stav

Tím že polymery mají vysokou molekulovou hmotnost je dáno, že jejich bod varu se nachází nad teplotou jejich rozkladu, tedy plynný stav u nich neexistuje. Mohou být ve stavu kapalném, nebo tuhém. Podle toho, jaké mají geometrické uspořádání řetězců v pevné fázi máme buď stav vysoce uspořádaný, tedy krystalický a více méně neuspořádaný stav, tedy amorfní. Na rozdíl od nízkomolekulárních látek se u polymerních látek vyskytuje přechodný stav mezi sklovitým a kapalným a to kaučukovitý. Takový polymer jde malou silou deformovat, a proto jej nelze specifikovat jako tuhou látku, ale zároveň ani jako kapalnou, protože při deformaci nedochází k nevratnému toku. Stav si tedy můžeme rozdělit na amorfní (sklovitý), kam patří kaučukovitý a plastický a na stav krystalický [38]. U amorfního stavu jsou makromolekuly jen jako náhodná klubka, která mohou být spletena. (Semi)krystalický stav je, kdy makromolekuly jsou uspořádány a kolem nich makromolekuly v amorfním, tedy neuspořádaném stavu (Obr. 7). Kolik je v polymeru krystalického obsahu vyjádříme stupněm krystalinity, který je závislý na strukturních podmínkách makromolekuly, ale také na způsobu a podmínkách zpracování [37].



Obrázek 7 Schéma struktury polymerů a) polymer amorfní, b) polymer semikrystalický.

Důležitá je také schopnost krystalizace polymerů a o té rozhodují hlavně tyto faktory: geometrická pravidelnost makromolekulárního řetězce, polarita skupin řetězce, ohebnost řetězce a velikost substituentů, které jsou na něm navázány.

Polymery se snahou k samovolné krystalizaci jsou většinou filmtvorné, vláknovité, a termoplastické, mají vysokou houževnatost a pevnost. Rychle přecházejí z pevné fáze do taveniny, a proto se převážně moc nehodí ke zpracovávání vytlačováním, válcováním atd., ale naopak se používají postupy, které potřebují rychlé roztavení, což je zvláknování, vstřikování atd. Do této skupiny spadají např. polyethylen, polypropylen, polyamid.

Polymery nekystalizující samovolně, ale až změnou teploty, nebo pod napětím mají většinou za normálních podmínek kaučukovitou povahu, jsou elastické, termoplastické. Charakteristicky se zpracovávají vytlačováním, lisováním a válcováním. Do této skupiny patří např. izoprenový kaučuk, přírodní kaučuk, butylkaučuk.

Polymery nekystalizující vůbec jsou většinou transparentní, křehké, najdeme tady reaktoplasty i termoplasty. Zpracovávat se dají skoro všemi dostupnými technologiemi kromě zvláknování (amorfní povaha nedodává připraveným vláknům dostatečnou pevnost při použití). Do této skupiny náleží např. polyvinylchlorid, polystyren, polymethylmethakrylát [38].

1.4.5 Molekulová hmotnost

Důležitou vlastností, kterou se prezentují polymery je jejich vysoká molekulová hmotnost. Znalost této veličiny je důležitá k úplné charakterizaci daných makromolekulárních látek. Její hodnota určuje chování polymerů za různých podmínek. Od nízkomolekulárních látek se polymery odlišují taky tím, že délka řetězců jedné a té samé makromolekulární látky není stejná. Proto u polymerních materiálů nemůžeme molekulovou hmotnost považovat za stejnou, jako u látek nízkomolekulárních, ale stanovuje se statisticky distribuce molekulových hmotností a z toho se pak vypočítá střední molekulová hmotnost. Pro popis se používá distribuční křivka, tj. závislost hmotnosti polymeru o určité velikosti makromolekuly na velikosti makromolekulárního řetězce. Můžeme rozlišovat tři nejdůležitější způsoby vyjádření molekulové hmotnosti. Nejdůležitější hodnotou je číselně střední průměr molekulové hmotnosti (\bar{M}_n):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (1)$$

Kde: M_i je relativní molekulová hmotnost, N_i počet molekul o této molekulové hmotnosti.

Číselnou molární hmotnost nám poskytují experimentální metody, u kterých je měřená veličina závislá na počtu daných molekul. Druhou důležitou molekulovou hmotností je

hmotnostně střední průměr molekulové hmotnosti (\bar{M}_w), který nám poskytují experimentální metody, u kterých je měřená veličina závislá na hmotnosti daných molekul.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (2)$$

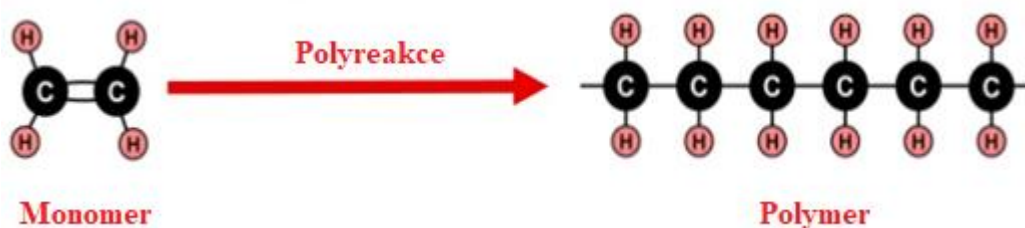
Jako třetí důležitá molekulová hmotnost je \bar{M}_z , tedy z-průměr molekulové hmotnosti

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_i N_i M_i^3}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (3)$$

Polydisperzita (\bar{D}) neboli míra neuniformity velikosti částic je definována jako poměr \bar{M}_w/\bar{M}_n . Monodisperzní systém má hodnotu $\bar{D}=1$, polydisperzní $\bar{D}>1$. Každá vyjádřená molekulová hmotnost je citlivá k jiným velikostem frakcí, tedy $\bar{M}_z > \bar{M}_w > \bar{M}_n$. Hodnoty \bar{M}_z a \bar{M}_w nám vyjadřují větší molekuly, zatímco hodnota \bar{M}_n nám vyjadřuje menší molekuly [38,42,43].

1.4.6 Příprava syntetických polymerů

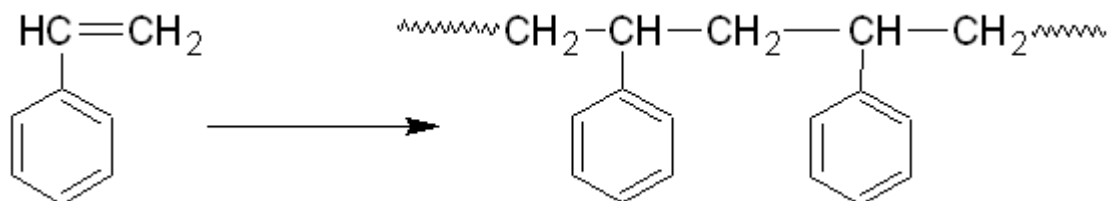
Syntetické polymery se připravují polyreakcemi (Obr. 8) z nízkomolekulárních látek a to následujícími: polymerace, polykondenzace a polyadice. Jsou to reakce, při kterých výchozí látka monomer přechází ve vysokomolekulární produkt polymer.



Obrázek 8 Ukázka vzniku polymeru polyreakcí z monomeru (převzato a upraveno z [44]).

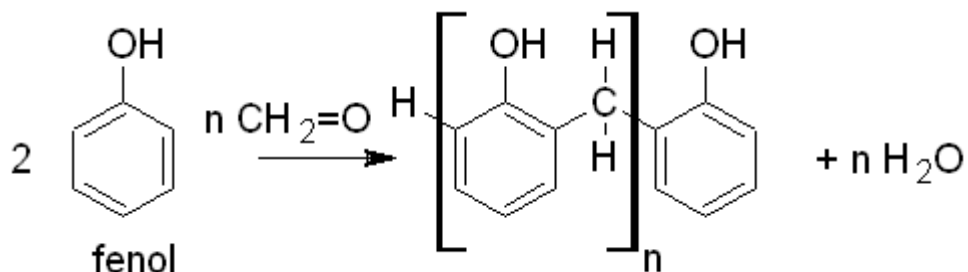
Polymerace (Obr. 9) je reakce, kdy spolu reagují molekuly monomeru, vzniká aktivní monomerní jednotka a spojuje se do velkého polymeru. Těmito reakcemi vzniká např. polyethylen (PE), polypropylen (PP), polystyren (PS) atd. Polymerace je zahájena rozštěpením násobné vazby v monomeru pomocí radikálu, nebo iontu, který vzniká působením iniciátoru (iniciace). Podle aktivního centra nazýváme polymeraci buď radikálovou, nebo iontovou. Radikál (iont) nese nepárový elektron a je velmi reaktivní, tudíž reaguje s násobnou vazbou

monomeru a štěpí ji, tím vzniká další větší radikál (iont) a takto to pokračuje dále, tento krok se nazývá propagace. K ukončení reakce dochází tím, že se např. spojí dva radikály a tento děj nazýváme terminace. U iontových polymerací je reakce ukončena deaktivací iontu. Při polymeraci nevzniká vedlejší produkt.



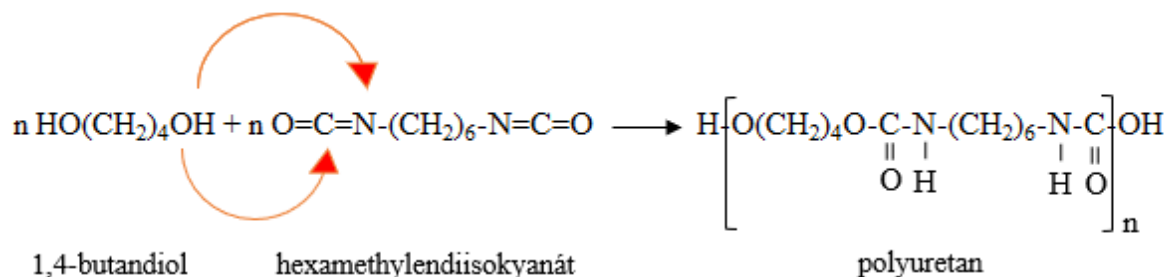
Obrázek 9 Příprava polystyrenu emulzní radikálovou polymerací styrenu (převzato z [45]).

Polykondenzace (Obr. 10) je stupňovitá reakce, při které se spojují molekuly monomerů, ale při každém spojení se odštěpuje vedlejší nízkomolekulární produkt. Jelikož je polykondenzace rovnovážná, je nutné nízkomolekulární produkt odstraňovat. Vzniklý polymer se tedy liší složením od výchozích látek. Rychlost polykondenzace je výrazně menší než rychlost polymerace a je možné ji kdykoliv přerušit a pak v ní zase pokračovat. Vznikají tak např. polyamidy (PA), polyimidy (PI), polyformaldehydy, polyestery (PE) atd.



Obrázek 10 Příprava fenolformaldehydové pryskyřice polykondenzací fenolu a formaldehydu v zásaditém prostředí (převzato z [46]).

Polyadice (Obr. 11) je stupňovitá reakce, při které reagují dva různé monomery, které v molekule obsahují reagující funkční skupiny. Nevzniká vedlejší produkt, ale dochází k přesunu vodíku na druhou reaktivní skupinu a probíhá adice. Vznikají tak např. epoxidové pryskyřice (EP), polyurethany (PUR) [37].

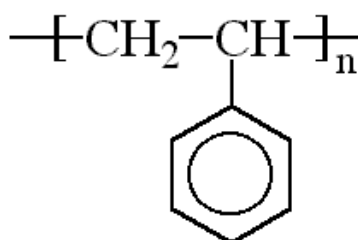


Obrázek 11 Vznik polyuretanu polyadící 1,4-butandiolu a hexamethylendiisokyanátu.

1.5 Používané polymerní materiály

1.5.1 Polystyren (PS)

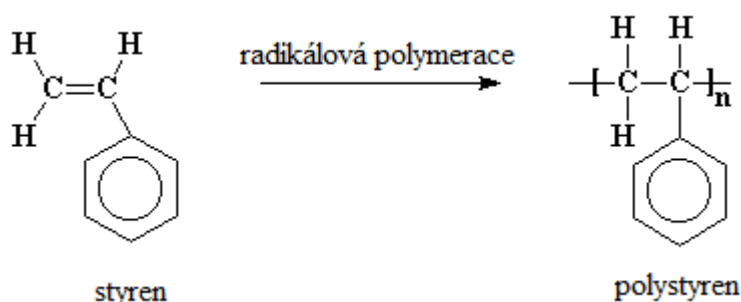
Polystyren (Obr. 12) je čistý, amorfní, nepolární termoplast, který se snadno zpracovává a který lze snadno přeměnit na velké množství polotovarů, jako jsou pěny, filmy, desky. Jedná se o jeden z největších objemových komoditních plastů, který zahrnuje přibližně sedm procent celkového trhu s termoplasty. Je velmi dobrý elektrický izolátor, má vynikající optickou čistotu díky nízké krystalinitě a má dobrou chemickou odolnost vůči zředěným kyselinám a zásadám. Snadno se tvaruje, protože nad teplotou skelného přechodu ($T_g = 100\text{ }^\circ\text{C}$) to je viskózní kapalina. PS má však také několik omezení. Má špatnou odolnost vůči uhlovodíkovým rozpouštědlům, kyslíku a UV záření a je poměrně křehký, což znamená, že má nízkou rázovou houževnatost v důsledku tuhosti polymerního řetězce. Jeho horní teplotní limit pro kontinuální použití je spíše nízký kvůli nedostatečné krystalinitě a nízké teplotě skelného přechodu. Pod jeho T_g má střední až vysokou pevnost v tahu (35-55 MPa), ale nízkou rázovou pevnost (15-20 J/m). Navzdory všem ale těmto nedostatkům jsou styrenové polymery velmi atraktivní plasty a používají se v mnoha odvětvích a pro mnoho výrobků např. v lékařství, potravinářství pro balení, optice, na výrobu hraček, krytů, automobilových dílů atd. [47].



Obrázek 12 Strukturní vzorec polystyrenu (převzato z [48]).

Vyrábí se polymerací styrenu, který snadno polymeruje již za běžné teploty, proto se do něj přidává inhibitor, kterého se před polymerací zbavuje. Většinou se používá radikálový

způsob polymerace (Obr. 13). Jako nejpoužívanější výrobní technologie se používá suspenzní a bloková polymerace.



Obrázek 13 Výroba polystyrenu radikálovou polymerací ze styrenu (převzato a upraveno z [48]).

Suspenzní polymerace se provádí v polymeračních reaktorech násadovým způsobem. Do reaktoru se načerpá styren, demineralizovaná voda a plastifikátor, který se přidává pro lepší zpracovatelnost PS. Pak se přidá předem připravená směs stabilizátoru (fosforečnan vápenatý, polyvinylalkohol), ten je důležitý pro dosažení nízkého obsahu zbytkového monomeru, mořidlo a směs organických peroxidů. Obsah se vyhřeje na 90 °C a udržuje se 6-7 hodin. Teplota se pak zvýší na 125 °C a udržuje se další 2 hodiny. Po skončení se ochladí na 60 °C a obsah se přetlačí do neutralizátoru, kde se fosforečnan vápenatý převede do roztoku působením kyseliny chlorovodíkové. Poté se vzniklý PS vyčistí vodou a vysuší.

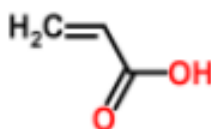
Kontinuální bloková polymerace se provádí ve vertikálních, nebo horizontálních reaktorech s pístovým tokem materiálu, nebo reaktory, kde se materiál promíchává. Monomer se smísí s 5-10% ethylbenzenem a přes ohřívák se vede do reaktoru, kde je polymerace iniciována termicky. Viskózní roztok PS se vede do filmové odparky, kde se za sníženého tlaku oddestiluje nezreagovaný styren a ethylbenzen. Roztavený PS se vede do granulačního zařízení [42].

Setkáváme se s dalšími druhy polystyrenových plastů, např. zpěňovatelný PS (EPS), který se vyrábí polymerací v přítomnosti alifatických uhlovodíků (pentanu), které jsou rozpustné v monomeru, nikoliv v polymeru. EPS má velmi dobré izolační vlastnosti a odolává vibracím, nevýhodou je jeho vysoká hořlavost. Velmi často styren kopolymeruje s mnoha jinými monomery pro výrobu polymerů se zlepšenými vlastnostmi. Kopolymerací styrenu s akrylonitrilem (SAN) vzniká polymer, který má mnohem lepší chemickou odolnost, tepelnou stabilitu a mechanické vlastnosti. Nevýhodou oproti PS je vyšší nasákavost, horší elektroizolační vlastnosti a žloutnutí. Používá se hlavně v technických oblastech. Kopolymerací s methylmethakrylátem vzniká polymer, který má mnohem vyšší čírost a lepší UV a chemickou

stabilitu. Smícháním styrenu s kaučuky nám vznikne houževnatý PS (HIPS), který má lepší vlastnosti než klasický PS a ty závisí na tom, kolik obsahuje gelové fáze a jakým způsobem byl připraven. S vyšším obsahem kaučuku se zlepšuje rázová houževnatost, klesá tvrdost a bod měknutí. Používá se pro obalovou techniku, hračky, elektrotechniku. Důležitou kopolymerací je reakce styrenu s butadienem, za vzniku styren-butadienové kaučuku (SBR) a styrenu s butadienem a akrylonitrilem za vzniku akrylonitril-butadien-styrenu (ABS). Oba kopolymery mají vysokou odolnost proti namáhání a rázům, ABS má vyšší pevnost v tahu než PS. Používají se pro technické aplikace, kde je kladen nárok na vysokou houževnatost a chemickou odolnost [42,47].

1.5.2 Polymery a kopolymery kyseliny akrylové a methakrylové

Kyselina akrylová (Obr. 14) a její estery jsou všestranné monomery, používané jako stavební kameny pro tisíce polymerních uskupení. Jsou to hořlavé, reaktivní, těžké kapaliny na bázi alfa a beta nenasycené karboxylové struktury. Zanesením různého procenta akrylátových monomerů umožňuje výrobu mnoha látek pro latexové a roztokové kopolymery, kopolymerní plasty a zesíťovatelné polymery. Jejich vlastnosti, které mají různou lepivost, trvanlivost, tvrdost a teplotu skelného přechodu nám umožňují aplikaci v mnoha odvětvích. Estery nachází uplatnění jako povrchové nátěry, textilie, lepidla a plasty. Kyselina akrylová a její kopolymery nalézají uplatnění jako superabsorbenty, detergenty, dispergační činidla a zahušťovadla [49].

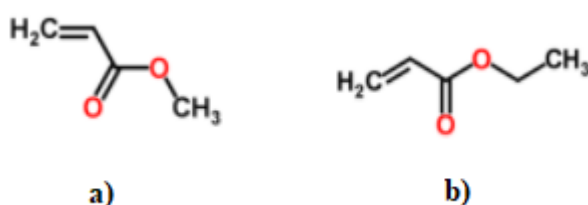


Obrázek 14 Strukturní vzorec kyseliny akrylové (převzato z [50]).

Polymery a kopolymery kyseliny akrylové a methakrylové a jejich estery obecně bývají označovány jako polyakryláty. Vyrábějí se jako homopolymery i kopolymery. Mají vynikající odolnost na povětrnosti a stálost na světle. Jejich vlastnosti závisejí na druhu monomeru, komonomeru, na způsobu přípravy, molekulové hmotnosti. Podle typu hlavního monomeru rozdělujeme tyto polymery na dvě hlavní skupiny, a to polyakryláty a polymethakryláty, mezi kterými jsou základní rozdíly. Polymethakryláty jsou při stejné délce řetězce alkoholové složky tvrdší než polyakryláty. Tvrdost a bod měknutí klesají se stoupajícím počtem uhlíkových atomů alkoholu použitého k esterifikaci až k minimu, což u alkylmethakrylátů při C₁₂ a alkylakrylátů při C₈. Polyakryláty tvoří měkké filmy, zatímco polymethakryláty tvrdší. Polymethakryláty

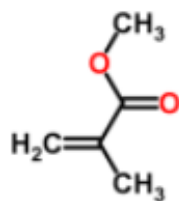
mají vyšší odolnost vůči tepelnému rozkladu než polyakryláty. Použití je velmi široké od nátěrových hmot po různé průmyslové látky, vlákna, plasty [42].

Polyakryláty jsou důležitou skupinou polymerů, jsou měkké, pevné a pružné. Jejich teplota skelného přechodu je výrazně pod pokojovou teplotou. Jsou známé díky své vysoké průhlednosti, dobré houževnatosti a mají poměrně dobrou tepelnou odolnost až do asi 177 °C v suchém prostředí. Mají také dobrou odolnost proti povětrnostním vlivům a odolnost vůči ozonu, protože neobsahují dvojné vazby. Nejdůležitějšími zástupci jsou polymethylakrylát a polyethylakrylát (Obr. 15). Oba to jsou tvrdé kaučukové materiály, polyethylakrylát je však podstatně měkčí a roztavitelnější než polymethylakrylát. Často jsou kopolymerovány, aby se dosáhlo požadované tvrdosti, pružnosti a pevnosti. Hlavními aplikacemi jsou nátěry, barvy, automobilové výrobky, používají se také jako komonomery pro zvýšení plasticity tuhých a křehkých plastů [47].



Obrázek 15 Strukturní vzorec polymethylakrylátu (a) a polyethylakrylátu (b) (převzato a upraveno z [51,52]).

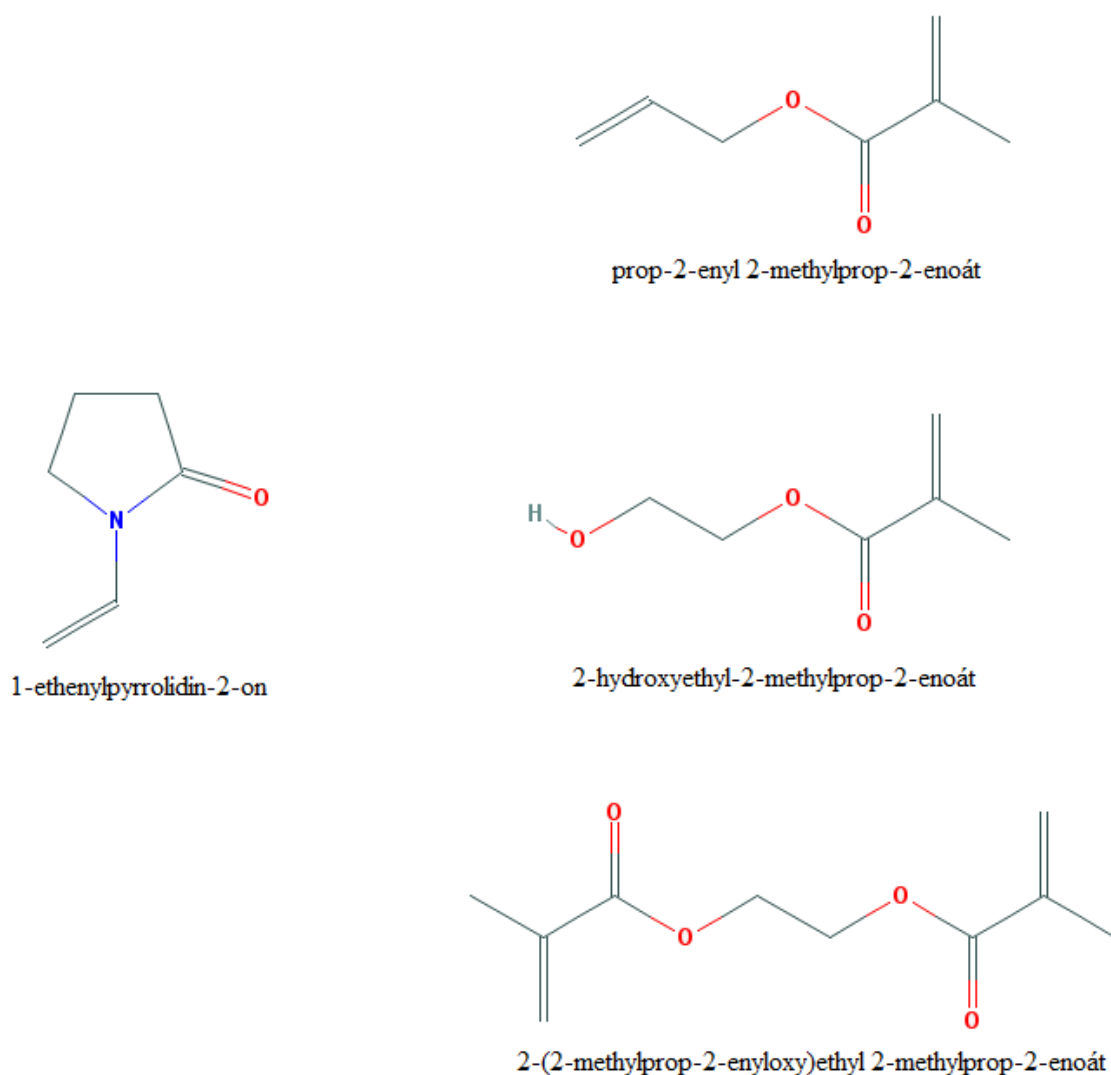
Polymethakryláty jsou amorfni termoplasty s vysokou průhledností, které lze snadno převést a zpracovat na mnoho polotovarů, jako jsou filmy, trubky, desky atd. Nejznámějším methakrylátovým polymerem je polymethylmethakrylát (PMMA), rovněž známý jako plexisklo (Obr. 16). Jedná se o vysoce objemný amorfni termoplast s vysokou teplotou skelného přechodu (105 °C), s dobrými mechanickými vlastnostmi a vynikající odolností vůči povětrnostním vlivům. Je odolný proti olejům, alkanům a zředěným kyselinám, naopak rozpustný v mnoha polárních rozpouštědlech (alkoholech, organických kyselinách). Díky své vysoké odolnosti a lehkosti se často používá jako náhrada za běžné sklo. Většina komerčních produktů je polymerizována iniciátory volných radikálů (peroxydy, azo sloučeniny), za vzniku ataktických polymerů. PMMA může být rovněž polymerizován aniontově, čímž se může získat syndiotaktický a izotaktický polymer. PMMA se používá jako ekonomická alternativa k polykarbonátu (PC), pokud se nevyžaduje vysoká houževnatost. Dalším důležitým methakrylátovým polymerem je 2-hydroxyethylmethakrylát (HEMA), který se používá v kontaktních čočkách a dalších biomedicínských aplikacích [47].



Obrázek 16 Strukturní vzorec polymethylmethakrylátu (převzato z [53]).

1.5.3 Hilafilcon B

Kontaktní čočky SoftLens 59 od firmy Bausch & Lomb, které byly v experimentální části použity, byly vyrobeny z polymeru s názvem hilafilcon B. Je to kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylát s 1-vinyl-2-pyrrolidinonem, allylmethakrylátem a ethylen-dimethakrylátem. Jeho sumární vzorec je $C_{29}H_{43}NO_{10}$, střední molekulová hmotnost 566 g/mol a jako výchozí monomery na syntézu byly použity látky 1-ethenylpyrrolidin-2-on, 2-hydroxyethyl 2-methylprop-2-enoát, 2-(2-methylprop-2-enyloxy)ethyl 2-methylprop-2-enoát a prop-2-enyl 2-methylprop-2-enoát. Jejich struktury jsou znázorněny na obrázku 17 [54]. Podle americké klasifikace kontaktních čoček FDA (Food and Drug Administration) je tento materiál řazen do skupiny dvě, což znamená, že má velký obsah vody a je to neiontový polymer. Hilafilcon B obsahuje 59 % vody a jeho propustnost kyslíku je 22 Dk/t. Neiontový polymer obsahuje alkohol a amidy což způsobuje, že je povrchové napětí minimalizováno, nebo povrch nenese elektrický náboj. Proto se na daný materiál bude chytat méně proteinů, než u iontových materiálů a měl by být z dlouhodobějšího hlediska lepší [55].



Obrázek 17 Strukturní vzorce monomerů, ze kterých je vyroben hilafilcon B (převzato a upraveno z [56]).

1.6 Kontaktní čočky

Většina lidí potřebuje korekci zraku ať už se jedná o špatné vidění na blízko (dalekozrakost), nebo do dálky (krátkozrakost). Tyto poruchy se dlouhou dobu řešily nošením brýlí, než byly vynalezeny kontaktní čočky. První pokusy o konstrukci „kontaktní čočky“ se připisují Leonardu da Vincimu, který ve svém díle popsal metodu přímé změny optické mohutnosti rohovky ponořením oka do nádoby s vodou. Základní myšlenku kontaktní čočky pak přinesl Angličan Thomas Young, který vyrobil čočku z foukaného skla. Ta však ale nepropouštěla kyslík, a tudíž nebyla v oku dlouhodobě snesitelná. Převrat v této vědě pak přinesl v roce 1953 Otto Wichterle, který vyrobil první měkkou kontaktní čočku z hydrofilního materiálu, tzv. HEMA hydrogel (poly-hydroxyethylmethakrylový gel), který pohlcovал asi

40 % vody, měl dobré mechanické vlastnosti a byl průhledný. Nejdříve se lil do forem, ale potřeba úpravy čočky a jejich různá kvalita vedla Wichterleho k nápadu odlévání čoček v rotujících otevřených formách. V roce 1960 uvedl Wichterle a Lím [57] článek v časopisu Nature, který vedl ke světovému rozšíření výroby měkkých kontaktních čoček odstředivým odléváním. I v dnešní době zůstává hydrogel jako jejich základní látka a výrobci se snaží upravit materiál tak, aby byl co nejvíce propustný pro kyslík a aby měl co nejmenší dopad na lidské oko. Proto došlo k vývoji nových kontaktních čoček silikon-hydrogelových, kdy je hydrogel obohacen o silikon a kontaktní čočky je možné nosit i přes noc [58].

1.6.1 Kontaminace kontaktních čoček

Oční infekce, které mohou nastat při nošení kontaktních čoček většinou souvisejí s opotřebením čočky. Opotřebená, nebo kontaminovaná čočka, nebo její příslušenství bývají spojeny s mikrobiální keratitidou (zánět oční rohovky). Kontaminovaná kontaktní čočka může vyvolat také ulcerativní keratitidu (zánět oční rohovky s přítomností vředu), která může mít za následek trvalou ztrátu zraku. Přílnavost mikroorganismů na povrch čočky a tvorba biofilmu na čočce jsou faktory, které se podílejí na vývoji mikrobiální keratitidy. Díky interakci rohovky s kontaktní čočkou může být ochranný mechanismus rohovky překonán a mikroorganismus má volný přístup ke způsobení infekce. Jedním z nejčastějších patogenů rohovky u nositelů kontaktních čoček je *Pseudomonas aeruginosa*, dále se můžeme také setkat s houbami a kvasinkami např. *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*. Infekce se stávají vážnější, pokud daný mikroorganismus kolonizuje povrch nitroočních čoček kontaktních čoček a vytváří na nich biofilm. Ten je definován, jak je již popsáno v kapitole 1.3, jako strukturovaná komunita bakteriálních buněk uzavřených ve vlastní produkované polymerní matrix a přilepena k inertnímu, nebo živému povrchu. Je také známo, že mikroorganismy v biofilmech jsou odolnější vůči antibiotikům a hostitelské ochraně [59]. Tvorba biofilmu závisí na nutričním obsahu, teplotě, osmolaritě, pH, na dostupnosti železa a kyslíku a může vykazovat různé vlastnosti mezi druhy tvořícími biofilm [60]. Vývoj biofilmu u *C. albicans* byl popsán v samostatné kapitole 1.3.1. Při adhezenci mikroorganismů na kontaktní čočku také hraje roli, z jakého materiálu je čočka vyrobena. Bylo zjištěno, že při adhezi *C. albicans* na hydrofilní polymery byly enzymy kvasinky schopny polymer degradovat a umožnily tak infiltraci do matrix čočky [61].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a přístroje

2.1.1 Chemikálie a roztoky potřebné pro práci s mikrotitračními destičkami

Ethanol 96% (Penta s.r.o.)

Fyziologický roztok – 0,9% NaCl (Lach-Ner)

Sterilní voda

Krystalová violet' (0,1 M roztok v ethanolu)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

– 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,42 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄

2.1.2 Chemikálie a roztoky potřebné pro izolaci DNA a následnou PCR

Agaróza (Top-Bio)

EmeraldAmp PCR Master Mix (Clontech)

Ethanol 95% a 70%

Ethidium bromid (Top-Bio)

Extrakční roztok (roztok A + roztok B 1:1)

Marker 155-970 (Top-Bio)

NaOAc (octan sodný) 3 M, pH 5,2 (Penta s.r.o.)

PCI (fenol-chloroform-izoamylalkohol) 50:50:1 (Sigma-Aldrich)

PCR Ultra H₂O (Top-Bio)

Primery ALBI-NCE-F a R, PARA-NCE-F a R

Roztok A

– 0,2 M NaCl, 20 mM EDTA, 10% SDS (sodium dodecylsulphate)

Roztok B

– 100 mM TRIS-HCl, pH 5,7

TBE pufr (Tris-borát-EDTA) 1x

2.1.3 Roztok používaný pro omývání čoček

Zero-Seven (Polytouch Chemical Co.) - polyhexamethylenbiguanid (PHMB),

ethylendiaminotetraacetát sodný, hypromelóza, D-sorbitol, poloxamer, kyselina boritá, chlorid sodný, borax (tetraboritan sodný)

2.1.4 Látky používané pro rozpouštění kontaktních čoček

aceton (Lach-Ner)

cyklohexanon (Penta s.r.o.)
chloroform (Penta s.r.o.)
ethanol (Penta s.r.o.)
methanol (Penta s.r.o.)
N,N-dimethylformamid (Penta s.r.o.)
technický benzín (Penta s.r.o.)
THF (Penta s.r.o.)

2.1.5 Používané kmeny

Kmeny *C. albicans*

- hap5, hap43, rhb1 – profesor Chung-Yu Lan z National Tsing Hua University na Tchaj-wanu
- SC5314 – kontrolní kmen

Kmen *C. parapsilosis*

P69 – mykologická sbírka Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc

Kmeny *P. aeruginosa*

- CCM1960 – Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně
- Kmeny s kódovým označením 502 a 39 – Fakultní nemocnice Univerzity Palackého v Olomouci – pacient s cystickou fibrózou, poskytl MUDr. Vladislav Raclavský

2.1.6 Agary a tekuté půdy

Cetrimidový agar (HiMedia Laboratories)

LB médium – Luria-Bertani (Duchefa Biochemie)

Sabouraudův agar (HiMedia Laboratories)

YNB médium (Yeast Nitrogen Base without amino acids, Sigma Aldrich a US

Biological) – 0,7% Yeast Nitrogen Base, 2% glukóza, 20 mM citronan sodný, pH 5

2.1.7 Přístroje

centrifuga Mikro 20 (Hettich)

centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

centrifuga Sorvall Lynx 6000 (Thermo Scientific)

elektrický vařič

FTIR spektrometr Nicolet 6700 s ATR nástavcem Pike MIRacle™ osazený krystalem ZnSe

inkubátor Incu-Line VWR (Biotech)
mikroskop Laboval 4 (Nicon)
mikroskop Nikon Eclipse 80i, Ex 480/80, 505/515 nm
mikrovlnná trouba (LG)
notebook HP ProBook 590
PCR termocyklér (Biometra)
pH metr Mettler Toledo FE20/EL20
spektrofotometr Biotek reader PowerWave 340
spektrofotometr Nano-MD PDA UV-Vis Bio (Scinco)
sušárna UFC 400 (Mettler)
třepačka Enviromental Shaker – Incubator ES-20/60 (BioSan)
třepačka Heidolph Vibra max 100
UV prohlížečka gelů (Vilber Lourmat)
váhy PK-601 (Denver Instrument)
váhy SAC 63 (Sualtek)
vortex Heidolph Reax Top Test Tub (BioTech)
zdroj pro elektroforézu MP-300N (Major Science)

2.1.8 Ostatní materiály

kontaktní čočky SoftLens 59 (Bausch & Lomb)
plastový materiál na jednorázové použití (bakteriologické misky, pipetovací špičky, rukavice, mikrozkušavky, zkumavky, mikrotitrační destičky)
skleněné korálky – acid washed, 425-600 μm (Sigma-Aldrich)

2.2 Metodika

2.2.1 Kultivace mikroorganismů

Ze zamražených zásobních vzorků mikroorganismů jsme naočkovali kmeny *C. albicans* s označením SC5314, hap5, rhb1 a kmen *C. parapsilosis* s označením P69 na Petriho misky s pevným médiem (Sabouraudův agar). Kmeny *Pseudomonas aeruginosa* s označením CCM, 502 a 39 byly naočovány na cetrimidový agar. Poté se dané misky daly na 24 hodin při 37 °C do inkubátoru. Po proběhnutí doby inkubace se narostlé mikroorganismy *C. albicans* a *C. parapsilosis* převedly do tekutého média YNB-glu, pH 5,1 a *P. aeruginosa* do LB média. Poté se daly do laboratorní třepačky na 24 hodin při 37 °C. Po této inkubaci se u vzorků změřila optická hustota (OD_{600}) a byly připraveny k další práci.

2.2.2 Christensenova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách

Touto metodou jsme stanovovali množství biofilmu vytvořeného u vzorků *P. aeruginosa* s označením CCM, 502 a 39 a vzorky *C. albicans* s označením SC5314, hap5 a rhb1. Z tekutých kultur, jejichž příprava byla popsána v kapitole 2.2.1, se vytvořila buněčná suspenze tím, že se ve fyziologickém roztoku vytvořil McFahrlandův zákal č. 2. Ze suspenze o tomto zákalu se pak vzalo 400 μ l a napipetovalo se do 6 ml média YNB-glu. Mikrotitrační destička se omyla 96% ethanolem a nechala se vysušit. Do vysušené destičky se napipetovalo 200 μ l buněčné suspenze každého analyzovaného vzorku a jako negativní kontrola se použilo čisté médium. Takto připravená destička se proměřila na spektrofotometru při 600 nm a dala se inkubovat na 24 hodin do termostatu při 37 °C. Druhá destička byla připravena stejným způsobem a dala se inkubovat na 48 hodin a třetí destička, opět připravená stejným způsobem se dala inkubovat na 72 hodin. Každá destička se po inkubaci barvila a byla u ní změřena produkce biofilmu, což bude popsáno dále.

Destička po inkubaci se 3x promyla sterilní vodou, aby se odstranily volné buňky a nechala se 20 minut oschnout v termostatu při 37 °C. Poté se biofilm, který se vytvořil na stěnách jamek destičky obarvil 100 μ l krystalové violeti (10x naředěné v ethanolu) a destička se nechala stát 30 minut při laboratorní teplotě. Po obarvení se destička promývala sterilní vodou do té doby, než se přestala uvolňovat violet' a nechala se oschnout 20 minut v termostatu při 37 °C. Po oschnutí se do každé jamky přidalo 200 μ l 96% ethanolu a destička se nechala 5 minut třepat v laboratorní třepačce při 130 rpm. Po třepání se pak z každé jamky odebralo 100 μ l a napipetovalo do nové, ethanolom omyté destičky. Poté se změřilo OD₆₀₀, což nám ukázalo po odečtení hodnoty slepého vzorku, kolik se nám vytvořilo biofilmu. Jako slepý vzorek bylo použito čisté médium, ve kterém byly buňky narostlé a které prošlo stejným procesem inkubace a obarvení, jako analyzované vzorky.

2.2.3 Růžičkova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách

Tato metoda spočívala hlavně v jiné přípravě vzorku před inkubací v mikrotitrační destičce. Připravili jsme si tekutou kulturu, jejíž příprava je popsána v kapitole 2.2.1. Takto připravenou kulturu jsme dali centrifugovat na 2 minuty při 3000 g, vylili supernatant a peletku promyli v roztoku PBS. Tohle jsme opakovali ještě jednou. Poté se do destičky napipetovalo 180 μ l média YNB-glu a k tomu se přidalo 20 μ l buněčné suspenze analyzovaného vzorku, což byla resuspendovaná peletka v médiu a nechalo se inkubovat 48 hodin. Po inkubaci se destička promyla 3x roztokem PBS pro odstranění volných buněk a nechala se 20 minut oschnout

v termostatu při teplotě 37 °C. Po oschnutí se přidalo 100 µl krystalové violeti (10x ředěné v ethanolu) pro obarvení vzniklého biofilmu a nechalo se půl hodiny stát při laboratorní teplotě. Po obarvení se destička vymývala sterilní vodou do té doby, než se přestala uvolňovat violet a nechala se opět 20 minut oschnout v termostatu při teplotě 37 °C. Pak se přidalo 200 µl 96% ethanolu pro rozpuštění navázané violeti na biofilm a destička se dala na 5 minut třepat do laboratorní třepačky. Poté se odebralo 100 µl do nové destičky omyté ethanolem a změřilo se OD₆₀₀ na spektrofotometru, což nám ukázalo po odečtení slepého vzorku, kolik se nám vytvořilo biofilmu. Jako slepý vzorek bylo použito čisté médium, ve kterém byly buňky narostlé a které prošlo stejným procesem inkubace a obarvení, jako analyzované vzorky.

2.2.4 Kontaminace hydrogelových čoček kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis*

Ze zamražených kultur jsme očkovali kvasinky *C. albicans* (kmen SC5314) a *C. parapsilosis* (kmen P69) na pevné médium (Sabouraudův agar) a poté převedli do tekutého média YNB-glu. Do těchto tekutých kultur jsme pak vložili hydrogelové čočky SofLens 59 od firmy Bausch & Lomb a nechali je 12 dnů inkubovat v třepačce při 37 °C. Pro kvantifikaci postupu jsme měřili optickou hustotu (OD₆₀₀) těchto kultur. Pro důkaz kontaminace čoček jsme je pozorovali a fotografovali pod mikroskopem při zvětšení 400x.

Pro nalezení nejlepšího způsobu kontaminování jsme čočky inkubovali v plastových zkumavkách a erlenmeyerových baňkách.

2.2.5 Izolace DNA z kontaminovaných čoček

Po standardizování metody kontaminace jsme u těchto čoček provedli izolaci DNA z kvasinek. Zvolili jsme nejprve tři metody úpravy čoček před izolací: čočka vyjmutá přímo z kultury, čočka před izolací zamražená a čočka vysušená na vzduchu.

Jako základní materiál pro izolaci DNA jsme použili kontaktní čočky, které byly kontaminovány kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Daný vzorek kontaktní čočky upravený příslušnou metodou popsanou výše, jsme vložili do mikrozkuavky a přidali 0,6 ml extrakčního roztoku, 0,6 ml roztoku PCI a 0,3 g skleněných kuliček. Po uzavření zkuavky se obsah 5 minut vortexoval a potom centrifugoval při 13 000 g 5 minut. Po centrifugaci se odebral supernatant a přenesl do nové mikrozkuavky a k němu se přidal stejný objem roztoku PCI, obsah se pár sekund vortexoval a opět proběhla centrifugace při 13 000 g 5 minut. Znovu se vzal supernatant a přenesl do nové mikrozkuavky a k němu se přidal 0,1 díl octanu sodného a 800 µl 95% ethanolu a dalo se srážet přes noc do mrazáku do -20 °C. Druhý den se obsah centrifugoval při 13 000 g 5 minut, supernatant se vylil, vytvořená peletka se propláchl 400 µl 75% ethanolu a nechala se vysušit asi 20 minut v inkubátoru při 37 °C. Po vysušení se peletka

rozpustila ve 12-15 μ l sterilní vody a poté se měřil obsah DNA na spektrofotometru v nanokvyetě (0,5 mm), do které se vložily 3 μ l vzorku. Jako slepý vzorek byla použita sterilní voda.

2.2.6 PCR vzorků po izolaci DNA

Připravili jsme vzorky pro PCR, kde jsme pro *C. albicans* použili primery, které amplifikují geny pro karbonické anhydrázy ALBI-NCE-F a R a pro *C. parapsilosis* PARA NCE-F a R. Na jeden vzorek se do mikrozkušavky na PCR vložilo 25 μ l EmeraldAmp PCR Master Mix, primery po 2 μ l, 20 μ l PCR vody a k tomu 1 μ l templátu (vzorku po izolaci DNA). Teploty a časy amplifikace (viz Tab. 1). U primerů pro *C. albicans* jsme očekávali velikost produktu 876 bp a u primerů pro *C. parapsilosis* produkt velikosti 855 bp.

Tabulka 1 Program PCR amplifikace.

Teplota (°C)	Čas (s)	
95	60	
98	10	} 35x
42	35	
72	60	
72	120	

2.2.7 Amplifikace úseků DNA vyizolovaných z kontaminovaných čoček

Pro elektroforézu jsme nejprve museli připravit gel tak, že jsme 0,6 g agarózy rozpustili v 60 ml pufru TBE 1x, vložili do mikrovlnné trouby k zahřátí, aby se agaróza rozpustila. Po rozpuštění se roztok ochladil a přidalo se 5 μ l ethidiumbromidu a směs se nalila do elektroforetické vany s vloženým hřebínkem. Po ztuhnutí gelu se držák s gelem otočil, vyjmul se hřebínek a vana se zalila pufrům TBE 1x, aby byl celý gel ponořený. Do první jamky se napipetoval marker (3,5 μ l) velikosti 155-970 bp a do dalších jamek vzorky *C. albicans* a *C. parapsilosis* (18 μ l), elektroforetická vana se připojila ke zdroji a byla puštěna při 200 V asi 20 minut. Po proběhlé elektroforéze se gel vyjmul a byl osvětlen UV zářením v UV prohlížečce gelů a vyfotografován.

2.2.8 Inkubace kontaminované čočky v roztoku sacharózy

Tento experiment byl zařazen z důvodu zjištění příčiny ztráty kvasinkových buněk při předúpravě vzorků před řezáním čoček na následnou mikroskopii. Čočky totiž byly promyty v roztoku sacharózy, a poté při mikroskopii nebyly viditelné buňky, proto jsme vyzkoušeli, zda má promývání tímto roztokem vliv na adhezi buněk na kontaktní čočce. Do čistého média

YNB-glu byl naočkován kmen *C. albicans* SC5314 a ponechán 24 hodin při 37 °C v laboratorní třepačce. Po této inkubaci se změřilo OD₆₀₀ daného kmene a byla vložena sterilní kontaktní čočka. Kontaktní čočka se po jednom dnu inkubace vytáhla, vložila se do nasyceného roztoku sacharózy a byla inkubována v laboratorní třepačce při 37 °C sedm dnů. Po jednom dnu byla pozorována pod mikroskopem a následně pak i sedmý den. Po této inkubaci byla čočka vytažena a vložena do čistého média YNB-glu, aby se zjistilo, zda po této inkubaci přežily na čočce nějaké buňky a zda budou schopny kontaminovat čisté médium. V čistém médiu byla čočka inkubována 5 dnů a následně bylo změřeno OD₆₀₀.

2.2.9 Kontaminace kontaktních čoček v časovém intervalu

Tento experiment byl prováděn u kmenů *C. albicans* SC5314 a *C. parapsilosis* P69. Do narostlé planktonické kultury, která měla OD₆₀₀ v rozmezí 2-3 byla vložena sterilní kontaktní čočka, která se v dané kultuře inkubovala v různých časových intervalech. Po této inkubaci se kontaktní čočka vytáhla a jedna polovina se přímo vložila do čistého média YNB-glu (tyto vzorky jsme označili jako nečištěná čočka) a druhá polovina se vložila do fyziologického roztoku, kde byla ponechána asi půl minuty, promíchána a také vložena do čistého média YNB-glu (tyto vzorky označujeme jako čištěné vzorky). Čištěná i nečištěná čočka v čistém médiu byla vložena do laboratorní třepačky na 24 hod při 37 °C při 130 rpm. Po této kultivaci se změřilo OD₆₀₀ média, jako slepý vzorek bylo použito čisté médium. Tato hodnota absorbance nám měla ukázat, jak moc dokázala čočka po daném čase inkubace kontaminovat čisté médium a také to, kolik času je potřeba na přichycení buněk na čistou kontaktní čočku. Také jsme chtěli zjistit, zda je rozdíl v nárůstu buněk po promytí ve fyziologickém roztoku. Pro první měření byly zvoleny časy inkubace 10 min, 30 min, 1 hod, 1:30 hod, 2 hod, 2:30 hod, 3 hod, 3:30 hod, 4 hod, 1 den, 2 dny a 7 dnů. Pro druhé měření byly časy upraveny na 10 min, 30 min, 1 hod, 4 hod, 1 den a 7 dnů. U vybraných vzorků časové kontaminace (10 min a 30 min) pak byla provedena izolace DNA, jejíž postup je popsán v kapitole 2.2.5.

2.2.10 Měření kontaminované a nekontaminované čočky pomocí infračervené spektroskopie metodou ATR FTIR

FTIR spektroskopie (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací) je technika používaná pro strukturní charakterizaci jak organických, tak anorganických materiálů. Jedná se o měření absorpce infračerveného záření vlnových délek 0,78–1000 nm, resp. rozsahu vlnočtů 12800–10 cm⁻¹. Tato oblast se obvykle dělí na blízkou (13000–4000 cm⁻¹), střední (4000–200 cm⁻¹) a vzdálenou infračervenou oblast (200–10 cm⁻¹), přičemž nejpoužívanější právě pro strukturní charakterizaci je střední oblast. Principem metody je absorpce

infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekul. Diskrétní polohy jednotlivých absorpčních pásů jsou charakteristické pro funkční skupiny studovaných systémů [62].

Metoda ATR (Attenuated Total Reflectance) neboli technika totální reflektance je jedna z technik měření používaná v infračervené spektroskopii. Jedná se o techniku, která nevyžaduje zdlouhavou přípravu vzorku pro analýzu, je rychlá a může být automatizovaná. Metoda je založena na principu násobného totálního odrazu záření na fázovém rozhraní mezi měřeným vzorkem a měřicím krystalem, který je z materiálu o velkém indexu lomu. Svazek paprsků se přivede do krystalu soustavou zrcadel tak, aby úhel dopadu na fázové rozhraní vyhovoval podmínce totálního odrazu. Měřený vzorek je v úplném kontaktu s ATR krystalem a záření proniká částečně do analyzovaného materiálu. Když měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, je tato složka v totálně odraženém světle zeslabena. Takovéto spektrum se podobá spektru, které je změřené v transmittančním režimu. Hloubka vzorku, do které je možno analyzovat je v řádech μm , tedy charakterizujeme pouze velmi tenké povrchové vrstvy, avšak díky násobnému odrazu na fázovém rozhraní lze získat velmi kvalitní spektrum. Krystaly, které se používají jsou např. ZnSe, AgCl, Si, Ge atd. Při našem měření byl použit lichoběžníkový ZnSe krystal v horizontálním uspořádání [63].

Experimenty byly provedeny ve spolupráci s RNDr. Lucií Bednárovou, CSc. na pracovišti Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR v Praze. Všechny vzorky byly měřeny pomocí infračerveného spektrometru Nicolet 6700 pomocí ATR techniky. Pro detekci signálu byl použit DTGS detektor a spektrometr je proplachován plynným dusíkem pro minimalizaci přítomnosti vodních par v kyvetovém prostoru. Pro experiment byl použit ATR nástavec Pike MIRacle™ osazený krystalem ZnSe (se třemi odrazy), celkový počet skenů pro získané spektrum byl 64 a pro vypracování signálu byla použita Happ-Genzelova apodizace. Vzorky čisté čočky na ATR nebyly nijak upraveny, jen lehce opláchnuty vzduchem a vloženy do přístroje k měření. Vzorky kontaminovaných čoček kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis* po různé doby inkubace, většinou však v rozmezí 1-7 dnů (čočka byla dosti osídlena buňkami) byly opláchnuty postupně destilovanou vodou a vzduchem před vložení na ATR krystal. Spektra byla zaznamenávána v čase 0 min, 15 min, 30 min, 45 min a 60 min od vložení čočky do kyvetového prostoru.

2.2.11 Omývání kontaminované čočky v roztoku přímo určenému pro kontaktní čočky

Při předchozích experimentech jsme používali jako simulaci roztoku pro kontaktní čočky fyziologický roztok. V tom se sterilní čočky přechovávají a měl by tak být dobrým pro vyčištění čoček. Jelikož se nám ale v něm čočky nevyčistili, zkusili jsme pokus se speciálním roztokem pro kontaktní čočky (Zero-Seven Refreshing od výrobce Polytouch Chemical Co.), který je definován výrobcem a na kterém byl návod k použití. Návod od výrobce byl následující:

5. minutový režim (čistící režim)

1. Čistíte čočku alespoň 10 s třemi kapkami roztoku.
2. Důkladně opláchněte každou stranu čočky roztokem.
3. Umístěte kontaktní čočku do pouzdra na kontaktní čočky a naplňte roztokem po dobu přes 5 minut.

Tento postup jsme zopakovali s kontaminovanou čočkou kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis* a čočku v pouzdře v roztoku jsme nechali 10 minut. Po této době by měla být čočka vyčištěná, a tak jsme jí předělali do kultivačního média YNB-glu a nechali ji 24 hodin při 37 °C v třepačce. Po této inkubaci bylo změřeno OD₆₀₀ daných vzorků.

2.2.12 Rozpouštění kontaktních čoček

Protože jsou čočky z polymerního materiálu hilafilcon B, který z převážné části obsahuje 2-hydroxyethylmethakrylát, rozhodli jsme se otestovat rozpustnost čoček v různých látkách. Zvolili jsme aceton, cyklohexanon, chloroform, ethanol, methanol, N,N dimethylformamid, technický benzín a THF (tetrahydrofuran). Do každé zkumavky pak bylo nalito asi 5 ml rozpouštědla a do každého vložena polovina čočky a průběžně bylo se zkumavkami třepáno. Poté byly zkumavky postupně zahřívány ve vodní lázni až na teplotu 80 °C. Po zahřívání byly zkumavky ponechány 2 dny při laboratorní teplotě.

2.2.13 Botnání a stanovení extrahovatelného podílu kontaktních čoček

Botnání je proces, při kterém vysokomolekulární látka (polymer) pohlcuje rozpouštědlo (nizkomolekulární) a přitom zvětšuje svůj objem a hmotnost. Rozpouštědlo proniká do vysokomolekulární látky, ale její struktura se nemění. Je závislé na teplotě, při vyšší teplotě roste rychlost botnání. Botnání se nejčastěji vypočítá podílem změny hmotnosti nabotnaného polymeru vůči původní hmotnosti a vyjadřuje se v procentech:

$$B = \frac{m_b - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Kde m_b označuje hmotnost nabotnaného polymeru, m_0 hmotnost polymeru před botnáním.

Při experimentu byly použity sterilní kontaktní čočky (celé), čočky kontaminované *C. albicans* po 60 min inkubaci (půlka) a čočky kontaminované *C. parapsilosis* po 60 min inkubaci (půlka). Všechny čočky byly vloženy do exikátoru, ve kterém byl čerstvě vysušený silikagel, pro zajištění co nejlepšího vysušení čoček, na 24 hodin. Po úplném vysušení byla vždy jedna čočka vzorku vložena do 20 ml rozpouštědla THF a jedna do 20 ml destilované vody. Tyto vzorky pak byly vloženy na 24 hodin do třepačky a pak byla zvážena jejich hmotnost. Protože vzorky čoček *C. albicans* a *C. parapsilosis* byly poloviční, jejich hmotnosti byly násobeny dvěma, aby byl výsledek porovnatelný se sterilními čočkami. Po zvážení se vypočítaly % botnání.

Stanovení extrahovatelného podílu se provádí pro to, aby se zjistilo, kolik procent nezesíťovaného podílu obsahoval zesíťovaný polymer. Je více způsobů, jak tento podíl zjistit, např. pomocí Soxhletova extraktoru. My jsme zvolili extrakci v erlenmayerových baňkách, protože pro kontaktní čočky byl tento postup výhodnější. Jako vzorky kontaktních čoček byly zvoleny sterilní kontaktní čočky (celé), čočky kontaminované *C. albicans* po 60 min inkubaci (půlka) a čočky kontaminované *C. parapsilosis* po 60 min inkubaci (půlka). Všechny čočky byly vloženy do exikátoru, ve kterém byl čerstvě vysušený silikagel, pro zajištění co nejlepšího vysušení čoček, na 24 hodin. Po úplném vysušení byla vždy jedna čočka vzorku vložena do 20 ml rozpouštědla THF a jedna do 20 ml destilované vody. Tyto vzorky pak byly vloženy na 24 hodin do třepačky. Po třepání byly vzorky vytaženy a vloženy do sušárny na 2 hodiny při 50 °C. Po tomto úplném vysušení byla zvážena jejich hmotnost. Protože vzorky čoček *C. albicans* a *C. parapsilosis* byly poloviční, jejich hmotnosti byly násobeny dvěma. Pak byla vypočítána procenta extrahovatelného podílu podle vzorce:

$$E = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde m_1 označuje hmotnost původního polymeru, m_2 hmotnost polymeru po extrakci.

2.3 Výsledky a diskuze

2.3.1 Christensenova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách

K testování tvorby bakteriálních biofilmů na polystyrenových destičkách jsme zvolili tři kmeny *P. aeruginosa* 39, 502 a CCM. Používali jsme metodu využívající barvení

krystalovou violetí. Krystalová violet' patří do rodiny trifenylmethanových barviv, které se váží na buněčné složky bakterií iontovými interakcemi. Bylo prokázáno, že se váže na DNA, proteiny a podle všeho i polysacharidy, včetně biofilmových polysacharidů. Když se krystalová violet' opláchne vodou, vzniklý biofilm, na který se violet' navázala se projeví jako prstenec kolem vnitřku jamky [64].

Tabulka 2 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů *P. aeruginosa* za 24, 48 a 72 hodin po kultivaci v LB médiu. Množství biofilmu je vyjádřeno jako absorbance rozpuštěné krystalové violeti, zachycené na vzniklém biofilmu v 95% ethanolu. Hodnoty před inkubací nám vyjadřují absorbanční buněk vzorků v médiu LB.

<i>P. aeruginosa</i>	před inkubací	po 24 hod	po 48 hod	po 72 hod
502	0,0141	0,0174	0,0065	0,0222
39	0,0156	0,0281	0,0409	0,0484
CCM	0,0143	0,0757	0,0759	0,0902

Z tabulky, která shrnuje výsledky (Tab. 2), můžeme vidět, že největší produkce biofilmu byla u kmene CCM, což je sbírkový kmen, zatímco kmeny s označením 502 a 39 jsou kmeny, které byly izolované z pacienta, který měl cystickou fibrózu, a tudíž u nich lze předpokládat jiné chování než u sbírkového kmene. Hodnota OD₆₀₀ buněčné suspenze před inkubací byla u všech kmenů přibližně stejná, aby byly zajištěny stejné výchozí podmínky pro všechny kmeny. Po 24 hodinách po měření OD₆₀₀ obarveného biofilmu krystalovou violetí a jejího následného rozpuštění v ethanolu již lze vidět, že kmen CCM měl značně vyšší množství vytvořeného biofilmu než ostatní kmeny, a to se další dny již jen zvyšovalo. Jako druhý v pořadí je kmen s označením 39, který po všechny dny zvyšoval množství vytvořeného biofilmu. Jako nejmenší producent biofilmu se nám ukázal kmen s označením 502, kdy dokonce druhý den hodnota OD₆₀₀ klesla, což mohlo být způsobeno například špatným přichycením biofilmu na stěny jamek destičky, nebo to může být způsobeno tím, že daný kmen má schopnost tvořit nejvíce biofilmu po 24 hodinách, pak je v útlumu a další biofilm vytvoří až po 72 hodinách.

Při opakování experimentů jsme si povšimli nekonzistencí, které mohly být důsledkem použití médií od různých dodavatelů. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda tomu tak opravdu je a příslušná média otestovat systematicky. Porovnání médií z hlediska tvorby biofilmu *P. aeruginosa* nalezneme v Tabulce 3.

Tabulka 3 Porovnávání vzniklého množství biofilmu u kmenů *P. aeruginosa* za 24 a 48 hodin po kultivaci v různých médiích.

Média	<i>P. a. 502</i>		<i>P. a. 39</i>		CCM	
	po 24 hod	po 48 hod	po 24 hod	po 48 hod	po 24 hod	po 48 hod
YNB US	0,2031	0,0871	-0,0026	0,0234	0,2046	0,5870
YNB Sigma	0,1441	0,0585	0,0060	0,0526	0,4869	0,9749
LB	0,2386	0,1049	0,2416	0,3895	0,7985	0,5486

Dalším cílem bylo zjistit, po kultivaci, v jakém médiu daný kmen bude produkovat nejvíce biofilmu, a tudíž které je pro něj ideální. Použitá média byla: YNB-glu od firmy US Biological a Sigma, LB médium. Složení daných médií je popsáno v kapitole o použitých chemikáliích 2.1. Médium YNB je přesně chemicky definované médium a hodí se spíše pro kultivaci kvasinek, LB médium je nejpoužívanější pro kultivaci bakterií a pro danou bakterii by mělo být nejvýhodnější. Není však chemicky definované, protože obsahuje kvasnicový extrakt a trypton. Porovnání jsme prováděli také z důvodu toho, aby se standardizoval postup stanovení množství vzniklého biofilmu v mikrotitračních destičkách a aby se různé mikroorganismy mohly kultivovat v jednom stejném médiu a výsledky tak mohly být zcela porovnatelné.

Hodnota OD₆₀₀ u všech daných kmenů před kultivací byla přibližně 0,0118. U prvního kmene s označením 502 můžeme vidět, že největší množství vytvořeného biofilmu bylo po kultivaci v médiu LB a to po 24 hodinách, což potvrdilo to, že LB médium je pro danou bakterii nejvhodnější. Že byla produkce biofilmu větší po 24 než 48 hodinách může ukazovat na to, že daný kmen dokáže vytvořit nejvíce biofilmu právě za 24 hodin a pak tato schopnost klesá, což nám koreluje s výsledky v tabulce 2. U druhého kmene s označením 39 bylo největší množství vytvořeného biofilmu v médiu LB po 48 hodinách. Tento výsledek nám opět potvrzuje to, že LB médium je nejlepší pro danou bakterii a trend zvyšování množství biofilmu po 24 a 48 hodinách to jen potvrzuje. V médiu YNB-glu kmen buď nedokázal vytvořit biofilm, nebo jen zcela nepatrné množství. U posledního sbírkového kmene s označením CCM můžeme vidět, že produkce biofilmu byla největší v médiu YNB od firmy Sigma po 48 hodinách. To nám ukazuje, že sbírkový kmen je variabilní a dokáže se rozrůst a vytvořit biofilm i v médiu, které pro něj není úplně ideální. Ačkoliv jsou obě média YNB-glu stejně chemicky definována, nejeví se nám během experimentů stejně. Podle hodnot v médiu LB lze říci, že tohle médium, které by mělo být ideální se dá také určitě používat.

Stanovení biofilmu Christensonovou metodou jsme také provedli u kmenů kvasinky *C. albicans* pro zjištění, zda se nějaký biofilm u kvasinek vytváří a zda tato metoda bude použitelná. Experiment probíhal za stejných podmínek jako u kmene *P. aeruginosa*.

Tabulka 4 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů kvasinky *C. albicans* po 24 a 48 hodinách při kultivaci v médiu YNB-glu.

	před inkubací	po 24 hod	po 48 hod
SC5314	0,0058	-0,0010	0,0190
hap5	0,0070	-0,0012	0,0224
rhb1	0,0060	-0,0020	0,0185

Tabulka (Tab. 4) ukazuje množství vytvořeného biofilmu u kmenů kvasinky *C. albicans* s označením SC5314, hap5 a rhb1. Největší produkci vidíme u kmene hap5 a to po 48 hodinách inkubace. Jedná se o kmen poskytnutý spolupracující laboratoří z National Tsing Hua University na Tchaj wanu, který spontánně tvoří především blastospory. A protože je biofilm tvořen převážně těmito kulatými kvasinkovými buňkami, ukazuje se kmen hap5 jako lepší producent biofilmu.

Jako druhý producent biofilmu se nám ukázal kmen SC5314, což je kontrolní kmen. Jako poslední producent se projevil kmen rhb1. Záporné hodnoty u všech třech kmenů po 24 hodinách inkubace nám ukazují, že 24 hodin je nedostatečná doba inkubace pro produkci biofilmu. Je třeba také podotknout, že hodnoty množství vyprodukovaného biofilmu se od sebe zase tolik výrazně neliší. Tento způsob stanovení množství biofilmu pro kmene *C. albicans* nebyl úplně vhodný, proto jsme hledali způsob jiný.

2.3.2 Růžičkova metoda stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách

Při stanovení množství biofilmu u kmenů kvasinky *C. albicans* Christensenovou metodou se nám tento způsob stanovení nejevil jako ideální, proto jsme hledali jiný. Nalezli jsme metodu podle Růžičky, která byla používána přímo pro kvasinky rodu *Candida*, a proto jsme se rozhodli ji vyzkoušet.

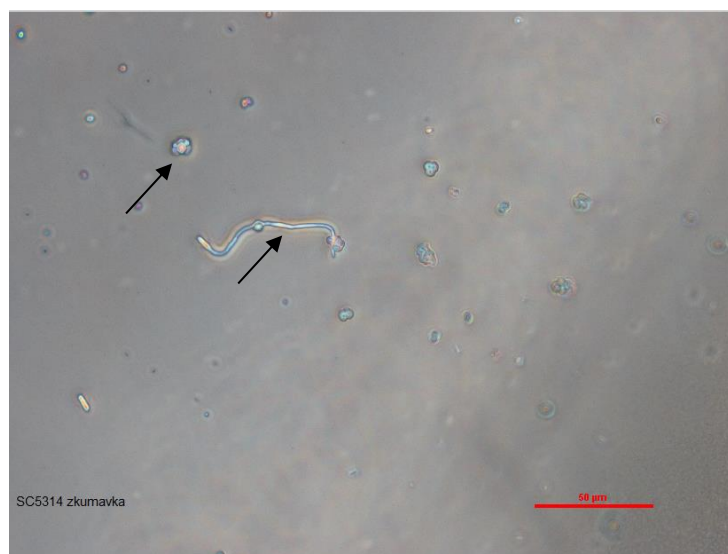
Tabulka 5 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů kvasinky *C. albicans* a *C. parapsilosis* po 48 hodinách při inkubaci v médiu YNB-glu.

	před inkubací	před barvením	po barvení
<i>C. a.</i> SC5314	0,0419	0,9288	0,0158
<i>C. a.</i> hap5	0,0356	1,0338	0,0178
<i>C. a.</i> rhb1	0,0285	0,9824	0,0226
<i>C. p.</i> P69	0,0423	1,5455	0,0422

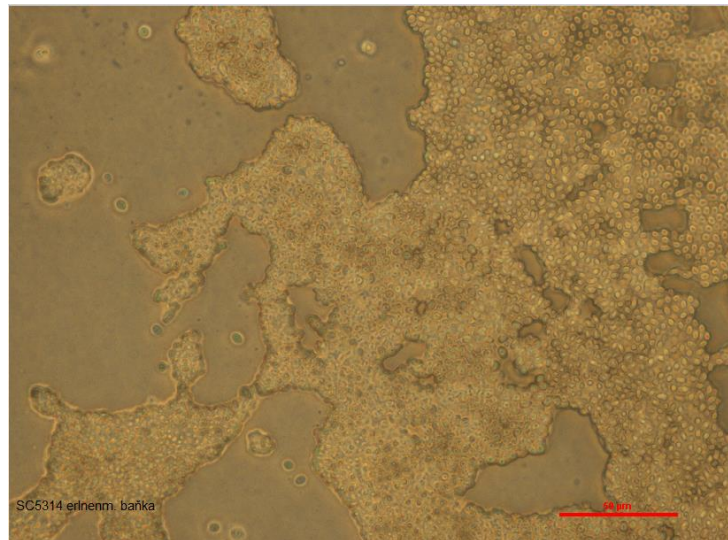
Tabulka (Tab. 5) nám ukazuje hodnoty vytvořeného množství biofilmu u kmenů kvasinky *C. albicans* s označením SC5314, hap5 a rhb1 a kmene kvasinky *C. parapsilosis* s označením P69. V tabulce nám hodnoty před inkubací ukazují, jakou absorbanci/hustotu měla kultura buněk vzorků v médiu před 48 hodinovou inkubací. Hodnoty před barvením nám ukazují, jakou absorbanci/hustotu měla kultura buněk vzorků v médiu po 48 hodinové inkubaci, tj. jak se dané vzorky při inkubaci rozrostly. Hodnota po barvení nám říká, kolik vzniklo biofilmu, tj. kolik se ho obarvilo krystalovou violetí, kterou jsme pak následně rozpustili v ethanolu a změřili absorbanci. Jako největší producent biofilmu se nám ukázal kmen *C. parapsilosis* P69, který nám zároveň vykazoval i nejvyšší nárůst buněk po 48 hodinové inkubaci. Toto zjištění nás nepřekvapilo, protože *C. parapsilosis* má obecně větší schopnost nárůstu buněk než *C. albicans*, a tudíž i pravděpodobně větší produkci biofilmu. Jako druhý producent se ukázal kmen *C. albicans* s označením rhb1. Jako další se zařadil kmen s označením hap5, a poté kontrolní kmen s označením SC5314. Lze tedy říci, že se nám ukázalo, že *C. parapsilosis* má větší schopnost produkce biofilmu než kmeny *C. albicans*, které se svými hodnotami výrazně nelišily.

2.3.3 Kontaminace hydrogelových čoček kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis*

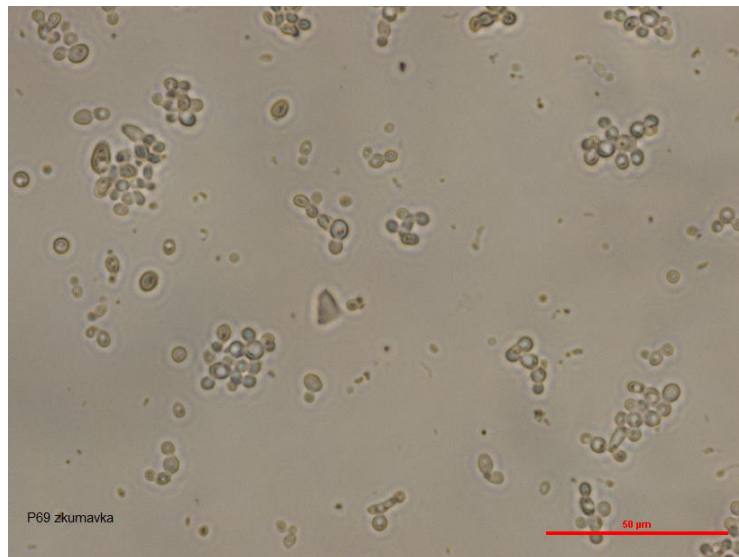
Kontaminovali jsme hydrogelové čočky SoftLens 59 od firmy Bausch & Lomb za účelem zjištění, zda se dokáží buňky kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis* na hydrogelových čočkách udržet (adherovat) a tím pádem mohou způsobovat oční infekce, které mohou vést až ke slepotě. Pro potvrzení uchycení buněk na čočce jsme použili mikroskopii při zvětšení 400x.



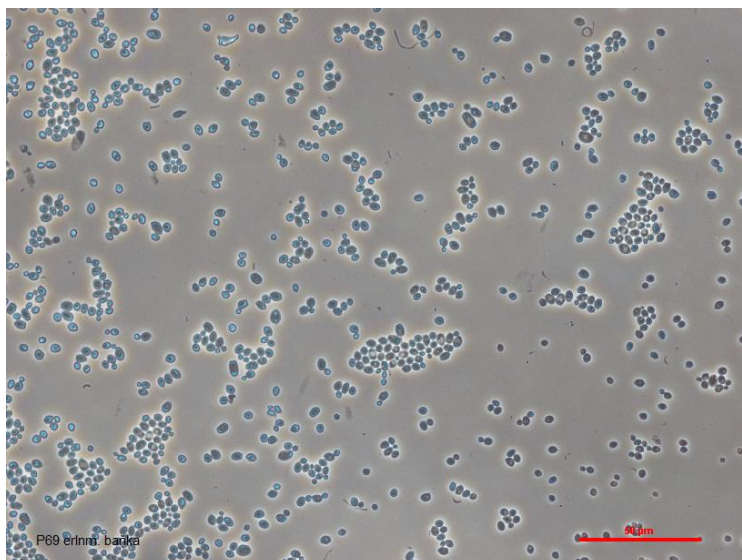
Obrázek 18 Povrch čočky po inkubaci s kmenem *C. albicans* SC5314, 12 dní inkubace ve zkumavce, zvětšení 400x.



Obrázek 19 Povrch čočky po inkubaci s kmenem *C. albicans* SC5314, 12 dní inkubace v erlenmeyerově baňce, zvětšení 400x.



Obrázek 20 Povrch čočky po inkubaci s kmenem *C. parapsilosis* P69, 12 dní inkubace ve zkumavce, zvětšení 400x.



Obrázek 21 Povrch čočky po inkubaci s kmenem *C. parapsilosis* P69, 12 dní inkubace v erlenmeyerově baňce, zvětšení 400x.

Z následujících fotografií je jasné, že se nám podařilo standardizovat experimentální metodu kontaminace hydrogelových čoček kmeny *C. albicans* a *C. parapsilosis*, a to v plastových zkumavkách a erlenmayerových baňkách, což jsme potvrdili vyfotografováním daných vzorků na mikroskopu. Tímto se nám také ukázalo to, že kontaktní čočka je lépe kontaminována při inkubaci v erlenmayerově baňce než ve zkumavce (viz Obr. 19 a Obr. 21), protože zkumavka má kónické dno a při inkubaci se kvasinky usazují tam a méně se jich přichytí na kontaktní čočce. Kdežto erlenmayerova baňka má rovné dno, na které se čočka usadila a mohla být více kontaminována. Takto kontaminované čočky jsme dále použili pro standardizování metody izolace DNA, PCR reakci a následnou potvrzovací elektroforézu.

2.3.4 Izolace DNA z kontaminovaných čoček

Při použití čočky přímo z kultury jsme počítali s tím, že čočka bude plně porostlá, a tudíž z ní bude možné izolovat více DNA, což se nakonec nepotvrdilo. Při použití metody zamražení a vysušení jsme chtěli využít toho, že čočka bude křehká a bude se dít lépe rozbít, a tedy z ní lépe půjde DNA izolovat. Což se nakonec nejlépe projevilo u metody vysušení, kdy kvasinky zůstaly na čočce fixovány a čočka byla křehká a dala se před izolací rozmělnit. K rozbítí buněčné stěny kvasinky jsme při izolaci použili skleněné korálky, které se také hodily na to, aby se rozrušila struktura hydrogelové čočky.

Aby byly výsledky porovnatelné, tak se před izolací kontaktní čočka vždy rozdělila přibližně na polovinu skalpelem. Po izolaci se nám jako nejlepší metoda úpravy čoček jevila metoda vysušení na vzduchu, protože umožňovala získat největší koncentraci DNA (viz Tab. 6). Tuto metodu jsme tedy dále používali pro další izolace DNA. Zavedením této metody

se nám podařilo vyizolovat DNA, která je vhodná k dalšímu použití např. k určení druhu kvasinky, která čočky kontaminovala.

Tabulka 6 Výsledky izolace DNA z kontaktních čoček po inkubaci s kmeny *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

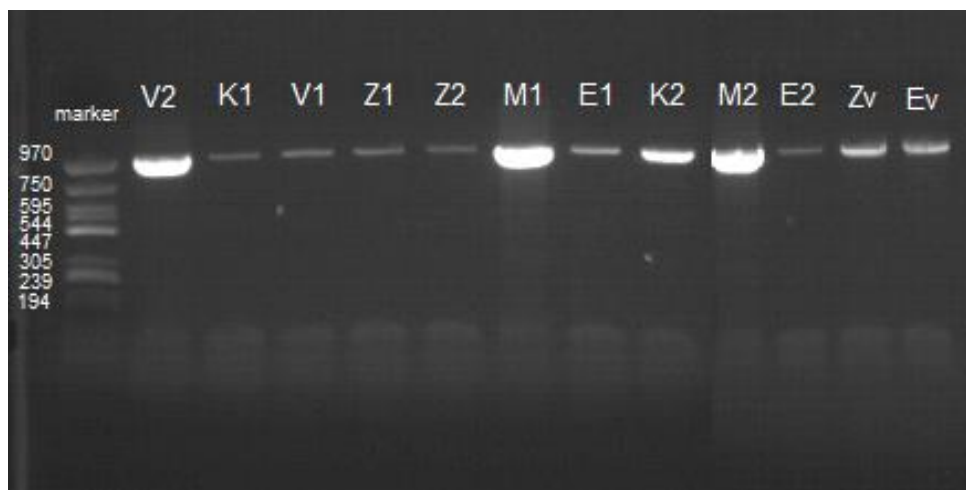
	Kmen	Úprava	Koncentrace DNA (ng/μl)
Z1	SC5314	kultura	16,07
Z2	SC5314	kultura	10,30
E1	SC5314	kultura	40,80
E2	SC5314	kultura	49,41
V1	SC5314	vysušení	217,68
V2	SC5314	vysušení	293,58
K1	SC5314	kultura	2,59
K2	SC5314	kultura	33,46
M1	SC5314	zamražení	34,20
M2	SC5314	zamražení	27,37
Ev	SC5314	vysušení	79,94
Zv	SC5314	vysušení	349,97
EvP	P69	vysušení	131,17
ZvP	P69	vysušení	56,28

Vysvětlivky: Z – ze zkumavky, E – z erlenmeyerovy baňky, V – vysušená, K – kultura, M – mrazák, Ev – z erlenmeyerovy baňky C. a., Zv – ze zkumavky C. a., EvP – z erlenmeyerovy baňky C. p., ZvP – ze zkumavky C. p..

Vzorky „kultura“ – čočka byla zpracována rovnou po vyjmutí z planktonické kultury kvasinek, vzorky „vysušení“ – čočka byla před izolací DNA vysušena volně na vzduchu, vzorky „zamražení“ – čočka byla před izolací DNA zamrazena při -20 °C.

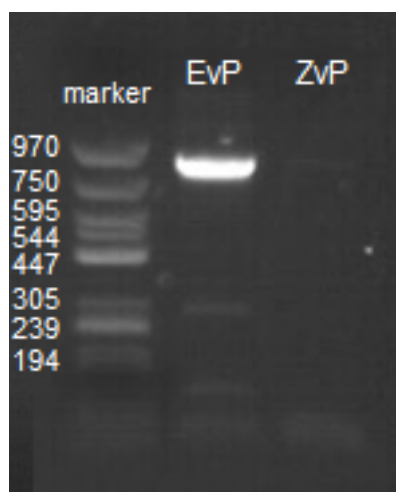
2.3.5 Amplifikace úseků DNA vyizolovaných z kontaminovaných čoček

Po PCR reakci, kde se nám vyizolované úseky DNA namnožily, jsme provedli elektroforézu s cílem zjistit, zda nám PCR reakce proběhla správně. Po této elektroforéze se výsledný gel osvítíl UV zářením a zobrazily se nám obarvené produkty určité velikosti.



Obrázek 22 Výsledný gel elektroforézy vzorků *C. albicans*. Vysvětlivky: Z – ze zkumavky, E – z erlenmeyerovy baňky, V – vysušená, K – kultura, M – mrazák, Ev – z erlenmeyerovy baňky *C. a.*, Zv – ze zkumavky *C. a.*.

Na výsledném gelu z elektroforézy vzorků *C. albicans* můžeme vidět, že u všech vzorků byl produkt očekávané velikosti, což nám značí, že PCR proběhla správně.

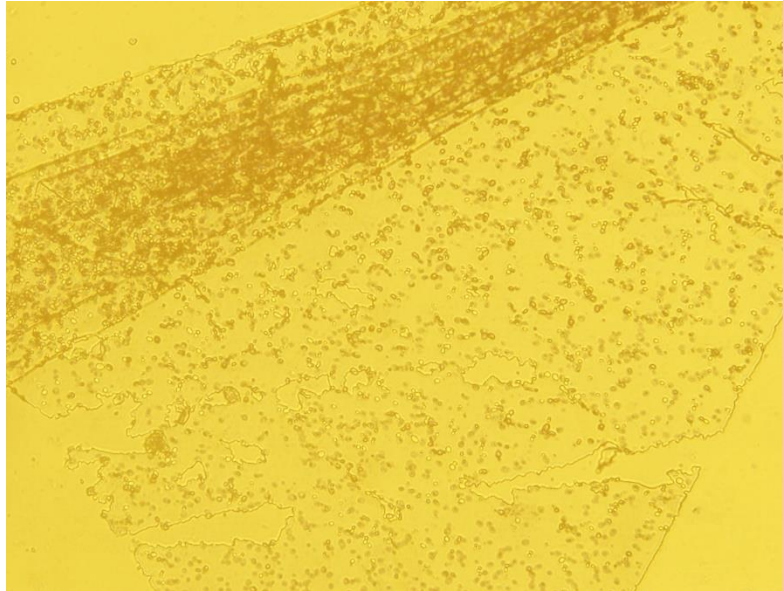


Obrázek 23 Výsledný gel elektroforézy vzorků *C. parapsilosis*. Vysvětlivky: EvP – z erlenmeyerovy baňky *C. p.*, ZvP – ze zkumavky *C. p.*.

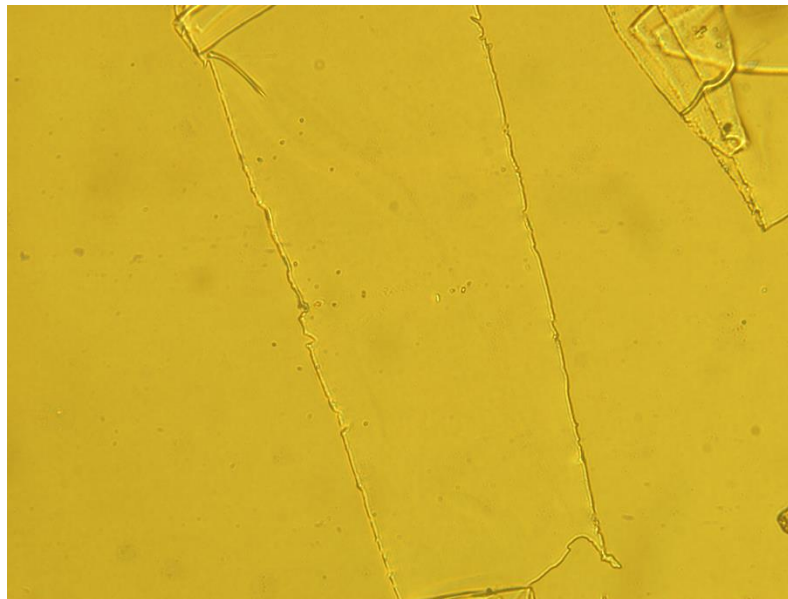
Na výsledném gelu elektroforézy vzorků *C. parapsilosis*, byl produkt u vzorku EvP velikosti 900 bp, což nám značí, že u něj proběhla PCR správně. U druhého vzorku ZvP nebyl produkt žádný, což značí, že buď PCR neproběhla správně, nebo byla chyba u elektroforézy. Tyto výsledky potvrzují, že DNA vyizolovaná z kontaminovaných čoček je vhodná k amplifikaci pomocí PCR, a tedy že je možno ji využít např. k identifikaci kontaminující kvasinky.

2.3.6 Inkubace kontaminované čočky v roztoku sacharózy

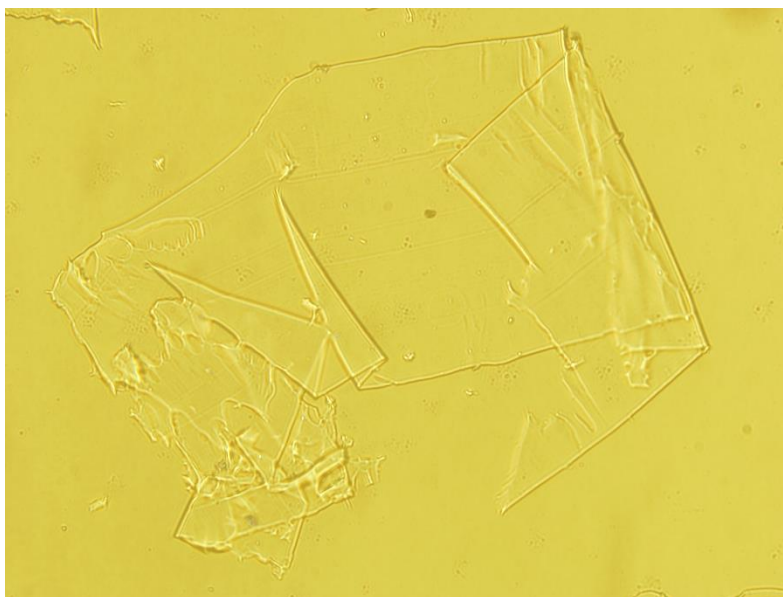
Fotografie čočky, která byla promyta v roztoku sacharózy před řezáním čočky na následnou mikroskopii.



Obrázek 24 Pozitivní kontrolní kvasinková suspenze, zvětšení 10 000x.



Obrázek 25 Kontrolní čočka bez kvasinek, zvětšení 10 000x, polotlustý řez čočky (1000 nm).



Obrázek 26 Čočka s kvasinkami *C. albicans* SC5314, zvětšení 10 000x, polotlustý řez (1000 nm).

Všechny tyto vzorky (Obr. 24-26) byly barveny toluidinovou modří 15 s při laboratorní teplotě.



Obrázek 27 Čočka s kvasinkami *C. albicans* SC5314, zvětšení 10 000x, polotlustý řez (1000 nm).

Tento vzorek (Obr. 27) byl barven toluidinovou modří 2 minuty při 80 °C.

Jak je z těchto fotografií patrné na kontaminovaných čočkách nejsou vidět žádné přichycené buňky, což nás přivádí na myšlenku, že byly odstraněny při promývání v roztoku

sacharózy, který se běžně používá ke zakonzervování před řezáním materiálu na mikroskopii. Proto jsme tedy provedli test, zda má sacharóza na přichycené buňky na kontaktní čočce vliv.

Hodnota OD_{600} buněčné suspenze, do které byla vkládána sterilní čočka byla 2,14. Po jednom dnu inkubace kontaminované čočky vložené do roztoku sacharózy jsme pod mikroskopem již mohli pozorovat, že se nám většina buněk z čočky odmyla a v zorném poli bylo vidět minimálně buněk, čočka byla spíše zanesená. Čočka byla vrácena do roztoku a pozorována pod mikroskopem po sedmi dnech inkubace. Zde bylo vidět, že se stav více méně nezměnil, byly vidět oproti předchozí mikroskopii hyfální buňky než kulaté kvasinkové a čočka byla ulepená. Po této inkubaci se vzala „vyčištěná“ čočka a vložila se do čistého média YNB-glu a nechala se v něm inkubovat pět dnů. Po této inkubaci se změřilo OD_{600} daného roztoku, které mělo hodnotu 0,014. Tato hodnota je velice nízká a říká nám, že čočka po inkubaci v roztoku sacharózy nebyla schopná znovu kontaminovat čisté médium. Tímto se nám potvrdilo, že inkubace v roztoku sacharózy nám z kontaktní čočky odmyla buňky a že tedy není vhodné před mikroskopií v tomto roztoku čočku promývat. Pokud by byl tento krok nutný, tak je třeba buňky na čočce před promýváním zafixovat např. roztokem glutaraldehydu, formaldehydu atd.

2.3.7 Kontaminace kontaktních čoček v časovém intervalu

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit minimální dobu inkubace, při které se nám čočka dokáže kontaminovat a tím pádem pak dokáže kontaminovat čisté médium a zda bude rozdíl v tom, když se kontaminovaná čočka promyje ve fyziologickém roztoku, který by se nejvíce měl přibližovat roztokům, které se používají na čištění a uchovávání kontaktních čoček po nošení uživatelem. Prováděli jsme tento experiment dvakrát, jednou s časovou osou inkubace 10 min, 30 min, 1 hod, 1:30 hod, 2 hod, 2:30 hod, 3 hod, 3:30 hod, 4 hod, 1 den, 2 dny a 7 dnů a podruhé s nižším počtem časů a to 10 min, 30 min, 1 hod, 4 hod, 1 den a 7 dnů.

Tabulka 7 Časová kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. albicans* SC 5314. Hodnoty OD₆₀₀ nám udávají absorbanci média YNB-glu po kultivaci s kontaminovanou čočkou.

C.a. SC5314	čištěné		nečištěné	
	čas	OD₆₀₀		OD₆₀₀
10 min	2,35	2,71	2,81	2,15
30 min	1,47	2,07	1,91	3,06
1 hod	2,64	2,61	2,26	2,86
1:30 hod	1,63		2,16	
2 hod	1,62		2,07	
2:30 hod	1,81		1,99	
3 hod	1,76		2,28	
3:30 hod	1,40		1,68	
4 hod	0,83	1,50	0,98	1,63
1 den	1,91	1,29	2,55	2,04
2 dny	2,12		2,49	
7 dnů	1,88	3,02	1,97	3,13

Vysvětlivky: čištěné – kontaktní čočka před kultivací v čistém médiu promyta ve fyziologickém roztoku, nečištěné – kontaktní čočka z planktonické kultury rovnou vložena do čistého média.

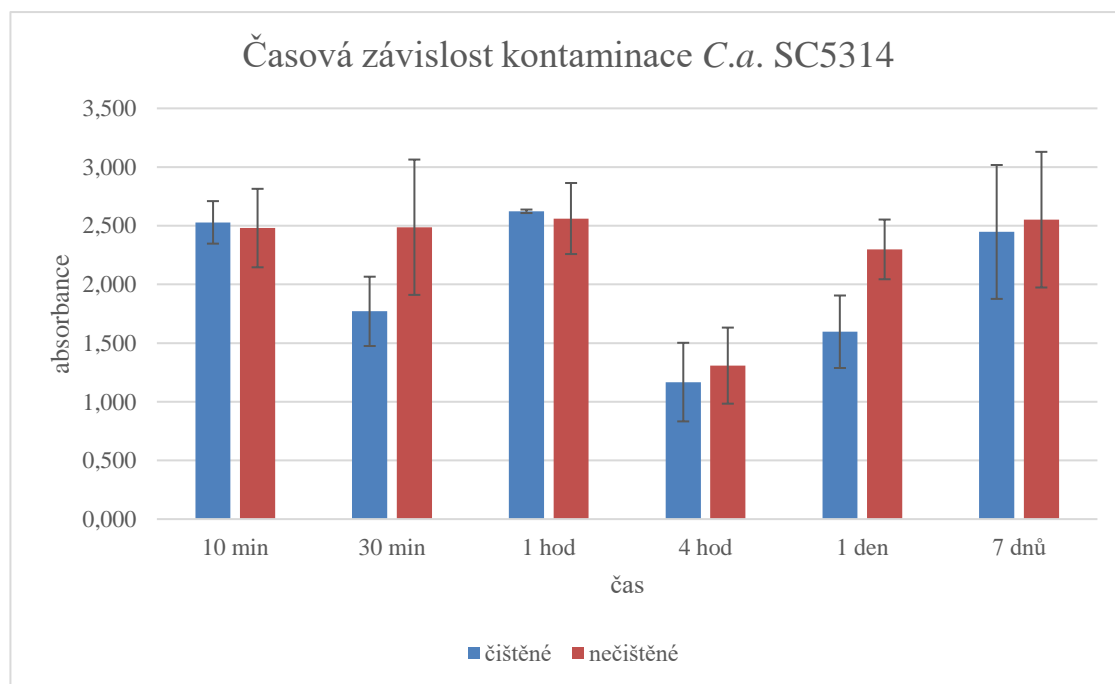
Tabulka 8 Časová kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. parapsilosis* P69. Hodnoty OD₆₀₀ nám udávají absorbanci média YNB-glu po kultivaci s kontaminovanou čočkou.

C.p. P69	čištěné		nečištěné	
	čas	OD₆₀₀		OD₆₀₀
10 min	2,17	1,23	2,19	2,36
30 min	1,99	1,56	2,32	2,21
1 hod	1,49	2,04	2,10	2,06
1:30 hod	2,00		2,28	
2 hod	1,57		1,83	
2:30 hod	1,43		2,06	
3 hod	1,17		1,88	
3:30 hod	2,13		2,47	
4 hod	1,71	1,52	2,18	1,87
1 den	1,78	2,22	2,25	2,52
2 dny	2,84		3,05	
7 dnů	1,61	3,02	1,97	2,03

Vysvětlivky: čištěné – kontaktní čočka před kultivací v čistém médiu promyta ve fyziologickém roztoku, nečištěné – kontaktní čočka z planktonické kultury rovnou vložena do čistého média.

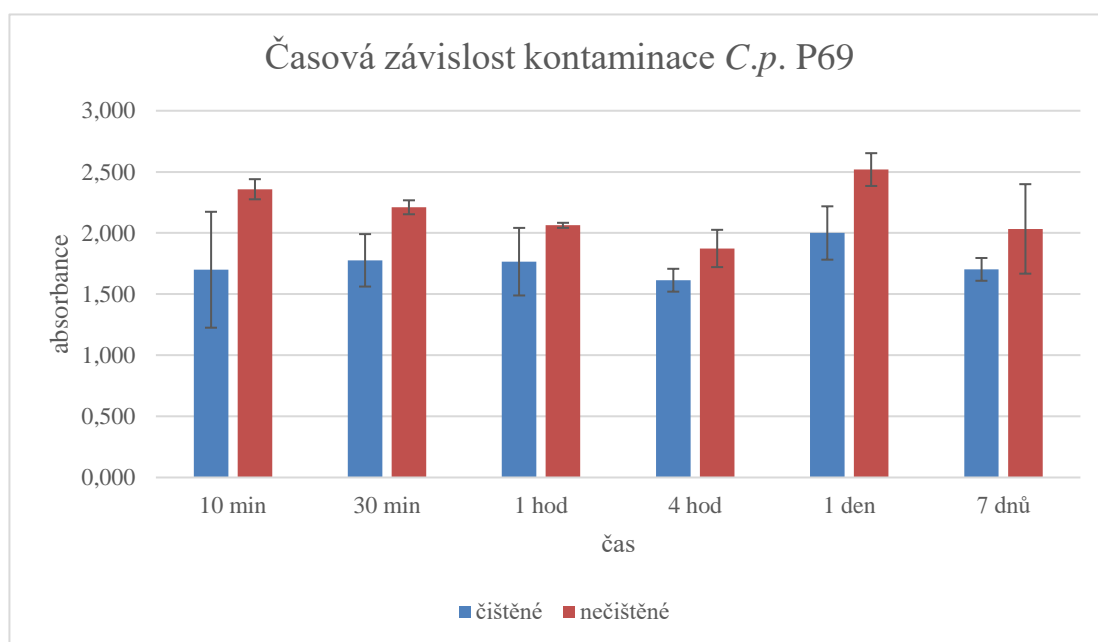
Z toho experimentu nám vyšlo to, co se dalo očekávat, a to, že čočky, které byly promyté ve fyziologickém roztoku vykazovaly ve většině případů nižší hodnoty absorbance než čočky, které promyty nebyly. Je to logické, protože fyziologický roztok by měl mít schopnost buňky

z čočky odmyvat. V jak velké míře a za jak dlouhou dobu inkubace nelze přesně specifikovat, ale při jiném experimentu, kdy se kontaktní čočky nechaly ve fyziologickém roztoku omývat 7 dnů se většina buněk odstranila, ale ne stoprocentně a při vložení takto omyté čočky do čistého média YNB-glu se ukázalo, že čočka médium dokázala kontaminovat. Můžeme tedy říci, že fyziologický roztok nám zabraňuje adhezenci buněk na kontaktní čočku, ale nedokáže buňky z čočky odstranit stoprocentně. Dále se ukázalo, že v časovém intervalu 10 minut až 4 hodiny docházelo ke snižování hodnoty absorbance. Nejvíce je to patrné u *C. albicans*, kde hodnota absorbance klesla z původní 2,3 až na 0,8, což pro nás bylo zajímavou informací z hlediska toho, že se i po tak krátké době inkubace čočka dosti kontaminovala a s rostoucí dobou inkubace, kdy měla více času se kontaminovat, naopak došlo pravděpodobně k omývání již přichycených buněk. U *C. parapsilosis* není již tak patrná posloupnost hodnot, ale také došlo ke snížení hodnoty absorbance u intervalu 10 min až 4 hodiny z původních 2,1 na 1,7. Dále můžeme říci, že absorbance u inkubace po 1 a 2 dnech stoupala, tedy buňky se více namnožily a většina z nich se přilnula k čočce. U inkubace po 7 dnech u *C. albicans* se nám v prvním experimentu ukázalo, že hodnoty absorbance klesly, naopak u druhého experimentu stouply oproti 1-2 dnům inkubace. Můžeme tedy říci, že hodnota absorbance po 7 dnech je kolísavá a již nemá tak velký význam oproti inkubaci kratší dobu. Podobně to bylo i u *C. parapsilosis*, kde nám tři za čtyřech hodnot ukazovaly nižší absorbanci, než byla při kratší inkubaci 1-2 dny.



Obrázek 28 Časová závislost kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. albicans* SC5314.

Na grafu můžeme vidět porovnání časové závislosti kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. albicans* SC5314 u čištěných a nečištěných vzorků po zprůměrování hodnot předchozích experimentů. Ve velkém množství případů je viditelné, že se potvrdilo to, že kontaminované kontaktní čočky po promytí ve fyziologickém roztoku vykazovaly nižší hodnoty absorbance než čočky nepromyté. Také můžeme říci, že hodnota absorbance po 4 hodinách inkubace značně klesla, a to jak u vzorků čištěných, tak nečištěných.



Obrázek 29 Časová závislost kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. parapsilosis* P69.

Na tomto grafu můžeme vidět porovnání časové závislosti kontaminace kontaktních čoček kvasinkou *C. parapsilosis* P69 u čištěných a nečištěných vzorků po zprůměrování hodnot předchozích experimentů. Jasně se nám potvrdilo, což je patrné u všech hodnot absorbance, že promytí kontaminovaných čoček ve fyziologickém roztoku způsobilo snížení absorbance média. Také se nám potvrdilo, že nejnižší hodnotu absorbance nalezneme u inkubace po 4 hodinách, i když zde nebyl patrný takový viditelný rozdíl jako u *C. albicans* a také nebyl patrný takový skokový rozdíl v hodnotách absorbancí u časových inkubací.

Můžeme tedy říci, že tento experiment nám dokázal, že promývání kontaminovaných čoček ve fyziologickém roztoku způsobuje snížení hodnot absorbancí oproti čočkám nepromývaným. Také nám ukázal, že hodnota absorbance po 4 hodinách inkubace byla ze všech dalších hodnot nejnižší, což nám může říkat, že tento čas je přechodný mezi okamžitou přilnavostí buněk na kontaktní čočku za krátký čas, což nám způsobí vysoké hodnoty absorbance a mezi delší dobou kontaminace, kdy jsou buňky v roztoku víc namnožené, a proto

se jich většina adhezuje na čočku, což nám pak také způsobí vyšší hodnotu absorbance. Ukázalo se nám i to, že jsou rozdíly v kontaminaci čoček kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis*.

Protože jsme měli vysoké hodnoty absorbance u inkubace 10 min a 30 min rozhodli jsme se u těchto vzorků provést izolaci DNA pro potvrzení toho, že na kontaktní čočce byly přítomné buňky kvasinek. Izolace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.5.

Tabulka 9 Koncentrace DNA vzorků *C. albicans* SC5314 a *C. parapsilosis* P69 u časové kontaminace kontaktních čoček po 10 min a 30 min.

<i>C.a.</i>	čištěné		průměr	nečištěné		průměr
c DNA(ng/μl)						
10 min	52,53	76,49	64,51	66,15	48,31	57,23
30 min	23,40	112,60	68,00	91,04	315,11	203,08
<i>C.p.</i>						
10 min	61,26	77,67	69,46	72,80	50,51	61,66
30 min	28,30	4,09	16,20	23,83	26,83	25,33

Z tabulky (Tab. 9) je patrné, že se v některých případech koncentrace u stejných vzorků lišily. To může být způsobeno množstvím různých faktorů, protože kvasinky jsou živé organismy, u kterých lze jen stěží předpokládat stejné chování při provádění opakovaných postupů. Podle daných výsledků ale můžeme říci, že při 10 min inkubaci byla koncentrace DNA čištěných vzorků větší než u nečištěných, což je dosti překvapující, protože to neodpovídá našemu předchozímu měření, kdy absorbance těchto vzorků byla nižší než u vzorků nečištěných. Podle tohoto zjištění můžeme říci, že při 10 min inkubaci se buňky nejspíše dostaly do materiálu kontaktní čočky, odkud se neuvolnily při kontaminaci čistého média, ale předúpravou čočky před izolací DNA a při samotné izolaci, kdy se používají skleněné kuličky, pro co nejlepší narušení materiálu čočky, se z nich dostala DNA. Je třeba také říci, že rozdíl mezi koncentrací DNA po 10 min inkubaci u čoček čištěných i nečištěných se moc neliší, a to ani u vzorků *C. albicans* ani *C. parapsilosis*. U 30 min inkubace jsme měli hodnoty koncentrace DNA takové, jaké se daly očekávat. U vzorků čištěných byla ve všech případech koncentrace DNA nižší než u vzorků nečištěných. V tomto případě lze předpokládat, že se při této inkubaci buňky již tolik nepřichytily do materiálu, jako tomu bylo u kratší inkubace. U této inkubace se již lišily hodnoty koncentrace DNA u vzorků *C. albicans* a *C. parapsilosis*, kdy vzorky *C. albicans* vykazovaly vyšší hodnoty koncentrace DNA než vzorky *C. parapsilosis*.

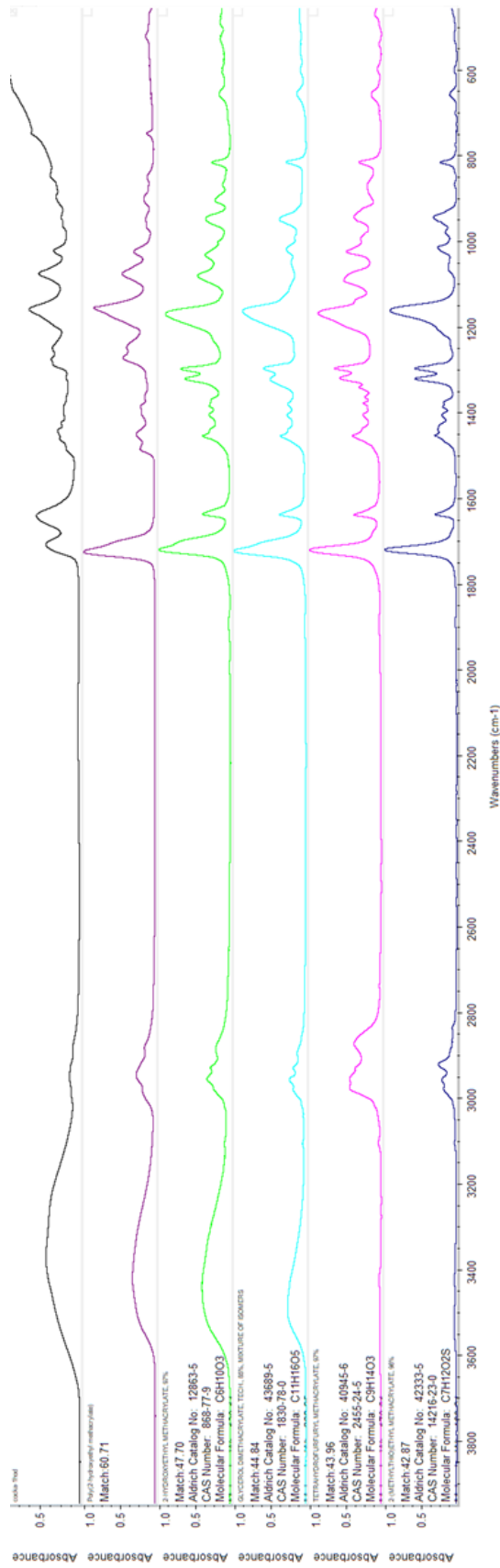
Zjistili jsme tedy, že čočky, které jsou kontaminované takovýto krátký čas obsahují v sobě buňky, ze kterých lze vyizolovat DNA, a to v docela slušných hodnotách. Také to, že krátkodobá inkubace (10 min) jak u čištěných i nečištěných vzorků vykazuje hodnoty

koncentrace DNA, které se od sebe značně neliší. Na rozdíl od 30 min inkubace kde již byly rozdíly patrné a kde se nám potvrdilo to, co u kontaminace čistého média, že promyté čočky ve fyziologickém roztoku mají nižší nárůst buněk než čočky nepromyté. Proto je třeba dbát na čistotu kontaktních čoček a na uchovávání ve sterilním roztoku a sterilním pouzdře, protože již při krátkodobém kontaktu s kvasinkami dojde k jejich silnému navázání na kontaktní čočku a lehce lze tak dostat kvasinku do kontaktu s okem, což může způsobit infekci a při dlouhodobé infekci to může vést až ke slepotě.

2.3.8 Měření infračervených spekter kontaminované a nekontaminované kontaktní čočky

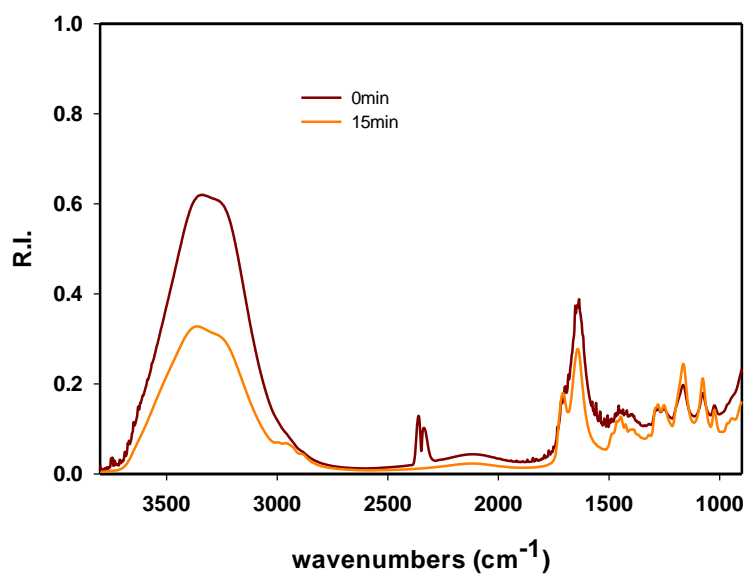
FTIR spektroskopie byla použita s cílem získat informace o chemické struktuře materiálu, ze kterého jsou kontaktní čočky vyrobeny. Podle informace výrobce měly být vyrobeny z materiálu hilafilcon B, jehož složení je popsáno ve kapitole 1.5.3. Změřené spektrum čisté kontaktní čočky (Obr. 30) jsme porovnali s knihovnou dostupných spekter, kde největší shoda experimentálního spektra (60% resp. 47%) je s IR spektry látky 2-hydroxyethylmethakrylát (HEMA) od různých výrobců (Obr. 30). To potvrdilo, že studované čočky jsou zřejmě z materiálu známého pod názvem hilafilcon B, protože v tomto materiálu můžeme tuto látku nalézt jako jednu z nejvíce obsažených.

Jako další jsme metodou ATR zjišťovali eventuální rozdíly ve vysychání čisté sterilní čočky v porovnání s čočkami kontaminovanými kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Postupné zasychání čoček je charakterizováno postupným snižováním pásů ve spektrálním intervalu $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (oblast $\nu(\text{O-H})$ vibrací vody) a pásu kolem 2100 cm^{-1} (kombinační vibrace charakteristická pro IR absorpční spektrum vody) a zároveň pásy $\nu(\text{C-H})$ vibrace (2991 cm^{-1}), $\nu\text{S}(\text{C-H})$ 2950 cm^{-1} a $\nu\text{A}(\text{C-H})$ 2850 cm^{-1} jsou zřetelnější, protože nejsou překryty pásy $\nu(\text{O-H})$ vody. Pokles intenzity pásu $\nu(\text{O-H})$ je nejprve způsobeno celkovým oschnutím studované čočky v prvních 15ti minutách experimentu (Obr. 31A) a následným celkovým vysycháním čočky v 15té až 60té minutě experimentu (Obr. 31B). Se snižováním obsahu vody v kontaktní čočce se zvýrazňují vazby polymerního materiálu, ze kterého je čočka vyrobena. Výsledná spektra jsou zaznamenána na Obr. 31-33.

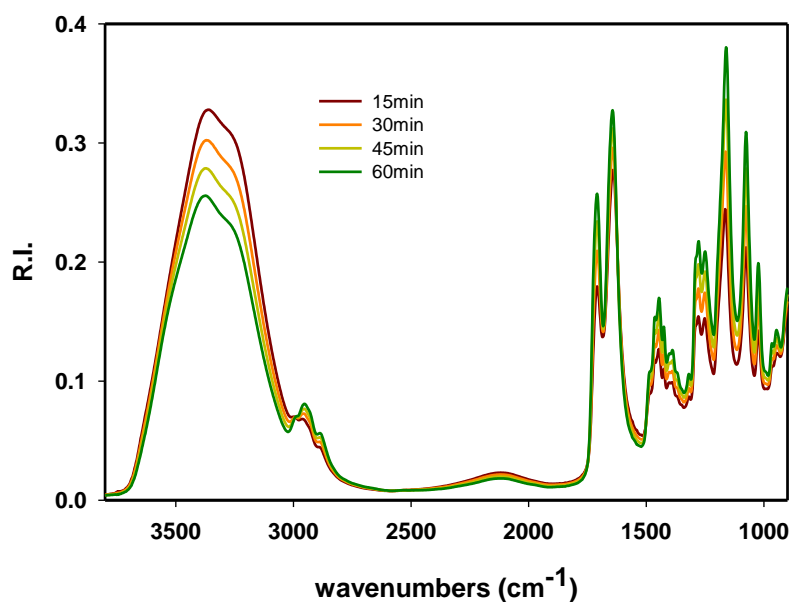


Obrázek 30 Porovnání ATR spektra čisté kontaktní čočky s knihovnou spekter dostupných látek. Na ose y nalezneme vlnočet, na ose x absorbanci.

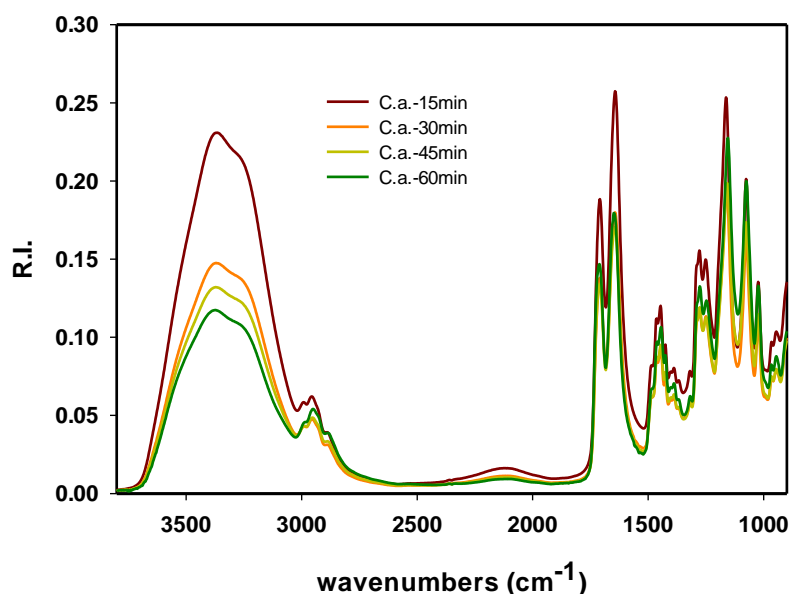
A



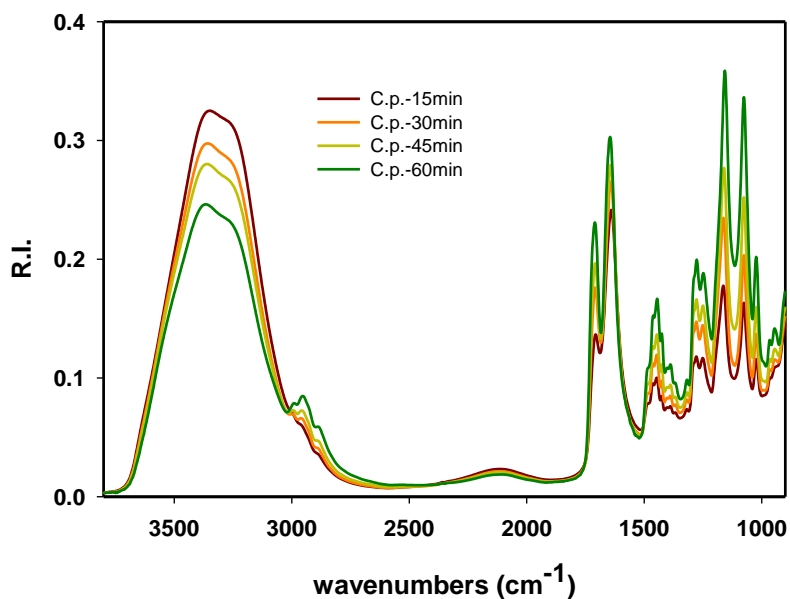
B



Obrázek 31 ATR spektrum sterilní kontaktní čočky zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru. Na ose x je vlnočet, na ose y absorbance. A – spektra v časovém intervalu 0-15 min, B – spektra v časovém intervalu 15-60 minut.



Obrázek 32 ATR spektrum kontaktní čočky kontaminované kvasinkou *C. albicans* zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru. Na ose x je vlnčet, na ose y absorbance.

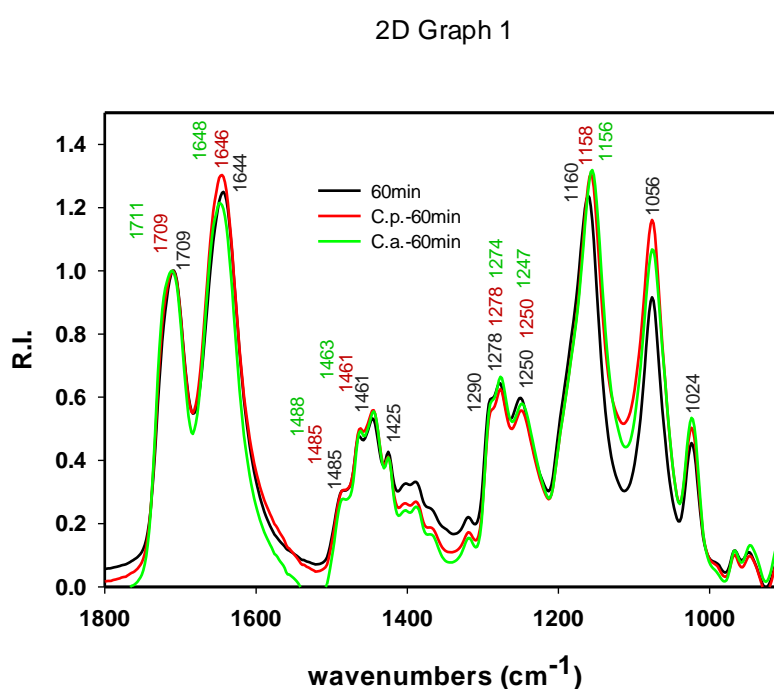


Obrázek 33 ATR spektrum kontaktní čočky kontaminované kvasinkou *C. parapsilosis* zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru. Na ose x je vlnčet, na ose y absorbance.

Při porovnání výsledných spekter můžeme říci, že dochází k vysychání kontaktních čoček u všech vzorků s rovnoměrnou klesající tendencí. Nejvíce se od spektra čisté kontaktní čočky lišilo spektrum čočky kontaminované kvasinkou *C. albicans*, kdy v čase 15-30 min došlo k většímu poklesu pásu $\nu(\text{O-H})$ vibrací. Také při porovnání pásu $\nu(\text{C-H})$ vibrací můžeme vidět, že u kontaminované čočky je nejvyšší pás zaznamenan při měření po 15 min. Z tohoto vyplývá,

že při kontaminaci čočky kvasinkou *C. albicans* mohlo dojít k narušení struktury kontaktní čočky, což mohlo způsobit rychlejší vysychání. Toto poškození bylo větší než u kontaminace kvasinkou *C. parapsilosis*, protože při porovnání jejího spektra se spektrem čisté kontaktní čočky nedošlo k tak výraznému poklesu, pouze k mírnějšímu rozdílnému poklesu pásu $\nu(\text{O-H})$ vibrací v čase 45-60 min. Při porovnání $\nu(\text{C-H})$ vibrací můžeme říci, že nedošlo k žádnému výraznějšímu rozdílu.

Při porovnání pásů zaznamenaných po 60 min vysychání čisté kontaktní čočky a kontaminované čočky kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis* dostaneme výsledné spektrum (Obr. 34).



Obrázek 34 ATR spektrum porovnávající pásy zaznamenané po 60 min vysychání čisté kontaktní čočky, kontaktní čočky kontaminované *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Měřeno pomocí infračerveného spektrofotometru. Na ose x je vlnočet, na ose y absorbance.

Hodnoty vlnočtů pro vazby, které se vyskytují v kontaktní čočce:

1709 cm^{-1} – $\nu(\text{C=O})$ karbonyl

1644 cm^{-1} – terciární amid

1485 cm^{-1} – kruh pyrrolidinu

1461 cm^{-1} – možná kruh, ale také deformační $\delta(\text{CH}_3)$

1425 cm^{-1} – deformační $\delta(\text{CH}_2)$

1278 cm^{-1} – $\nu\text{A}(\text{C-O})$ esteru

1250 cm^{-1} – $\nu\text{A}(\text{C-O})$ esteru

1160 cm^{-1} – $\nu\text{S}(\text{C-O})$ esteru

1066 cm^{-1} – $\nu\text{S}(\text{C-O})$ éteru

Podle toho shrnujícího spektra bychom mohli říci, že rozdíl mezi čistou kontaktní čočkou a kontaminovanými čočkami kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis* vysoušenými 60 min není až tak markantní. Lze tedy konstatovat, že kvasinky, které osídlí kontaktní čočku nemají až takový velký vliv na její složení, ale při delším osídlení může dojít ke strukturním přestavbám, kdy kvasinka si může vytvořit dutiny v čočce, odkud je pak těžší ji z dané čočky odstranit.

2.3.9 Omývání kontaminované čočky v roztoku přímo určenému pro kontaktní čočky

Po předchozích pokusech jsme se rozhodli, že zkusíme pokus omývání čoček v roztoku určenému přímo pro kontaktní složky. Zvolili jsme roztok Zero-Seven Refreshing od firmy Polytouch Chemical Co., který je volně dostupný na trhu a měl by být vhodný pro čištění a uchování kontaktních čoček všech typů. Tento roztok se skládá z polyhexametylenbiguanidu (PHMB), ethylendiaminotetraacetátu sodného, hypromelózy, D-sorbitolu, poloxameru, kyseliny borité, chloridu sodného a boraxu (tetraboritan sodný). Provedli jsme čištění kontaminovaných čoček podle návodu a poté čočky vložili do média YNB-glu na 24 hodin při 37 °C do laboratorní třepačky a změřilo se OD_{600} .

Tabulka 10 Hodnoty absorbance média YNB-glu po inkubaci kontaminované čočky kvasinkou *C. albicans* a *C. parapsilosis* po předchozím čištění v roztoku Zero-Seven Refreshing.

<i>Candida</i>	OD_{600}
<i>C. albicans</i>	2,25
<i>C. parapsilosis</i>	1,69

Z této tabulky (Tab. 10) můžeme vidět, že i přes čištění kontaktních čoček v roztoku podle návodu, který uvádí výrobce se nám u obou kvasinek objevil nárůst buněk v médiu. U *C. albicans* byl tento nárůst výraznější než u *C. parapsilosis*. Je tedy vidět, že se nelze spoléhat na návody výrobců, protože kvasinky jsou opravdu velice přilnavé a pouhé lehké omytí čoček nestačí k tomu, aby se všechny buňky z čoček odstranily.

2.3.10 Rozpouštění kontaktních čoček

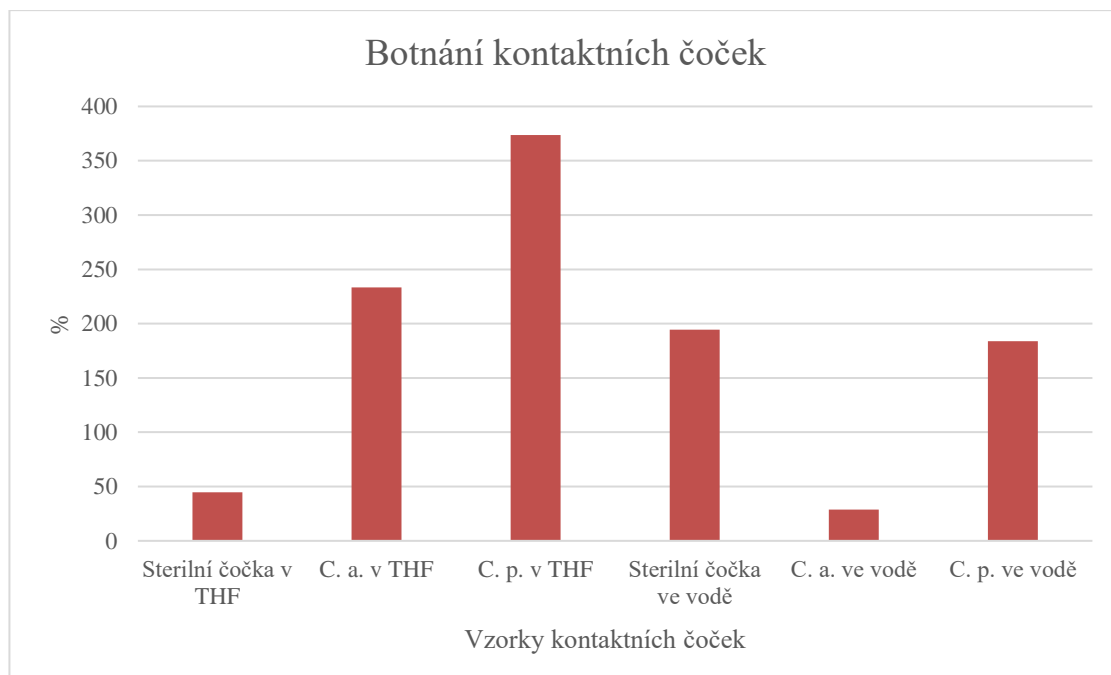
Pro rozpouštění byla použita tato rozpouštědla: aceton, cyklohexanon, chloroform, ethanol, methanol, N,N-dimethylformamid, technický benzín a THF. Vzorky sterilních čoček se vložily do asi 5 ml těchto rozpouštědel. Po půl hodině průběžného třepání s nimi se však ani jeden vzorek nerozpustil, proto jsme přistoupili k zahřívání ve vodní lázni. Postupně se vzorky zahřály až na 80 °C, kdy nám některá rozpouštědla začala vařit, a i tak k rozpouštění stále nedošlo. Proto jsme vzorky nechali 2 dny stát při laboratorní teplotě. Ani po této delší době ale k rozpouštění žádného vzorku nedošlo, a tak jsme jej ukončili. Výsledkem rozpouštění tedy je, že kontaktní čočka je z polymerního materiálu, který tvoří 3D síť a tudíž se nám jej nepodařilo rozpustit.

2.3.11 Botnání a stanovení extrahovatelného podílu kontaktních čoček

Pro oba tyto experimenty byla zvolena jako rozpouštědla THF (tetrahydrofuran) a voda. Botnání bylo zvoleno z důvodu, že čočka jakožto velice dobrý absorbent dokáže do své struktury pohltit velké množství vody, a naopak jej při vysušení ztratit. Pro porovnání botnání byl zvolen i roztok THF. Protože je kontaktní čočka vyrobena ze zesíťovaného materiálu hilafilcon B, bylo zařazeno stanovení extrahovatelného podílu pro zjištění toho, kolik obsahuje čočka ve své struktuře množství nezesíťovaného podílu. Jako kontrolní vzorky byly použity sterilní kontaktní čočky a čočky kontaminované *C. albicans* po 60 min inkubaci a čočky kontaminované *C. parapsilosis* po 60 min inkubaci.

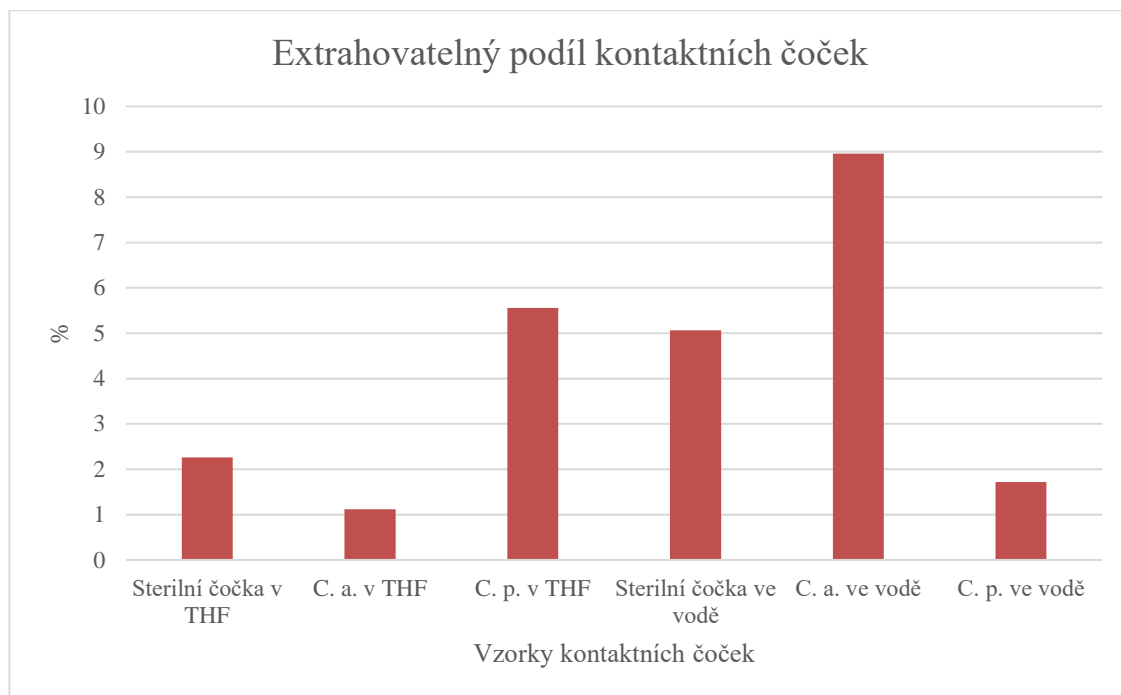
Tabulka 11 Výsledky botnání a extrahovatelného podílu u kontaktních čoček.

	hmotnost vysušené čočky [g]	hmotnost nabotnané čočky [g]	% botnání	hmotnost vysušené čočky [g]	% extrahovatelného podílu
Sterilní čočka v THF	0,0204	0,0295	44,72	0,0199	2,26
<i>C. a.</i> v THF	0,0180	0,0600	233,33	0,0178	1,12
<i>C. p.</i> v THF	0,0152	0,0720	373,68	0,0144	5,56
Sterilní čočka ve vodě	0,0208	0,0611	194,46	0,0198	5,06
<i>C. a.</i> ve vodě	0,0146	0,0188	28,77	0,0134	8,96
<i>C. p.</i> ve vodě	0,0236	0,0670	183,90	0,0232	1,72



Obrázek 35 Graf botnání vzorků kontaktních čoček v roztoku THF a ve vodě.

Při porovnání výsledků botnání v THF sterilní kontaktní čočkou a kontaminovaných čoček kvasinkami *C. albicans* a *C. parapsilosis* můžeme jasně vidět, že kontaminované čočky v procentech botnání jasně sterilní čočku převýšily. Lze tedy říci, že kontaminované čočky do sebe dokáží absorbovat více těkavého rozpouštědla THF než čistá kontaktní čočka. Jako největším absorbentem THF se ukázala čočka kontaminovaná kvasinkou *C. parapsilosis*, jenž do sebe absorbovala více jak 3,5x svého objemu. Botnání ve vodě ukázalo, že rozdíly v botnavosti byly oproti THF rozdílné. Sterilní čočka do sebe dokázala absorbovat skoro 200 % vody, v čem se jí na neveliký rozdíl přiblížila čočka kontaminovaná kvasinkou *C. parapsilosis*. Čočka kontaminovaná *C. albicans* pak měla nejmenší procenta botnavosti, a to ze všech vzorků.



Obrázek 36 Graf extrahovatelného podílu vzorků kontaktních čoček v roztoku THF a ve vodě.

Nejvíce extrahovatelného podílu, tedy nejvíce nezesíťovaného podílu v sobě obsahovala (nejvíce se z ní extrahovalo) kontaktní čočka kontaminovaná kvasinkou *C. albicans*, a to při extrakci ve vodě. Jako druhý největší extrahovatelný podíl měla čočka kontaminovaná kvasinkou *C. parapsilosis*, a to při extrakci v THF. Spojení kvasinky *C. parapsilosis* a rozpouštědla se ukázalo jako jedno z klíčových, protože tato čočka do sebe dokázala absorbovat nejvíce tohoto rozpouštědla, a to z ní pak naopak dokázalo extrahovat skoro nejvíce nezesíťovaného podílu. Lze tedy říci, že kontaminace čočky touto kvasinkou měla vliv na strukturní složení čočky. U kvasinky *C. albicans* pak můžeme vidět rozdílné vlastnosti. Při vysoké absorpci v rozpouštědle THF se nám dokázal vyextrahovat jen malý podíl nezesíťovaných složek, a naopak při nízké absorpci ve vodě se nám dokázal vyextrahovat největší podíl nezesíťovaných složek. Jde tedy vidět, že kontaminace kontaktní čočky je rozdílná v tom, jakým druhem kvasinky se kontaminuje a že to má pak vliv na vlastnosti samotné čočky.

3 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit biofilm patogenních kvasinek na hydrogelových kontaktních čočkách. Protože jsme již dříve pracovali s kvasinkami rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) a bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, použili jsme je jako pokusné mikroorganismy. Kontaktní čočky jsme používali standardní hydrogelové od firmy Bausch & Lomb s označením SoftLens 59. Před přímou kontaminací čoček jsme nejdříve museli potvrdit, že dané mikroorganismy tvoří biofilm, a proto jsme zvolili Christensenovu metodu stanovení biofilmu v mikrotitračních destičkách. Použili jsme standardně dostupné mikrotitrační destičky, které jsou vyrobeny z polystyrenu. Tato metoda nebyla prováděna podle přesného návodu, protože jsme si ji přizpůsobili svým podmínkám a tomu, co se nám zdálo vhodné. Např. jsme zkrátili doby vysychání tím, že jsme destičky sušily v inkubátoru při 37 °C a dobu barvení krystalovou violetí tím, že jsme použili více koncentrovaný roztok. Metoda se nám ukázala jako ideální pro stanovení biofilmu u *P. aeruginosa*, protože tato bakterie tvoří biofilm již po krátké inkubaci, tedy po jednom dnu. U *C. albicans* již tak vhodná nebyla, protože po prvním dnu se nám biofilm netvořil vůbec a když už, tak v malých koncentracích. Proto jsme hledali vhodnější metodu a tou se nakonec ukázala Růžičkova metoda, která se přímo zaměřuje na stanovení biofilmu u kvasinek rodu *Candida*. Tato metoda je rozdílná v tom, že narostlá planktonická kultura se promývá roztokem PBS a takto promytá kultura se přidává přímo do destičky, kde je již napipetované médium (v našem případě YNB-glu). V předchozím případě se planktonická kultura mísila s fyziologickým roztokem a poté až s kultivačním médiem. Dále je pak u této metody rozdílná doba inkubace, kdy se destičky inkubují rovnou 2 dny, takže je zaručený dostatečný nárůst biofilmu. Metoda barvení vytvořeného biofilmu je pak již u obou metod stejná. Tímto jsme tedy potvrdili, že dané mikroorganismy tvoří biofilm.

Dalším úkolem bylo zjistit, zda dané kvasinky dokáží kontaminovat námi vybrané kontaktní čočky. Proto byly vloženy do narostlých planktonických kultur a inkubovány po různé časové intervaly, které ze začátku byly delší. To, že se kvasinky opravdu dokáží adherovat na kontaktní čočky jsme potvrdili vyfotografováním na mikroskopu. Při tomto mikroskopování jsme si také potvrdili, že se kontaktní čočky lépe (více) kontaminují v erlenmayerových baňkách, které mají rovné dno než v plastových jednorázových zkumavkách, které mají kónické dno. Dalším logickým krokem byla snaha zjistit, zda se kvasinky adherují jen na povrch čočky, nebo i dovnitř. Proto jsme kontaminované čočky nařezali a pozorovali pod mikroskopem. Bohužel však po nařezání na čočkách nebyly viditelné žádné buňky, což jsme přikládali tomu, že se buňky smyly po promývání v roztoku sacharózy,

protože se nám ukázalo, že sacharóza není vhodná pro přežívání buněk. Bohužel však po opakovaném nařezání se nám nepodařilo prokázat, že buňky jsou i uvnitř čočky, a to i přes to, že jsme buňky na čočkách zafixovali glutaraldehydem. Ačkoliv máme důvod se domnívat, že tomu tak je, protože kontaminované čočky po promytí ve fyziologickém roztoku, nebo v roztoku přímo pro ně určenému (Zero-Seven) nám dokázaly kontaminovat čisté médium.

Abychom opravdu dokázali přítomnost kvasinek ať už na, nebo v kontaktních čočkách, vyizolovali jsme z kontaminovaných čoček DNA. Nejtěžší na izolaci bylo najít správnou metodu úpravy čoček před izolací, protože čočka jakožto odolný a elastický materiál nebyla pro tuto metodu nejvhodnější. Po vyzkoušení různých metod předúpravy a následné izolaci DNA, při které byly na rozrušení čoček používány skleněné korálky, se nám jako nejlepší ukázala metoda vysušení čoček na vzduchu, nebo v inkubátoru, při lehce zvýšené teplotě, než je pokojová. Čočky totiž po vysušení byly křehké, tudíž se daly rozlomit a lépe se z nich DNA získala. Po vyizolování DNA jsme provedli PCR reakci, kdy jsme namnožili úseky DNA a následnou elektroforézou jsme potvrdili, že tato reakce proběhla správně.

Když jsme potvrdili, že se čočky kontaminují po delší době inkubace, zajímalo nás, po jaké kratší době inkubace se mohou kontaminovat a zda je opravdu nutné čočky inkubovat dlouho dobu. Nastavili jsme si různé kratší doby inkubace a překvapivým zjištěním bylo, že se čočky dokáží kontaminovat již po 10 min inkubace. Pro potvrzení tohoto zjištění jsme opět provedli izolaci DNA, kde se nám opravdu ukázalo, že kvasinky na/v čočce jsou. Je tedy opravdu nezbytné dbát na hygienu při používání kontaktních čoček a při jejich čištění, uchovávání. Je-li čočka kontaminovaná kvasinkou, pak běžný uživatel nemá šanci ji běžně dostupnými prostředky vyčistit. Časy, které jsme pro kontaminační experiment volili, se mohou zdát dlouhé, ale ve skutečnosti modelují situace, které mohou u některých uživatelů nastat, tj. že čočka leží v kontaminovaném prostředí a za mírně zvýšené teploty (např. v létě na polici).

Dalším cílem práce bylo se zaměřit přímo na kontaktní čočky, na materiál, ze kterého jsou vyrobeny a na jejich vlastnosti. Od výrobce jsme věděli, že by kontaktní čočky měly být vyrobeny z materiálu hilafilcon B, jehož přesné složení jsme si našli. Rozhodli jsme se pomocí infračerveného spektrofotometru metodou ATR zjistit, zda to odpovídá nalezenému složení. Po vyhodnocení spekter se potvrdilo, že čočky obsahují z velké části materiál HEMA (2-hydroxyethylmethakrylát), jenž je deklarován ve složení. Touto metodou jsme také zjišťovali, zda je rozdíl při vysychání (vypařování vody) sterilní čočky a kontaminovaných čoček kvasinkami. Ukázalo se, že sterilní čočka měla skoro stejné vlastnosti jako čočka kontaminovaná *C. parapsilosis*, ale čočka kontaminovaná *C. albicans* projevovala vlastnosti rozdílné. A to při vysychání v intervalu 15 min a 30 min, kdy pás rapidně klesnul, tedy se za

danou dobu odpařilo více vody než u sterilní čočky. Přisuzovat to můžeme tomu, že kontaminace mohla poškodit strukturu čočky a tím pádem se z ní voda odpařila rychleji.

Abychom se něco dozvěděli přímo o samotné čočce, pokusili jsme se ji rozpustit v různých látkách, i za horka. Ukázalo se ale, že čočka se v ničem nerozpustila, z čehož jsme vyhodnotili závěr, že je zesíťovaná. Zvolili jsme tedy jiné zkoušky, a to botnání a zjištění extrakčního podílu, kdy se 24 hod třepaly čisté čočky a kontaminované čočky kvasinkami v roztoku THF a ve vodě. Přičemž se nám ukázalo, že nejenom mezi sterilní čočkou a kontaminovanými čočkami jsou rozdíly, ale také že velké rozdíly nalezneme mezi danými kvasinkami. U *C. albicans* se při malé hodnotě nasákavosti ve vodě ukázalo, že se z této čočky dokázalo vyextrahovat nejvíce nezesíťovaného podílu a u *C. parapsilosis* při velké nasákavosti v THF tomu bylo přesně naopak. Tohle nám ukazuje, že kvasinky jsou schopné poškodit (změnit) strukturu čočky a potvrzuje nám to teorii, že kvasinky by měly být obsaženy i uvnitř čočky.

Závěrem lze říci, že se nám podařilo standardizovat metodu stanovení biofilmu v plastových mikrotitračních destičkách, dokázali jsme kontaminovat kontaktní čočky a potvrdit to mikroskopickou metodou, standardizovat metodu předúpravy čoček před izolací DNA, vyizolovat DNA a tu následně amplifikovat pomocí PCR, kterou jsme potvrdili elektroforézou, vytvořit časovou osu kontaminace čoček, kdy jsme stanovili nejkratší dobu kontaminace, zjistit materiál kontaktní čočky metodou ATR, dokázat rozdíly mezi čistými a kontaminovanými čočkami při vysychání metodou ATR a dokázat, že jsou strukturální rozdíly ve složení čoček mezi sterilními a kontaminovanými čočkami, a to stanovením procent botnání a extrakčním podílem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARON, Samuel. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, s. 1273. ISBN 0-9631172-1-1.
- [2] ARAÚJO, Daniela, Mariana HENRIQUES a Sónia SILVA. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends in Microbiology*. 2017, **25**(1), 62-75. DOI: 10.1016/j.tim.2016.09.004. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16301366>
- [3] BERMAN, Judith. *Candida albicans*. *Current Biology*. 2012, **22**(16), R620-R622. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.043. ISSN 09609822. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212006306>
- [4] BROGDEN, Kim A. a Janet M. GUTHMILLER. *Polymicrobial diseases*. 1 ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2002, s. 450. ISBN 15-558-1244-9.
- [5] ALMEIDA, Ricardo S., Duncan WILSON a Bernhard HUBE. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Research*. Blackwell Publishing, 2009, **9**(7), 1000-1012. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00570.x. ISSN 15671356. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00570.x>
- [6] CALDERONE, Richard A. a John N. GREENE. *Candida* and *Candidiasis*. *Clinical Infectious Diseases*. America: Oxford University Press, 2002, **35**(4), 498-499. DOI: 10.1086/341420. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/341420>
- [7] MAYER, François L., Duncan WILSON a Bernhard HUBE. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. Landes Bioscience, 2013, **4**(2), 119-128. DOI: 10.4161/viru.22913. ISSN 2150-5594. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.22913>
- [8] LAU, Gee W., Daniel J. HASSETT, Huimin RAN a Fansheng KONG. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*. USA, 2004, **10**(12), 599-606. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.10.002. ISSN 14714914. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491404002606>
- [9] KRMENČÍK, Pavel a Jiří KYSILKA. *Toxikon* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/pseudomonas_aeruginosa.php

- [10] BREIDENSTEIN, Elena B.M., César DE LA FUENTE-NÚÑEZ a Robert E.W. HANCOCK. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*. Cell Press, 2011, **19**(8), 419-426. DOI: 10.1016/j.tim.2011.04.005. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11000862>
- [11] SAWA, Teiji. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *Journal of Intensive Care*. Japan: Bio Med Central, 2014, **2**(1), 1-11. DOI: 10.1186/2052-0492-2-10. ISSN 2052-0492. Dostupné také z: <http://jintensivecare.biomedcentral.com/articles/10.1186/2052-0492-2-10>
- [12] MULLER, Michael. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radical Biology and Medicine*. USA: Elsevier Science, 2002, **33**(11), 1527-1533. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01087-0. ISSN 08915849. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584902010870>
- [13] *Ústav laboratorní diagnostiky: Pseudomonas aeruginosa* [online]. Praha [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/psae.htm>
- [14] FURIGA, Aurelie, Barbora LAJOIE, Salome EL HAGE, Genevieve BAZIARD a Christine ROQUES. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Resistance to Antibiotics by Combining the Drugs with a New Quorum-Sensing Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 2016, **60**(3), 1676-1686. DOI: 10.1128/AAC.02533-15. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02533-15>
- [15] *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0046?lang=en&ion=CZ>
- [16] CHANDRA, J., D. M. KUHN, P. K. MUKHERJEE, L. L. HOYER, T. MCCORMICK a M. A. GHANNOUM. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 2001, **183**(18), 5385-5394. DOI: 10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>
- [17] DESAI, Jigar V., Aaron P. MITCHELL a David R. ANDES. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014, **4**(10), 1-18. DOI: 10.1101/cshperspect.a019729. ISSN 2157-1422. Dostupné také z:

<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a019729>

[18] UPPULURI, Priya, Ashok K. CHATURVEDI, Anand SRINIVASAN, et al. Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. *PLoS Pathogens*. 2010, **6**(3), 1-13. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000828. ISSN 1553-7374. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000828>

[19] *Biologie v kostce: Růst buněk v buněčné kultuře* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/tkanove-kultury-dalsi-in-vitro-systemy.html>

[20] DONLAN, Rodney M. a J. William COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 2002, **15**(2), 167-193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

[21] SILVA, Sónia, Melyssa NEGRI, Mariana HENRIQUES, Rosário OLIVEIRA, David W. WILLIAMS a Joana AZEREDO. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, **36**(2), 288-305. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>

[22] SILVA, Sónia, Melyssa NEGRI, Mariana HENRIQUES, Rosário OLIVEIRA, David W. WILLIAMS a Joana AZEREDO. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*. Cell Press, 2011, **19**(5), 241-247. DOI: 10.1016/j.tim.2011.02.003. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11000448>

[23] FANNING, Saranna, Wenjie XU, Norma SOLIS, Carol A. WOOLFORD, Scott G. FILLER a Aaron P. MITCHELL. Divergent Targets of *Candida albicans* Biofilm Regulator *Bcr1* In Vitro and In Vivo. *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology, 2012, **11**(7), 896-904. DOI: 10.1128/EC.00103-12. ISSN 1535-9778. Dostupné také z: <http://ec.asm.org/lookup/doi/10.1128/EC.00103-12>

[24] NOBILE, Clarissa J., Emily P. FOX, Jeniel E. NETT, et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in *Candida albicans*. *Cell*. Elsevier, 2012, **148**(1-2), 126-138. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.048. ISSN 00928674. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411013614>

- [25] SKRZYPEK, MS, J BINKLEY, G BINKLEY, SR MIYASATO, M SIMISON a G SHERLOCK. *Candida Genome Database* [online]. 2004 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.candidagenome.org/>
- [26] WANG, Yu-Chao, Shin-Hao HUANG, Chung-Yu LAN, Bor-Sen CHEN a Peter CSERMELY. Prediction of Phenotype-Associated Genes via a Cellular Network Approach: A *Candida albicans* Infection Case Study. *PLoS ONE*. 2012, **7**(4), 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0035339. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035339>
- [27] LIMA-NETO, Reginaldo G., Eduardo I. C. BELTRÃO, Patrícia C. OLIVEIRA a Rejane P. NEVES. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*. 2011, **54**(1), 23-29. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x. ISSN 09337407. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x>
- [28] NOBILE, Clarissa J., Heather A. SCHNEIDER, Jeniel E. NETT, Donald C. SHEPPARD, Scott G. FILLER, David R. ANDES a Aaron P. MITCHELL. Complementary Adhesin Function in *C. albicans* Biofilm Formation. *Current Biology*. 2008, **18**(14), 1017-1024. DOI: 10.1016/j.cub.2008.06.034. ISSN 09609822. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982208007914>
- [29] BUTLER, Geraldine, Matthew D. RASMUSSEN, Michael F. LIN, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009, **459**(7247), 657-662. DOI: 10.1038/nature08064. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nature08064>
- [30] LI, Fang, Michael J. SVAROVSKY a Amy J. KARLSSON, et al. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology, 2007, **6**(6), 931-939. DOI: 10.1128/EC.00049-07. ISSN 1535-9778. Dostupné také z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00049-07>
- [31] LI, Fang a Sean P. PALECEK. *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology, 2003, **2**(6), 1266-1273. DOI: 10.1128/EC.2.6.1266-1273.2003. ISSN 1535-9778. Dostupné také z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.2.6.1266-1273.2003>
- [32] HENRIQUES, Mariana, Joana AZEREDO a Rosário OLIVEIRA. *Candida* Species Adhesion to Oral Epithelium: Factors Involved and Experimental Methodology Used. *Critical*

Reviews in Microbiology. 2006, **32**(4), 217-226. DOI: 10.1080/10408410601023524. ISSN 1040-841X. Dostupné také z:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410601023524>

[33] WAN HARUN, Wan Himratul Aznita, Nur Alyaa JAMIL, Nor Hazwani JAMALUDIN a Mohd-Al-Faisal NORDIN. Effect of *Piper betle* and *Brucea javanica* on the Differential Expression of Hyphal Wall Protein (HWPI) in Non-*Candida albicans Candida* (NCAC) Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, **2013**, 1-6. DOI: 10.1155/2013/397268. ISSN 1741-427X. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/397268/>

[34] SAHNI, Nidhi, Song YI, Karla J. DANIELS, Thyagarajan SRIKANTHA, Claude PUJOL, David R. SOLL a Christina M. HULL. Genes Selectively Up-Regulated by Pheromone in White Cells Are Involved in Biofilm Formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2009, **5**(10), 1-18. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000601. ISSN 1553-7374. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000601>

[35] PANAGODA, G. J., A. N. B. ELLEPOLA a L. P. SAMARANAYAKE. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*. 2001, **44**(1-2), 29-35. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2001.00611.x. ISSN 0933-7407. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0507.2001.00611.x>

[36] CASTAÑO, Irene, Shih-Jung PAN, Margaret ZUPANCIC, Christophe HENNEQUIN, Bernard DUJON a Brendan P. CORMACK. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology*. 2005, **55**(4), 1246-1258. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04465.x. ISSN 0950382X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2004.04465.x>

[37] BĚHÁLEK, Luboš. *Polymery* [online]. 1. Svitavy: Publi, 2016 [cit. 2018-05-06]. ISBN 978-80-88058-68-7. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/Impresum.html>

[38] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití* [online]. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006 [cit. 2018-05-06]. ISBN 80-708-0617-6. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-617-6/pages-img/001.html

[39] *Chemické listy: Nomenklatura a terminologie* [online]. Praha, 1990, (84), 843-861 [cit. 2018-05-06]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/download/chl84-843/chl84-843.htm#kl3>

- [40] LOWER, Stephen. *Chemistry: Polymers and Plastics* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Chem1_\(Lower\)/07%3A_Solids_and_Liquids/7.09%3A_Polymers_and_Plastics](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/General_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Chem1_(Lower)/07%3A_Solids_and_Liquids/7.09%3A_Polymers_and_Plastics)
- [41] MATOUŠEK, Jiří. *Polymerní nanomateriály* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3084922/>
- [42] MLEZIVA, J., ŠNUPÁREK, J. *Polymery: Výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Praha: ISBN 8085920727.
- [43] Introduction to polymers. *The Open University* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/science/chemistry/introduction-polymers/content-section-2.1>
- [44] GRÉGR, Jan; SLAVÍK, Martin. *Makromolekulární sloučeniny* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/kchtul/che-makromolekularni-slouceniny>
- [45] POLANSKÁ, Jana; BERÁNKOVÁ, Miloslava; SVOBODA, Lubomír. *Internetová video-databáze chemických pokusů: Emulzní polymerace styrenu* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: http://www.sciencezoom.cz/apps/zf_08/?target=makro&pokus=pokus_6
- [46] POLANSKÁ, Jana; BERÁNKOVÁ, Miloslava; SVOBODA, Lubomír. *Internetová video-databáze chemických pokusů: Fenolformaldehydová pryskyřice* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: http://www.sciencezoom.cz/apps/zf_08/?target=makro&pokus=pokus_2
- [47] Polymer Properties Database. *Chemical Retrieval on the Web* [online]. 2018 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.polymerdatabase.com/index.html>
- [48] LON, Mathias J. *Polymer Science Learning Center: Polystyrene* [online]. 2018 [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://www.pslc.ws/macrog/styrene.htm>
- [49] Acrylic Acid and Esters. *Chemical Economics Handbook* [online]. IHS Markit, 2017 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://ihsmarkit.com/products/acrylic-acid-acrylate-esters-chemical-economics-handbook.html>
- [50] Polymer Properties Database: *Poly(acrylic acid)* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://www.polymerdatabase.com/polymers/polyacrylicacid.html>
- [51] Polymer Properties Database: *Poly(methyl acrylate)* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://www.polymerdatabase.com/polymers/polymethylacrylate.html>

- [52] Polymer Properties Database: *Poly(ethyl acrylate)* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://www.polymerdatabase.com/polymers/polyethylacrylate.html>
- [53] Polymer Properties Database: *Poly(methyl methacrylate)* [online]. [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <http://www.polymerdatabase.com/polymers/polymethylmethacrylate.html>
- [54] Hilafilcon B. *PubChem* [online]. USA, 2018 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91971248#section=Top>
- [55] MANDAL, Krishnendu. *SOFT CONTACT LENS MATERIAL: HILAFILCON B VS ETAFILCON A* [online]. 2017 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://kbeyeblogs.com/soft-contact-lenses-material-hilafilcon-b-vs-etafilcon/>
- [56] PUBCHEM. *Hilafilcon B* [online]. 2018 [cit. 6.5.2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91971248#section=2D-Structure>
- [57] WICHTERLE, O., D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. Praha, 1960, **185**(4706), 117-118. DOI: 10.1038/185117a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/185117a0>
- [58] MICHÁLEK, Jiří. HISTORIE MĚKKÝCH KONTAKTNÍCH ČOČEK ANEB JAK TO BYLO DOOPRAVDY. *Chemické Listy* [online]. Praha, 2018, **112**, 143-147 [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3025>
- [59] KAYNAK ONURDAĞ, Fatma, Semiha ÖZKAN, Selda ÖZGEN, Hülya OLMUŞ a Ufuk ABBASOĞLU. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on soft contact lenses. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. Turkey: Springer-Verlag, 2011, **249**(4), 559-564. DOI: 10.1007/s00417-010-1595-3. ISSN 0721-832X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00417-010-1595-3>
- [60] BEHLAU, Irmgard a Michael S. GILMORE. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Archives of Ophthalmology*. 2008, **126**(11), 1572-1581. DOI: 10.1001/archophth.126.11.1572. ISSN 0003-9950. Dostupné také z: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archophth.126.11.1572>
- [61] SIMMONS RB, JR BUFFINGTON, M WARD, LA WILSON, DG AHEARN. Morphology and ultrastructure of fungi in extended-wear soft contact lenses. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986, **24**(1), 21-25.
- [62] Infračervená spektroskopie. *VŠCHT* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>

[63] Reflektanční techniky. *VŠCHT* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/IR/Atr.htm>

[64] COFFEY, Barbara M. a Gregory G. ANDERSON. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. *Pseudomonas Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 2014, 2014-3-29, 631-641. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4939-0473-0_48. ISBN 978-1-4939-0472-3. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0473-0_48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Program PCR amplifikace.....	36
Tabulka 2 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů <i>P. aeruginosa</i> za 24, 48 a 72 hodin po kultivaci v LB médiu.	41
Tabulka 3 Porovnávání vzniklého množství biofilmu u kmenů <i>P. aeruginosa</i> za 24 a 48 hodin po kultivaci v různých médiích.....	42
Tabulka 4 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů kvasinky <i>C. albicans</i> po 24 a 48 hodinách při kultivaci v médiu YNB-glu.	43
Tabulka 5 Množství vytvořeného biofilmu u kmenů kvasinky <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i> po 48 hodinách při inkubaci v médiu YNB-glu.....	43
Tabulka 6 Výsledky izolace DNA z kontaktních čoček po inkubaci s kmeny <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i>	47
Tabulka 7 Časová kontaminace kontaktních čoček kvasinkou <i>C. albicans</i> SC 5314.....	52
Tabulka 8 Časová kontaminace kontaktních čoček kvasinkou <i>C. parapsilosis</i> P69.....	52
Tabulka 9 Koncentrace DNA vzorků <i>C. albicans</i> SC5314 a <i>C. parapsilosis</i> P69 u časové kontaminace kontaktních čoček po 10 min a 30 min.....	55
Tabulka 10 Hodnoty absorbance média YNB-glu po inkubaci kontaminované čočky kvasinkou <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i> po předchozím čištění v roztoku Zero-Seven Refreshing.....	61
Tabulka 11 Výsledky botnání a extrahovatelného podílu u kontaktních čoček.....	62

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Morfologické přeměny <i>C. albicans</i>	12
Obrázek 2 Bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Obrázek 3 Strukturní vzorec pigmentu pyocyanin.	13
Obrázek 4 Možnosti uspořádání monomerů v makromolekulárním řetězci.	18
Obrázek 5 Schématické znázornění stereoizomerie u polypropylenu.	19
Obrázek 6 Struktura polymerů.	19
Obrázek 7 Schéma struktury polymerů a) polymer amorfní, b) polymer semikrystalický.	20
Obrázek 8 Ukázka vzniku polymeru polyreakcí z monomeru.	22
Obrázek 9 Příprava polystyrenu emulzní radikálovou polymerací styrenu.	23
Obrázek 10 Příprava fenolformaldehydové pryskyřice polykondenzací fenolu a formaldehydu v zásaditém prostředí.	23
Obrázek 11 Vznik polyuretanu polyadící 1,4-butandiolu a hexamethylendiisokyanátu.	24
Obrázek 12 Strukturní vzorec polystyrenu.	24
Obrázek 13 Výroba polystyrenu radikálovou polymerací ze styrenu.	25
Obrázek 14 Strukturní vzorec kyseliny akrylové.	26
Obrázek 15 Strukturní vzorec polymethylakrylátu (a) a polyethylakrylátu (b).	27
Obrázek 16 Strukturní vzorec polymethylmethakrylátu.	28
Obrázek 17 Strukturní vzorce monomerů, ze kterých je vyroben hilafilcon B.	29
Obrázek 18 Povrch čočky po inkubaci s kmenem <i>C. albicans</i> SC5314, 12 dní inkubace ve zkumavce, zvětšení 400x.	44
Obrázek 19 Povrch čočky po inkubaci s kmenem <i>C. albicans</i> SC5314, 12 dní inkubace v erlenmeyerově baňce, zvětšení 400x.	45
Obrázek 20 Povrch čočky po inkubaci s kmenem <i>C. parapsilosis</i> P69, 12 dní inkubace ve zkumavce, zvětšení 400x.	45
Obrázek 21 Povrch čočky po inkubaci s kmenem <i>C. parapsilosis</i> P69, 12 dní inkubace v erlenmeyerově baňce, zvětšení 400x.	46
Obrázek 22 Výsledný gel elektroforézy vzorků <i>C. albicans</i>	48
Obrázek 23 Výsledný gel elektroforézy vzorků <i>C. parapsilosis</i>	48
Obrázek 24 Pozitivní kontrolní kvasinková suspenze, zvětšení 10 000x.	49
Obrázek 25 Kontrolní čočka bez kvasinek, zvětšení 10 000x, polotlustý řez čočky (1000 nm).	49

Obrázek 26 Čočka s kvasinkami <i>C. albicans</i> SC5314, zvětšení 10 000x, polotlustý řez (1000 nm).....	50
Obrázek 27 Čočka s kvasinkami <i>C. albicans</i> SC5314, zvětšení 10 000x, polotlustý řez (1000 nm).....	50
Obrázek 28 Časová závislost kontaminace kontaktních čoček kvasinkou <i>C. albicans</i> SC5314.	53
Obrázek 29 Časová závislost kontaminace kontaktních čoček kvasinkou <i>C. parapsilosis</i> P69.	54
Obrázek 30 Porovnání ATR spektra čisté kontaktní čočky s knihovnou spekter dostupných látek.....	57
Obrázek 31 ATR spektrum sterilní kontaktní čočky zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru. A – spektra v časovém intervalu 0-15 min, B – spektra v časovém intervalu 15-60 minut.	58
Obrázek 32 ATR spektrum kontaktní čočky kontaminované kvasinkou <i>C. albicans</i> zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru.	59
Obrázek 33 ATR spektrum kontaktní čočky kontaminované kvasinkou <i>C. parapsilosis</i> zaznamenané pomocí infračerveného spektrometru.	59
Obrázek 34 ATR spektrum porovnávací pásy zaznamenané po 60 min vysychání čisté kontaktní čočky, kontaktní čočky kontaminované <i>C. albicans</i> a <i>C. parapsilosis</i> . Měřeno pomocí infračerveného spektrofotometru.	60
Obrázek 35 Graf botnání vzorků kontaktních čoček v roztoku THF a ve vodě.....	63
Obrázek 36 Graf extrahovatelného podílu vzorků kontaktních čoček v roztoku THF a ve vodě.....	64

SEZNAM ZKRATEK

ABS – akrylonitril-butadien-styren

Als 1-9 – sekvence podobné aglutininu (agglutinine-like sequence) 1-9

ATR – zeslabená totální reflektance (Attenuated Total Reflectance)

C. a. – *Candida albicans*

C. albicans – *Candida albicans*

C. dubliniensis – *Candida dubliniensis*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

C. lusitaniae – *Candida lusitania*

Đ – polydisperzita

Dk/t – Dk propustnost, t tloušťka čočky

Eap1 – protein s vyšší adhezí k polystyrenu (Enhanced adherence to polystyrene protein) 1

EFG1 – protein zvyšující vláknitý růst (Enhanced filamentous growth protein) 1

EP – epoxidová pryskyřice

Epa – epiteliální adhezín (Epithelial Adhesin)

EPS – zpěňovatelný polystyren

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

GPI-kotva – glykosylfosfatidylinositolová kotva

HEMA – 2-hydroxyethylmethakrylát

HIPS – houževnatý polystyren (High Impact Polystyrene)

Hwp1 – hyfální protein buněčné stěny (Hyphal wall protein) 1

LB médium – Luria-Bertani médium

\bar{M}_n – číselný střed molekulové hmotnosti [g/mol]

\bar{M}_w – hmotnostní střed molekulové hmotnosti [g/mol]

\bar{M}_z – z-průměr molekulové hmotnosti [g/mol]

NADP(H) – redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu

OD600 – optická hustota měřená při 600 nm

P. a. – *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PA – polyamid

Pbr1 – feromonem indukovaný regulátor biofilmu (Pheromone induced Biofilm Regulator) 1
PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
PC – polykarbonát
PCI – fenol-chloroform-izoamylalkohol
PCR – polymerázová řetězová reakce
PE – polyester
PE – polyethylen
Pga10 – protein vázaný přes GPI-kotvu (GPI-anchored protein) 10
PHMB – polyhexamethylenbiguanid
PI – polyimid
PMMA – polymethylmethakrylát
PP – polypropylen
PS – polystyren
PUR – polyurethan
S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*
SAN – styren-akrylonitril
SBR – styren-butadienové kaučuku
Tg – teplota skelného přechodu [°C]
THF – tetrahydrofuran
UV – ultrafialový
YNB médium – Yeast Nitrogen Base médium

