

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. LENKA MUŽÍKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Interakce patogenních kvasinek rodu *Candida* s bakteriemi

Bc. Lenka Mužíková

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Mužíková**
Osobní číslo: **C21474**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Interakce patogenních kvasinek rodu *Candida* s bakteriemi**
Téma práce anglicky: **Interaction Of The Pathogenic Yeasts Of The Genus *Candida* With Bacteria**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Popis patogenních kvasinek rodu *Candida* a dalších analyzovaných mikroorganismů.
Charakterizace použitých plastových materiálů (polyethylen a polystyren).
Zavedení a vysvětlení pojmu real-time PCR.

Experimentální část:

1. Příprava směsných kultur kvasinky *C. albicans* a *C. guilliermondii* s bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Inkubace připravených kokultur s abiotickým materiálem.
3. Kvantifikace vzniklého biofilmu pomocí real-time PCR.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.
Přírodovědecká fakulta – Katedra biochemie, Univerzita
Karlova

Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem **Interakce patogenních kvasinek rodu *Candida* s bakteriemi** jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.5. 2023

Lenka Mužíková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, PhD. za jeho vstřícnost a vedení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantkám Ing. Lucii Michalcové a doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za jejich odborný dohled, čas, trpělivost, vstřícnost a připomínky, které mi během zpracování práce poskytly. Poděkování také patří všem, kteří mě během studia podporovali, zejména mé rodině, přátelům a spolužákům.

ANOTACE

Cílem diplomové práce byla příprava směsných kultur kvasinky *Candida albicans* a *Candida guilliermondii* s bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, jejich společná inkubace na abiotickém materiálu a kvantifikace vzniklého biofilmu pomocí real-time PCR. Byla sledována koncentrace vyizolované DNA a její zastoupení bylo vzájemně porovnáno mezi jednotlivými kmeny kvasinek a bakterií. Současně byl zhodnocen společný růst kvasinek a bakterií na polymerech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biofilm, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Pseudomonas aeruginosa*, polystyren, polyethylen, real-time PCR

TITLE

Interaction of the pathogenic yeasts of the genus *Candida* with bacteria

ANNOTATION

The aim of the thesis was the preparation of mixed cultures of *Candida albicans* and *Candida guilliermondii* with *Pseudomonas aeruginosa*, their joint incubation on abiotic material and quantification of the resulting biofilm by real-time PCR. The concentration of the isolated DNA was monitored and its abundance was compared between yeast and bacterial strains. At the same time, the mutual growth of yeast and bacteria on polymers was evaluated.

KEYWORDS

Biofilm, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Pseudomonas aeruginosa*, polystyrene, polyethylene, real-time PCR

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM PŘÍLOH.....	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Rod <i>Candida</i>	18
1.1.1 Morfologie <i>C. albicans</i>	18
1.1.2 Patogenní kmeny <i>C. albicans</i>	21
1.1.2.1 Působení antitykotik a mechanismy rezistence <i>Candida</i> spp.	22
1.1.3 Mutantní kmeny.....	24
1.1.3.1 Genetika tvorby mutantních kmenů <i>C. albicans</i>	24
1.1.3.2 Vybrané mutantní kmeny	25
1.1.4 Biofilm <i>C. albicans</i>	26
1.1.4.1 Vznik a vývoj biofilmu	27
1.1.4.2 Struktura biofilmu	29
1.1.4.3 Regulace biofilmu	30
1.1.4.4 Quorum-sensing	31
1.1.4.5 Klinické důsledky biofilmu.....	31
1.1.5 Morfologie <i>C. guilliermondii</i>	32
1.2 Rod <i>Pseudomonas</i>	32
1.3 Polymikrobiální interakce	34
1.4 Polymery	36
1.4.1 Polyethylen.....	37
1.4.2 Polystyren	38
1.5 Polymerázová řetězová reakce	39
1.5.1 Princip real-time PCR.....	41
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44

2.1	Přístroje a zařízení.....	44
2.2	Použité chemikálie	44
2.2.1	Chemikálie potřebné k izolaci DNA	44
2.2.2	Chemikálie potřebné k přípravě PP sklíček.....	44
2.2.3	Agary a tekuté půdy.....	45
2.2.4	Používané kmeny.....	45
2.2.5	PCR komponenty.....	45
2.3	Ostatní materiály	46
2.4	Pracovní postup.....	46
2.4.1	Příprava kultivačních médií.....	46
2.4.2	Příprava polymerních materiálů	46
2.4.3	Kultivace mikroorganismů	47
2.4.3.1	Příprava směsných kokultur.....	47
2.4.4	Inkubace polymerních materiálů se směsnými kulturami	47
2.4.5	Izolace DNA	48
2.4.6	Kvantifikace vyizolované DNA pomocí real-time PCR	48
2.4.6.1	Kultivace mikroorganismů.....	48
2.4.6.2	Izolace DNA.....	48
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	50
3.1	Kalibrační řady DNA pro jednotlivé sledované mikroorganismy	50
3.2	Optická hustota čistých a směsných kultur	52
3.3	Koncentrace DNA kokultur měřená na spektrofotometru	54
3.4	Prezentace dat z real-time PCR.....	56
3.4.1	Vyhodnocení stanovení DNA pomocí q-PCR.....	60
3.4.2	Logaritmus poměru koncentrací sledovaných kokultur	65
3.4.3	Korelační koeficient	66
3.5	Popis přílohy	69
	ZÁVĚR	70
	POUŽITÁ LITERATURA	72
	PŘÍLOHY	79

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Buňky <i>C. albicans</i> pod světelným mikroskopem	19
Obrázek 2 Buněčný cyklus kvasinek	21
Obrázek 3 Příklady genotypů A, B, C získaných pomocí PCR RFLP z izolátů <i>C. albicans</i>	25
Obrázek 4 Tvorba a vývoj biofilmu	28
Obrázek 5 Polymerace ethylenu.....	38
Obrázek 6 Prostorové uspořádání molekul PE.....	38
Obrázek 7 Polymerace styrenu.....	39
Obrázek 8 Design primerů a elongace vlákna.....	40
Obrázek 9 Reakční schéma PCR.....	41
Obrázek 10 Princip fluorescenčního značení pomocí SYBRGreenu.....	43
Obrázek 11 Kinetika PCR reakce.	43
Obrázek 12 Kalibrační křivka čisté kultury <i>C. albicans</i>	50
Obrázek 13 Kalibrační křivka čisté kultury <i>P. aeruginosa</i>	51
Obrázek 14 Kalibrační křivka čisté kultury <i>C. guilliermondii</i>	51
Obrázek 15 Výpočet optické hustoty (OD) pomocí dekadického logaritmu v závislosti na T.....	52
Obrázek 16 Naměřená optická hustota čistých kultur. Graf pro přehlednost obsahuje pouze hodnoty <i>C. albicans</i> a <i>P. aeruginosa</i>	53
Obrázek 17 Naměřená optická hustota směsných kultur. Graf pro přehlednost obsahuje pouze hodnoty <i>C. albicans</i> a <i>P. aeruginosa</i>	53
Obrázek 18 Graf vyjadřuje optickou hustotu čistých kultur <i>C. guilliermondii</i> , <i>P. aeruginosa</i> (CCM) a současně optickou hustotu směsné kultury (<i>C. g.</i> +CCM).	54
Obrázek 19 Graf znázorňující naměřené hodnoty koncentrace jednotlivých kokultur kultivovaných na polyethylenu (PE).....	55
Obrázek 20 Graf znázorňující naměřené hodnoty koncentrace jednotlivých kokultur kultivovaných na polystyrenu (PS).....	56
Obrázek 21 Dvojice grafů zobrazující výsledky měření na $\Delta hap43$ +CCM na PS.....	60
Obrázek 22 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA všech mutantních kmenů <i>C. albicans</i> a kontrolního kmene (SC5314) kultivovaných v biofilmu s <i>P. aeruginosa</i> (CCM) na polyethylenu.....	61
Obrázek 23 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA všech mutantních kmenů a kontrolního kmene (SC5314) <i>C. albicans</i> kultivovaných v biofilmu s <i>P. aeruginosa</i> (CCM) na polystyrenu.....	61
Obrázek 24 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA <i>P. aeruginosa</i> kultivovaných v biofilmu mutantními kmeny <i>C. albicans</i> a kontrolním kmenem (SC5314) na polyethylenu	62

Obrázek 25 Krabicový graf s přiblíženým měřítkem pro lepší znázornění koncentrací jednotlivých kokultur.....	62
Obrázek 26 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA <i>P. aeruginosa</i> kultivovaných v biofilmu mutantními kmeny <i>C. albicans</i> a kontrolním kmenem (SC5314) na polystyrenu.	63
Obrázek 27 Krabicový graf s přiblíženým měřítkem pro lepší znázornění koncentrací jednotlivých kokultur.	63
Obrázek 28 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA <i>C. guilliermondii</i> kultivovaných v biofilmu s <i>P. aeruginosa</i> na polystyrenu i polyethylenu.	64
Obrázek 29 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA <i>P. aeruginosa</i> kultivovaných v biofilmu s <i>C. guilliermondii</i> na polystyrenu i polyethylenu.	64
Obrázek 30 Sloupcový graf znázorňující logaritmus poměru koncentrací kokultur <i>C. albicans</i> / <i>P. aeruginosa</i> a <i>C. guilliermondii</i> / <i>P. aeruginosa</i>	65
Obrázek 31 Výpočet výběrového Pearsonova korelačního koeficientu r , kde \bar{x} a \bar{y} jsou výběrové průměry, s_x a s_y jsou výběrové průměry směrodatné odchylky a náhodný vektor o rozsahu n	66
Obrázek 32 Bodový graf reprezentující korelační koeficient <i>C. albicans</i>	66
Obrázek 33 Bodový graf reprezentující korelační koeficient <i>P. aeruginosa</i> (v biofilmu s <i>C. albicans</i>).	67
Obrázek 34 Bodový graf reprezentující korelační koeficient <i>C. guilliermondii</i>	67
Obrázek 35 Bodový graf reprezentující korelační koeficient <i>P. aeruginosa</i> (v biofilmu s <i>C. guilliermondii</i>).	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Profil real-time PCR pro <i>C. albicans</i>	49
Tabulka 2 Profil real-time PCR pro <i>P. aeruginosa</i>	49
Tabulka 3 Hodnoty kalibrační řady pro <i>C. albicans</i>	50
Tabulka 4 Hodnoty kalibrační řady pro <i>P. aeruginosa</i>	51
Tabulka 5 Hodnoty kalibrační řady pro <i>C. guilliermondii</i>	51
Tabulka 6 Tabulka prezentuje naměřené hodnoty optické hustoty pro čisté a směsné kultury.	52
Tabulka 7 Naměřená koncentrace izolátu DNA z biofilmů kokultur na pěstovaných materiálu z polyethylenu.	55
Tabulka 8 Naměřená koncentrace izolátu DNA z biofilmů kokultur na pěstovaných materiálu z polystyrenu.	55
Tabulka 9 Naměřené hodnoty koncentrace izolátu DNA <i>C. albicans</i> v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS).	57
Tabulka 10 Naměřené hodnoty koncentrace DNA <i>P. aeruginosa</i> v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS).	58
Tabulka 11 Naměřené hodnoty koncentrace DNA <i>C. guilliermondii</i> v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS).	59
Tabulka 12 Naměřené hodnoty koncentrace DNA <i>P. aeruginosa</i> v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS).	59

SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek P1 <i>Δrhb1</i> kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu	79
Obrázek P2 <i>Δhap43</i> kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu	80
Obrázek P3 <i>Δhap5</i> kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu.....	81
Obrázek P4 <i>Δcdr1</i> kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu	82
Obrázek P5 SC5314 kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu	83
Obrázek P6 <i>C. guillermondii</i> kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu	84
Obrázek P7 Příklad výsledné real-time PCR křivky	85

SEZNAM ZKRATEK

ATP/AMP	adenosintrifosfát/adenosinmonofosfát
BCR1	biofilm and cell wall regulator 1 (regulátor buněčné stěny a biofilmu 1)
Bcy1	bypass of CYclic -AMP requirement 1 (Obcházení požadavku na cyklický AMP 1)
Brg1	biofilm regulator 1(regulátor biofilmu 1)
C.	rod <i>Candida</i>
cAMP-PAK	cyklická dráha AMP-proteinázy K
CCM	Czech Collection of Microorganisms (pro potřeby této práce je takto označována <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDR	Candida drug resistance
CDR1	Candida drug resistance (v případě této práce je takto označován gen kódující protein Cdr1p)
CLPV	součást sekrečního systému H1 typu VI
Cph1	Candida PseudoHyphal regulator 1 (regulátor pseudohyfálního růstu kvasinky <i>Candida</i> 1)
Ct	cycle of treshold (práh cyklu)
Cyr1	CYclic AMP Requirement 1 (Požadavek na cyklický AMP 1)
Czf1	<i>C. albicans</i> Zinc Finger protein 1
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dsDNA	dvouvláknová DNA
dTTP	deoxythymidintrifosfát
eDNA	extracelulární DNA
Efg1p	enhanced filamentous growth protein 1 (protein zvyšující Filamentózní růst1)
EPS	extracelulární polymerní látka
EtOH	ethanol
Exo-	Exoenzym
FCY2	FluoroCYtosine resistance 2 (gen rezistence na fluorocytosine 2)

FKS/Gsc1	1,3- β -glukan syntézový komplex
FKS1	FK506 Sensitivity (geny citlivosti FK506)
FKS2	Glucan Synthase of <i>Cerevisiae</i> 2 (glukan syntáza kvasinky <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> 2)
Flo8	transkripční aktivátor potřebný k flokulaci 8
F-primer	forward primer
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GacS/GacA	regulátor fyziologického chování bakterií
Gal4	regulátor pro genovou expresi genů indukovaných galaktózou 4
GPI	glykosylfosfatidylinositolové kotvy
GTP/GDP	guanosintrifosfát/guanosindifosfát
<i>HAG</i>	hypha associated genes (geny spojené s hyfami)
<i>HAP43</i>	gen <i>C. albicans</i> kódující protein Hap43p
<i>HAP5</i>	gen <i>C. albicans</i> kódující protein Hap5p
<i>HCP</i>	součást proteosekrečního aparátu HSI-I
Hda1	histone deacetylase 1 (histon deacetyláza 1)
HIV	human immunodeficiency virus (lidský virus imunologické nedostatečnosti)
Hsf1	heat shock factor 1 (faktor tepelného šoku 1)
HSL	homoserin lakton
Hsp90p	heat shock protein 90 (protein tepelného šoku 90)
Hwp1p	hyphal wall protein 1 (protein hyfové stěny 1)
IL-8	interleukin 8
<i>in vitro</i>	kultivace v umělých podmínkách
LadS, RetS	senzor kinázy
LasA, B	LasA, B protease precursor (LasA, B proteázový prekurzor)
LoQ	nejnižší množství analytu, které může být ještě stanoveno
<i>MDR</i>	multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence)
Mdr1p	multidrug resistance protein 1 (protein mnohočetné lékové rezistence 1)
MGCx	mannan-glukanový komplex
MIC	minimální inhibiční koncentrace
Mnn1	α -1- manosyltransferáza
mRNA	messenger RNA
NADH/NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
Ndt80	non-di tyrosine 80

Nrg1	neuregulin 1 (negative regulator of glucose-repressed genes)
Nrg1p	negative growth regulatory protein (negativní růstový regulační protein 1)
<i>P.</i>	rod <i>Pseudomonas</i>
<i>PA01, 14</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kmen 1, 14
PE	polyethylen
Pes1	pescadillo homolog 1
PS	polystyren
<i>Psl</i> a <i>Pel</i>	extracelulární polysacharidy
<i>PSL, PEL</i>	geny pro expresi extracelulárních polysachridů
q-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
OD	optická hustota
QSM	quorum-sensing molecule (molekula quorum-sensing)
Rad53	protein podílející se na regulaci vláknitého růstu 53
Ras1	homologous to RAS proto-oncogene (homolog k protoonkogenu RAS)
rDNA	ribozomální DNA
Rfx2	regulatory factor x 2 (regulační faktor x 2)
<i>RHB1</i>	gen <i>C. albicans</i> kódující protein Rhb1p
Rlm1	resistance to lethality of MKK1P386 overexpression 1 (rezistence k letalitě nadměrné exprese MKK1P386 1)
RNA	ribonukleová kyselina
ROB1	regulator of biofilm 1 (regulátor biofilmu 1)
R-primer	reverse primer
SC5314	kmen <i>C. albicans</i> označovaný jako referenční
Sec	protein sekreční dráhy přes cytoplazmatickou membránu
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
Tat	protein dvojité translokační dráhy argininu
Tec1	transkripční aktivátor 1
TNF- α	tumor nekrotizující fáze α
TpbA	tyrosin fosfatáza A
Tpk1, Tpk2	thyamin pyrofosfokinasa 1, 2
Tse1-Tse7	peptidoglycan hydrolase effectors (efektory hydroláz peptidoglykanu)
TXSS	TX sekreční systém
Ume6	unscheduled Meiotic gene Expression 6 (neplánovaná meiotická exprese genu 6)
UPP	the ubiquitin proteasome pathway (ubikvitin – proteazomová dráha)

<i>VGRG</i>	součást sekrečního systému H2 typu VI
Wt	wild type (typ přirozeně se vyskytující)
Zap1	zinc-responsive activator protein 1 (protein aktivátoru reagující na zinek 1)

ÚVOD

Candida albicans je jedním z hlavních původců nozokomiálních infekcí. Infekce způsobené tímto patogenem se nazývají kandidózy. Výskyt kandidózy v posledních desítkách let výrazně vzrostl. Tento fakt, může souviset především s tím, že se na trhu začaly objevovat citlivější diagnostické metody z oblasti molekulární biologie. Dalším zapříčiněním je schopnost diferenciací a zvýšená rezistence rodu *Candida* na antimikrobiální látky. Vzniklá infekce komplikuje jednak průběh primárního onemocnění, ale i celou terapii.

Jako většina mikroorganismů má i *Candida* schopnost tvořit biofilmy. Díky této vlastnosti se zvyšuje jejich odolnost k vnějším vlivům. Buňky jsou schopné tvořit jak biofilmy jednoduché tvořené, jedním druhem mikroorganismů, tak i komplexní biofilmy tvořené různými rody. Tvorba biofilmu způsobuje komplikace především ve zdravotnictví. Biofilmy kandid se běžně tvoří na zdravotnickém zařízení, chirurgických implantátech a jsou jen těžce odstranitelné z těchto materiálů.

Jedním z důležitých kroků vývoje biofilmu je adheze jednotlivých buněk k matrici neboli podkladu. Při nedokonalém přichycení buněk dochází následně k odtržení celého biofilmu a nemožnosti dalšího vývoje. Matrice může být různého charakteru. Obecně platí, že pro úspěšnou adhezi je vhodný hrubší povrch. Tvorba biofilmu je ovlivněna biotickými i abiotickými faktory, přičemž konkrétně na adhezi mají vliv i fyzikální a chemické prostředí výskytu planktonních buněk.

Zastoupení jednotlivých rodů mikroorganismů v komplexním biofilmu je různorodé a odvíjí se od mnoha faktorů. V této práci je sledována schopnost růstu vybraných mutantních kmenů *C. albicans* a *C. guilliermondii* s bakterií a schopnost růstu na syntetickém povrchu. Zástupci *C. albicans*, jejichž DNA je upravena pomocí rekombinantní techniky, mají odlišnou schopnost růstu a tvorby polymikrobiálního biofilmu. Přirozené mutace u *C. albicans* poskytují selekční výhody v nepříznivém prostředí a zajišťují tak přežití mikroorganismu. Buňky v polymikrobiálním biofilmu se vzájemně ovlivňují prostřednictvím nejrůznějších interakcí. Tyto interakce mají za následek potlačení jednoho kmene ve prospěch druhého.

K měření koncentrace biofilmu byla použita analýza DNA mikroorganismů metodou real-time PCR. Využívá kvantitativní polymerázové řetězové reakce zaznamenané v reálném čase. Kombinuje princip klasické PCR a amplifikaci založené na principu fluorescence. Pomocí real-time PCR je možná identifikace, kvantifikace i genotypizace mikroorganismů. Z naměřených koncentrací DNA byla vyhotovena analýza a vyhodnocení výsledků.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rod *Candida*

Rod *Candida* patří do čeledi kvasinkovité. Tento rod obsahuje více než 150 heterogenních zástupců. Z nichž je známo pouze 65 % a to především z toho důvodu, že zbylá menšina zástupců není schopna růstu při 37 °C a neřadí se tak mezi lidské patogeny či komenzály. Vybraní druhoví zástupci jsou *C. albicans*, *C. auris*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. viswanathii*, a *C. lusitaniae* [1]. Jednoznačně nejrozšířenějším a nejvíce prozkoumaným zástupcem je *Candida albicans*. 80 % odebraných izolátů lidské kandidózy tvoří především *C. albicans*. Ze všech zástupců lidský organismus kolonizují pouze druhy *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* a *C. parapsilosis*. Za určitých podmínek, které jsou dány genetickými, biochemickými a morfologickými změnami, působí někteří zástupci rodu *Candida* na svého hostitele buď jako komenzál či jako patogen. V mnoha případech koexistují spolu s mikroflórou hostitele. Zároveň buňky tvoří biofilm za účelem ochrany před vnějšími vlivy [1, 2].

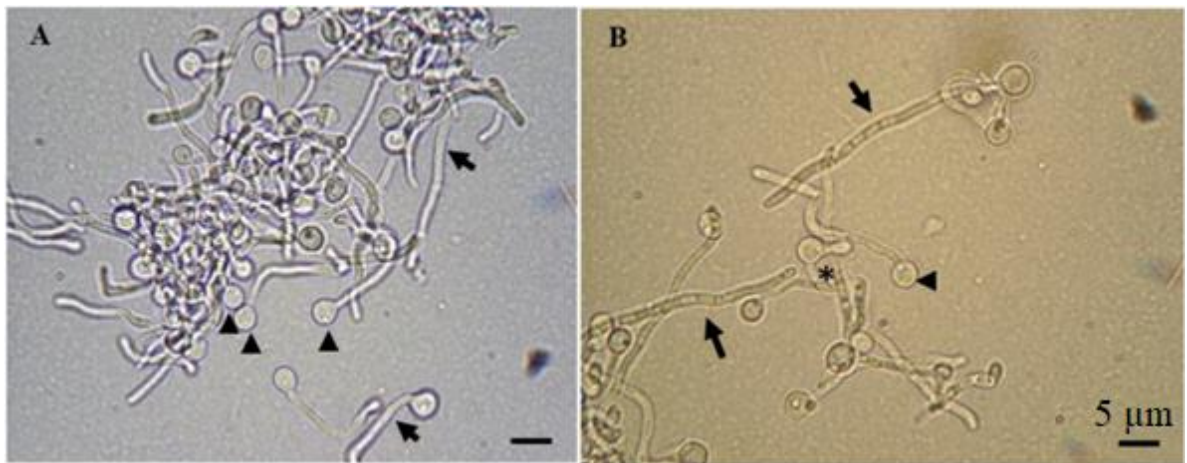
Co se týče genomu kvasinek rodu *Candida*, tak hlavní rozdíl je pozorovatelný u *C. glabrata*, jelikož má haploidní sadu chromozomů na rozdíl od hlavního zástupce *C. albicans* jejíž sada chromozomů je diploidní. Největší podobnost genomu s *C. albicans* má *C. tropicalis* [1]. *C. parapsilosis* lze na základě vyšetření genomu (např. náhodné amplifikace DNA, multilokusové enzymové elektroforézy, příbuznosti DNA, morfotypizace atd.) rozdělit do tří skupin: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* [3].

1.1.1 Morfologie *C. albicans*

Candida albicans je součástí zdravé mikroflóry lidského organismu. Kvasinky kolonizují zejména gastrointersticiální trakt, vaginální oblast, dutinu ústní a kůži. U zdravého organismu kvasinky působí jako neškodný komenzál žijící v souladu s ostatními mikroby v okolí. V případě jakékoli změny dojde k narušení rovnováhy mezi kmeny mikrobů a některé kmeny začnou převažovat. To následně vede k infekci. Infekce způsobené kvasinkami lze rozdělit na povrchové slizniční a dermální, jako jsou afty, vaginální kvasinkové infekce nebo vážnější hematogenně diseminované infekce. Změny prostředí, ve kterém se mikroorganismy nachází, jsou způsobeny např. užíváním antibiotik, změna pH, změna stravování, infekce, imunosupresivní léčba a mnohé další. *C. albicans* je taktéž jedním z hlavních původců nemocničních infekcí. Dokáže infikovat jedince imunokompetentní, ale i kompromitované

(pacienty podstupující chemoterapii či pacienty s HIV). *C. albicans* tvoří biofilm na implantovaném zdravotnickém zařízení (srdeční chlopně, kardiostimulátor, kloubní a zubní protézy apod.) odkud se šíří do krevního řečiště. Infikovaný materiál musí být následně chirurgicky odstraněn z těla pacienta a současně jsou pacientovi podána antimykotika [4].

C. albicans je schopná morfologicky měnit formu své buňky (hyfové, pseudohyfové buňky a pučící buňky kvasinek) (viz obr.č.1), v závislosti na okolním prostředí. Díky rozmanitým faktorům virulence jsou kvasinky schopné infikovat velké množství hostitelských buněk. V závislosti na formě kvasinek a hyf se liší faktory virulence. Současně se liší i exprese adhezinů a invazinů na buněčném povrchu, fenotypová výměna a sekrece hydrolytických enzymů [5, 6].



Obrázek 1 Buňky *C. albicans* pod světelným mikroskopem, měřítko 5 µm, převzato a upraveno ze zdroje [6].

V části A jsou zde patrné chlamydozoory (značené trojúhelníkem) a hyfy (značené šipkou).

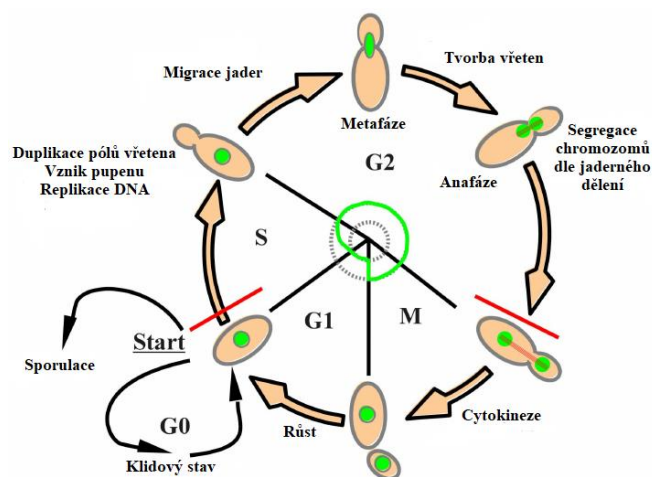
V části B se nachází pseudohyfy (značené hvězdičkou), mnohobuněčné hyfy (značené šipkou) a chlamydozoory (značené trojúhelníkem).

Klíčovým znakem virulence u kvasinek je morfologická plasticita. Konkrétně pro *C. albicans* jsou výše zmiňované morfotypy velice důležité z hlediska odlišných rolí během infekce. Morfologie je indikována jako reakce na mnoho relativních podmínek hostitele a současně je regulována komplexními signálními mechanismy a buněčnými procesy. Tyto cykly jsou regulovány cyklin-dependentní kinázou, proteiny kontrolních bodů, proteazomem, proteinem tepelného šoku (Hsp90p) a transkripčními faktory tepelného šoku (Hsf1). Všechny regulátory spolu kooperují a výsledkem je modulace morfogeneze [7].

Filamentózní růst je vyvolán jako odpověď na podmínky související s prostředím a hostitelem, které jsou snímány prostřednictvím propojených signálních drah. Jednou z nejdůležitějších morfogenetických signálních drah je cyklická dráha

AMP - proteinkinázy K (cAMP-PKA). Tato dráha reaguje na většinu indukujících podmětů. Indukční podmínky aktivují guanosintrifosfatázu (GTPázu) Ras1 a stimulují adenyl cyklázu (Cyr1), čímž dojde k produkci molekuly cAMP. Po zvýšení hladiny cAMP se aktivuje komplex PKA složený ze dvou katalytických podjednotek Tpk1 a Tpk2 a regulační podjednotky cAMP-PAK (Bcy1). PKA fosforyluje transkripční faktor Efg1, který je integrálním regulátorem filamentace [7, 8].

Pro koordinovaný buněčný růst a progresi buněčného cyklu je klíčová buněčná signalizace. Obecně eukaryotické buňky prochází čtyřmi vývojovými fázemi: G1 (postmitotická fáze), syntéza (S), G2 (premitotická fáze), mitóza (M) následovaná cytokinezí (viz obr. č. 2). Buňky procházejí nejen strukturálními změnami, ale mění se i postup v buněčném cyklu. Tvorba pupenu kvasinek je koordinována přechodem z G1 do S fáze po vytvoření septinového kruhu. Přes krček pupenu dochází k nukleárnímu dělení. Výsledkem cytokineze jsou dvě plně oddělené buňky schopné rozptylu po septaci. Podobně je tomu tak i u pseudohyálních buněk s tím rozdílem, že buňky setrvávají delší čas v G2 fázi a díky tomu získávají podlouhlý tvar. U růstu hyf se během přechodu z G1 do S fáze vytvoří zárodečná trubice, která se později stává místem jaderného dělení. Jedno dceřiné jádro putuje zpět do mateřské buňky, ale cytokineze nevede k oddělení buněk ani ke konstrikci. Subapikální kompartment zůstává v G1 fázi, apikální kompartment pokračuje v buněčném cyklu a výsledkem je prodloužení hyfy za vzniku tubulárních buněk. Jednotlivé fáze buněčného cyklu a jejich progresu je koordinována mnoha cykliny, včetně cyklin-dependentních kináz (CDK) a kontrolními proteiny. Správná progresu buněčného cyklu je nedílnou součástí morfogeneze, na niž navazuje filamentace. Filamentace je podstatnou součástí homeostázy proteinů. Vzniku proteinů se účastní i molekulární chaperony, kde pomáhají skládání proteinů. Prostřednictvím ubikvitin – proteazomové dráhy (UPP) dochází k degradaci proteinů. Molekulární chaperon, protein Hsp90p a Hsf1p regulují proteostázu a jsou tak klíčovými regulátory morfogeneze. Buněčný cyklus společně s proteostázou u *C. albicans* přispívá k regulaci filamentace [7, 9].



Obrázek 2 Buněčný cyklus kvasinek, převzato a upraveno ze zdroje [1].

U *C. albicans* normální progresi buněčného cyklu přerušují genotoxické stresy (např. farmakologická léčba) a aktivují tak kontrolní body cyklu. K tomuto narušení může docházet v jakékoliv fázi buněčného cyklu. Jako reakce na narušení buněčného cyklu dochází k morfogenní změně, která způsobuje narušení syntézy DNA nebo narušení mitózy. Xenobiotika, která poškozují DNA, jsou např. hydroxymočovina, aphidicolin, methylnmethansulfonát, který narušuje S-fázi. Výsledkem je prodlužování buněk. Nocodazolem je naopak narušena mitóza. Ústředním krokem buněčného cyklu je replikace DNA, z toho důvodu je tento krok nejvíce pod dohledem kontrolních proteinů. Důležitým kontrolním proteinem je proteinkináza Rad53. Fosforylací proteinkináza Rad53 pozastavuje replikaci a spouští mechanismy opravy DNA a defosforylací naopak usnadňuje průběh replikace. Obecně je Rad53 nezbytný pro morfogenezi indukovanou genotoxickým stresem [7, 10].

1.1.2 Patogenní kmeny *C. albicans*

C. albicans je běžně se vyskytující patogen způsobující různé infekce od slizničních po systémové. Řadí se mezi oportunní patogeny, jako komenzál kolonizuje většinu oblastí lidského těla. V kolonizovaných částech lidského organismu je proliferace *C. albicans* regulována imunitním systémem. V případě dysfunkce imunitního systému či narušení hostitelského prostředí dojde ke změně komenzála na patogen, který způsobuje těžké infekce. Tento patogen je nejčastěji nalezen na sliznicích dýchacích cest, hlubokých tkání či orgánů. Infekce může být způsobena i zavedením katetru nebo trvalých implantátů pacientovi [6].

Tvorba biofilmu na slizniční tkáni dutiny ústní spadá do orálních infekcí. Objevuje se u imunokompromitovaných jedinců a projevuje se krémově bílými ložisky na patře, bukalní sliznici, jazyku a hltanu. Klinická kandidóza může vést k infekcím i dalších sliznic, zejména

vaginální. Biofilm kandid narušuje vaginální mikrobiom, dále produkci estrogenu a stimuluje akutní zánět [6, 11].

Tvorba biofilmu na abiotických površích podněcuje vzniku nejzávažnějších chronických kandidóz. Biofilm je vytvořen na povrchu katetru či implantátu, buňky kandid jsou tak chráněny před působením imunitního systému. U pacientů se objevuje zánět močových cest, selhání hlasivek, zánět kloubů, nefunkčnost nervového systému. Velký problém představuje tvorba biofilmu na srdečních implantátech, vznikají tak infekce srdečních chlopní. Terapie obnáší podání antimykotik a odstranění implantátu [11].

Závažnost těchto infekcí je spojena s vlastností kandid tvořit biofilm. Součástí rezistence biofilmu je β -1,3-glukan, který brání difúzi antimykotika. Významné antimykotikum je ketokonazol, extracelulárně se akumuluje v biofilmu a inhibuje tvorbu hyf [6, 12].

1.1.2.1 Působení antimykotik a mechanismy rezistence *Candida* spp.

V současné době se zvýšil počet infekcí způsobených kvasinkou *Candida*. Mechanismus většiny antimykotik je destabilizace plazmatické membrány. Je to z toho důvodu, že jsou schopné porušit fosfolipidovou dvojvrstvu buňky a zajistit tak únik cytosolu s následnou buněčnou smrtí. Penetrace do membrány je hlavní funkce hydrofobních léčiv. Současně vnější iontové náboje fosfolipidů poskytují elektrostatickou sílu vyváženou protiionty stabilizující buněčnou membránu. Dalším způsobem porušení membrány je odstraněním těchto iontů pomocí iontové výměny nebo jejich odtokem. Účinnost penetrace bývá často nízká z důvodu velké tloušťky vnějšího ochranného obalu. Ke zvýšení účinnosti se používají kotvící linkery. Dalším problémem u difúze léčiva jsou husté sítě biopolymerů. K zesílení a sestavení biopolymerů dochází uvnitř buněčné stěny. Strukturální integritu buněčné stěny zajišťují glukany a chinin. Opět při využití tohoto poznatku je možné dosáhnout porušení buněčné stěny a možnosti použít k zaléčení antimykotika s mělkým průnikem [13].

Podle chemického charakteru se antimykotika rozdělují na azoly, echinokandiny a polyeny. Nejrozšířenější skupinou v minulosti byly azoly. Ty inhibovaly syntézu ergosterolu, který je nezbytnou součástí plazmatické membrány kvasinek. Inhibice probíhá působením azolů na enzym zodpovědný za syntézu 14- α -sterol demetylázu. Byly vyzorovány tři mechanismy vzniku rezistence na azoly: první mechanismus spočívá ve schopnosti odčerpávat léčivo z buňky pomocí změny buněčné stěny. Jde o výsledek up-regulace genů prostřednictvím bodových mutací a transkripčních faktorů kódující efluxní pumpy. Druhý mechanismus není tak častý a jedná se o změnu či zvýšení regulace genu kódující cílový enzym 14- α -sterol

demetylázy [14, 15]. Třetí mechanismus je vznik metabolické dráhy, která není narušená antimykotikem a zůstává tak zachována funkční buněčná membrána. Naproti tomu echinokandiny narušují syntézu β -d-glukanů, které jsou součástí buněčné stěny kvasinek. Konkrétně se jedná o nekompetitivní inhibici β -d-glukansyntházy. Byla zjištěna rezistence i na echinokandiny bodových mutací v genech *FKS1* a *FKS2*. Výsledkem je záměna aminokyselin serinu za prolin a fenylalaninu za tyrosin, což vede ke změně cílového místa působení [12, 14]. Polyeny se podobně jako azoly vážou na steroly, především na ergosterol a podněcují tak pórovitost buněčné stěny. Při vzniku rezistence se předpokládá úplná absence ergosterolu či jeho odlišná struktura. 5-flucytosin je podáván současně s jiným antimykotikem a uplatňuje se jako antimetabolit při kompetitivní inhibici s uracilem během syntézy RNA. U syntézy DNA interferuje s enzymem thymidylát syntetázou. 5-flucytosin není vhodné používat monoterapeuticky z důvodu přítomnosti primární rezistence a rozvojem sekundární rezistence. Podstata primární rezistence je mutace enzymu permeázy kódovaného genem *FCY2* (purin/cytosinová permeáza) nebo ztrátou aktivity a následkem je zhoršená schopnost vychytávání léčiva [14].

Díky tomu, že druhy rodu *Candida* jsou nejčastějším oportunním lidským patogenem, vede časté používání antimykotik k rozvoji rezistence na onemocnění způsobující tento rod. Rezistenci u *Candid* zajišťují mnohé mechanismy, z nichž nejlépe popsáným je vylučování léčiva z buňky a současně narušení importu léčiv dovnitř buňky. Mezi další mechanismy rezistence patří chromosomální duplikace, změna a zmnožení cílových míst patogenu. Důležité prokázané dráhy rezistence jsou stresové odpovědi na oxidační, osmotické, termické, nutriční a nitrosativní stresory. Vývoj rezistence je multifaktorový proces závisející na hostiteli i vlastních buněk kandid [16].

Dlouhodobý monitoring mechanismů rezistence je vhodný pro odhad chování houbové infekce a rychlou reakci na infekci. V takovémto případě se hovoří o termínu mykologická rezistence, což je schopnost kandid růst v antimykotickém prostředí [12]. Během testování se hodnotí parametr minimální inhibiční koncentrace (MIC), který hodnotí citlivost antimykotika vůči houbám v *in vitro* prostředí [14].

1.1.3 Mutantní kmeny

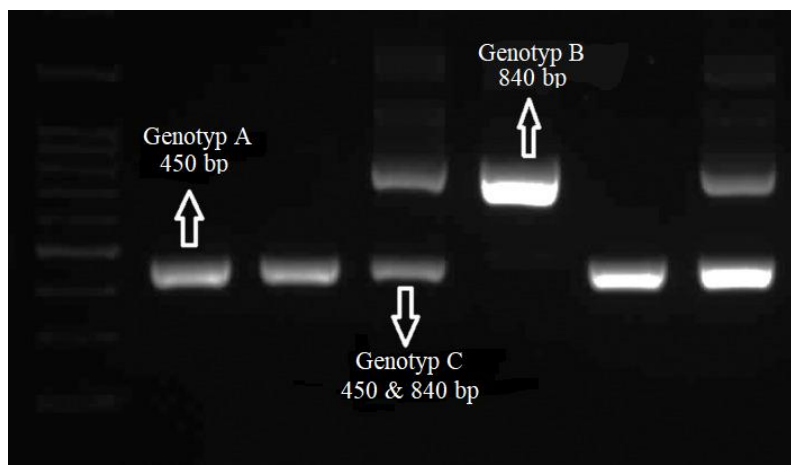
Genom *C. albicans* má vysokou schopnost přizpůsobovat se prostředí např. selekčním tlakům či působením antimykotických látek. S genetickými změnami lze pozorovat i změny v karyotypu. Přirozené genomové mutace zajišťují kandidám existenční výhody a větší šanci na pomnožení [17].

1.1.3.1 Genetika tvorby mutantních kmenů *C. albicans*

Candida albicans je mikroorganismus, jehož DNA je podrobně zkoumaná a současně upravovaná. Kandidy jsou schopné parasexuálního cyklu s absencí meiózy. Vzniká tak vysoce rekombinantní potomstvo obsahující alely obou rodičovských buněk. Účinnou metodou, jak upravovat genom kandid a vytvořit tak nové mutantní kmeny, jsou techniky rekombinantní DNA. Tímto způsobem bylo připraveno přes 1000 genových mutantů diploidního charakteru. Transkripční analýza je dalším přístupem používaným k profilování celého genomu. S tím úzce souvisí i proteomické techniky, díky kterým je možná identifikace proteinů exprimovaných v biofilmech. Tyto techniky potvrdily rozdílnou expresi mRNA mezi biofilmy a planktonickými buňkami. Lze rozlišit transkripční regulátory, které kontrolují a současně regulují vývoj biofilmu a neregulační geny, které se dále dělí na základě schopnosti zlepšit přilnavost, zvýšit funkčnost buněčné stěny či filamentace, zvyšovat rezistenci vůči lékům, schopnost řídit extracelulární matrix a v neposlední řadě řídit disperzi [18].

C. albicans má výraznou genetickou a fenotypovou rozmanitost. V heterozygotních buňkách je obsažen jaderný diploidní genom o velikosti 14,4 MB, který je uspořádán do osmi chromozomů. V patogenezi hraje významnou roli nestabilita genomu. Genová nestabilita formuje vlastnosti buňky jako je rychlost růstu, morfologie, odolnost vůči stresorům jako např. antimikrobiální peptidy, antimykotika a současně ovlivňuje patogenitu během infekce [19]. „Standardní klinický izolát“ používaný jako laboratorní gen *C. albicans* SC5314 obsahuje 43 665 heterozygotních pozic. Tyto heterozygotní pozice jsou nerovnoměrně distribuovány v genomu a mezi izoláty se jejich frekvence liší [17].

Genotyp *C. albicans* lze rozdělit do tří skupin: A (450 bp), B (840 bp), C (450 a 840 bp) na základě přítomnosti či nepřítomnosti intronů v transkribované oblasti spaceru 1 26s rDNA [20]. Markery jednotlivých genotypů jsou vidět na obr. č. 3.



Obrázek 3 Příklady genotypů A, B, C získaných pomocí PCR RFLP z izolátů *C. albicans*, převzato a upraveno ze zdroje [20].

1.1.3.2 Vybrané mutantní kmeny

Δcdr1

Gen *CDR1* kóduje plejotropní ABC efluxní transportér mnoha léčiv. Současně poskytuje rezistenci na vybrané chemické látky včetně nisomycinu, cykloheximidu, flukonazolu, mikonazolu, ketokonazolu, itrikonazolu, nystatinu, terbinafinu, amorolfinu, brefeldinu A, amfotericinu B, flufenazinu a také estrogenu. Účastní se apoptózy indukované farnesolem prostřednictvím glutathion efluxní aktivity. Další funkcí je translokace membránových lipidů, včetně aminofosfolipidů, čímž reguluje asymetrickou distribuci fosfatidyletanolaminu [21]. Co se týká vlastností *C. albicans* s absencí genu *CDR1*, je obecně snižená rezistence na anisomycin, cykloheximid, flukonazol, itraconazol, ketokonazol a mikonazol. Naopak je patrná abnormální akumulace fosfadylethanolaminu [65].

Δrhb1

Gen *RHB1* je součástí plazmatické membrány a jeho molekulární funkcí je GTPázová aktivita. Váže molekuly GDP a GTP. Podílí se na vláknitém růstu populace regulovaném dusíkem, zároveň je součástí vzniku jednodruhového biofilmu na neživém substrátu [21]. V nepřítomnosti genu *RHB1* v buňkách je velikost buněk větší a mají zvýšenou tvorbu biofilmu. Zároveň je snížený vláknitý růst a buňky mají nižší rezistenci na rapamycin a hygromycin B [65].

Δhap5

Gen *HAP5* se v buňce nachází v jádře a současně také v komplexu heteromerního transkripčního faktoru CCAAT, kde funguje jako aktivátor i represor v závislosti na jeho interagujících kofaktorech. Jeho molekulární funkcí je vazba s DNA a transkripčními faktory. Co se týká biologických procesů, účastní se buněčné odpovědi na alkalické či neutrální pH, teplotu, mědnaté kationty, ovlivňuje pozitivně, ale i negativně filamentární růst [21]. V případě chybějícího genu *HAP5* v jádře, buňka vykazuje snížený vegetativní růst, sníženou odolnost vůči alkalickému prostředí a kovům. Naopak má zvýšenou odolnost na rapamycin [65].

Δhap43

Gen *HAP43* se stejně jako gen *HAP5* nachází v jádře a v komplexu transkripčního faktoru CCAAT. Je také součástí regulačního transkripčního komplexu RNA polymerázy II. Vazbou DNA transkripčního aktivátoru dojde ke zvýšení aktivity RNA polymerázy II. Zároveň reguluje transkripci z promotorů RNA polymerázy II v závislosti na vlivu přítomnosti železa, stresorů (jako je změna teploty či ionizující záření, vlhkosti a oxidativního stresu [21]). U buněk, které postrádají gen *HAP43* byla zaznamenána menší velikost buněk, snížená tvorba biofilmu a nižší schopnost virulence. Současně tyto buňky mají vyšší odolnost vůči fagocytóze [65].

1.1.4 Biofilm *C. albicans*

Kvasinky stejně jako ostatní mikroorganismy se vyskytují ve dvou formách. První forma planktonní žije samostatně, druhá žije v konformaci zvané biofilm [22]. Tvorba biofilmu u kandid, ale i u většiny mikroorganismů, představuje jeden z hlavních faktorů virulence [23].

Biofilm je definován jako vysoce organizované mikrobiální společenství. Představuje jeden z hlavních virulentních faktorů přispívající ke vzniku kandidózy. Tvorba biofilmů komplikuje léčbu a vede tak k vysoké mortalitě a morbiditě [24].

Biofilmy *C. albicans* jsou složité struktury tvořené různými typy mikrobiálních buněk: pučící buňky kvasinek kulatého tvaru, pseudohyfy, které mají elipsoidní tvar a jsou uzavřeny ve svých přepážkách a vyzrálá forma zvaná hyfy, jejichž stěny jsou rovnoběžné bez viditelného zúžení. Buňky jsou uloženy do extracelulární polysacharidové matrice mající ochrannou funkci. Biofilm je spojen s hostitelskou tkání nebo abiotickými povrchy. Matrice se uplatňuje jako fyzická ochrana před vnějším prostředím a zajišťuje integrální celistvost biofilmu. Přítomnost matrice je rozhodující v rezistenci kvasinek proti působení imunitního systému hostitele, antimykotik či mechanickým vlivům [5, 25].

1.1.4.1 Vznik a vývoj biofilmu

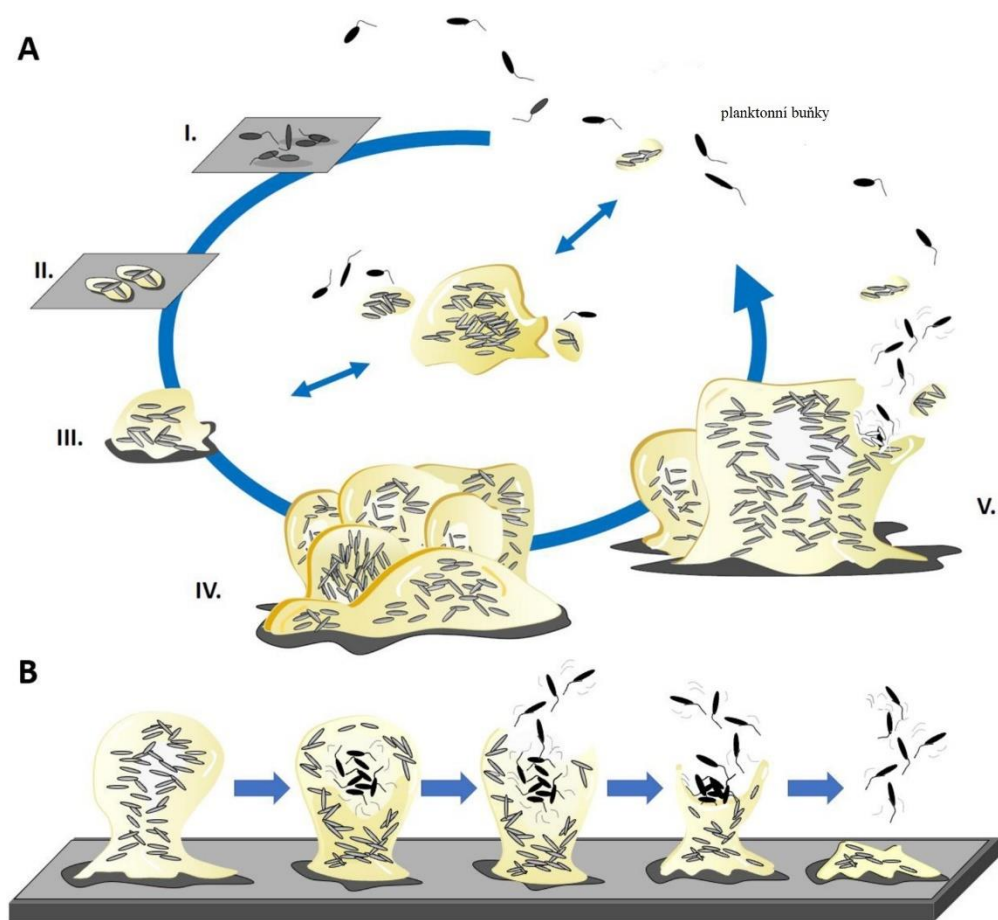
Vznik biofilmu kandid lze rozdělit do čtyř vývojových stádií: adheze, proliferace, zrání a disperze. Jak lze vidět na obr. č. 4, tvorba biofilmu je cyklický proces, který je zahájen po povrchovém kontaktu jednotlivých planktonických buněk. Je možné rozlišit reverzibilní (krok I), ireverzibilní připojení (krok II) a zrání biofilmu (krok III-IV). Na každé vývojové stádium lze uplatnit vzorec produkce proteinů a genové exprese [22, 24].

Z počátku adheze se kvasinky přichytí k podkladu pomocí hyf (krok I) a vytvoří bazální vrstvu, ta ukotví vznikající biofilm k povrchu [24]. Buňky, které přilnuly k substrátu, ztrácí expresi genů hyf a bičíků. Produkují se složky biofilmové matrice, indukují se mechanismy rezistence na antimykotika (včetně efluxních pump) a zvyšuje se hladina determinant virulence (krok II) [22, 24]. Lze pozorovat odlišné chování buněk v biofilmu od planktonických buněk s charakteristickými vlastnostmi především vyšší odolností k imunitnímu systému hostitele, a dále pak zvyšující toleranci ke stresorům, jako je hladovění, dehydratace a působení antimykotik. Tyto vlastnosti jsou významné především pro klinické účely, ale také i pro průmysl [22].

Následná proliferační fáze (krok III) je charakteristická vznikem filament vedoucí k tvorbě hyfových a pseudohyfových buněk. Filamenta se dále prodlužují během celého vývoje biofilmu a vytváří tak složitou síť udržující pevnost a robustnost biofilmu [24]. Současně v této fázi buňky kvasinek produkují hydrolytické enzymy: proteinázy, hemolyziny a fosfolipázy, což napomáhá kvasinkám proniknout do hostitelské tkáně [5].

Následuje fáze zrání, při které se hyfy obklopí exopolymerním obalem. Ten drží celou strukturu biofilmu pohromadě. U kandid se exopolymerní obal skládá z polysacharidů (α -mannan; β -1,6-glukan a β -1,3-glukan), proteinů, lipidů a eDNA (extracelulární DNA). Biofilmy dozrávají do maximální tloušťky (krok IV). Současně často dochází k odlupování částí biofilmu v důsledku mechanického nebo smykového napětí [22].

Na rozdíl od oddělení je disperze neboli rozptyl řízeným procesem biofilmu. V tomto vývojovém stádiu biofilmu kvasinky uvolňují sekundární buňky za účelem rozšířit infekci (krok V). Je tak zajištěn „životní cyklus biofilmu“ [24, 26]. Je důležité klinicky podchytit fázi disperze, a to nejen z toho důvodu, aby se nerozšiřovalo ohnisko infekce, ale aby se kvasinky nešířily do krevního řečiště [5]. Přejít biofilmu na planktonické buňky je rizikový proces z hlediska nižší ochrany před okolními vlivy, a právě na toto stádium se snaží zacílit některé metody léčby infekcí [22]. Celý vývojový proces trvá 24-48 hodin a tloušťka biofilmu je až několik mikrometrů [18, 24].



Obrázek 4 Tvorba a vývoj biofilmu, převzato a upraveno ze zdroje [22].

Schéma A naznačuje cyklický proces tvorby biofilmu. Biofilm vzniká přichycením planktonních buněk k podkladu, pokračuje vrstvením buněk a končí disperzí buněk do prostoru.

Schéma B ukazuje vzhled jednotlivých stádií tvorby biofilmu vedoucí k disperzi buněk.

Kvasinky, které se nachází v biofilmu, mění své fenotypové znaky, což je zásadní pro přežití buněk. *Candida albicans* jakožto polymorfní houba je schopná života v různých morfologických formách. Tvorba těchto vláknitých forem se označuje pojmem morfogeneze. Současně tvorba hyf je regulována faktory souvisejícími s virulencí. Změna fenotypu u kvasinek byla vyvinuta za účelem ochrany před vnějšími vlivy a usnadnění soužití jako komenzál s ostatními buňkami, např. biofilm ve střevním traktu. Zároveň ale mohou podporovat virulenci kvasinek. Samotnou morfogenezi spouští působení okolních vlivů na buňku, jako neutrální pH, zvýšení teploty, přítomnost určitých živin, signály hladovění, hladiny CO_2 a O_2 , hustota buněk a kontakt s fyzickými povrchy. Iniciace hyf a následné udržení hyf jsou dva obecné kroky, které si morfogeneze vyžaduje. Na příklad pro hyfální iniciaci je signálem zvýšená teplota. Dojde k odstranění filamentačního represoru Nrg1 (regulátor transkripce Nrg1) z oblasti promotoru HAG (hyfa-asociované geny), následuje vazba

Brg1 (GATA-transkripční faktor) na místo chybějícího Nrg1. Tato reakce aktivuje histon deacetylázu Hda1, následuje remodelace chromatinu a ustanovení filamentózního chromatinového stavu, který podporuje udržení hyfy a expresi HAG. V této formě se vyskytuje celou dobu setrvání v biofilmu [25, 27].

1.1.4.2 Struktura biofilmu

Struktura biofilmu je vysoce organizovaná. Biofilm je tvořen samotnými buňkami uloženými v extracelulární matrici. Přítomnost extracelulární matrice zajišťuje ochranu před okolními vlivy. Chemické složení matrice je dynamické v závislosti na prostředí (změny teplot, pH, typ růstového média apod.). Vždy se ovšem v matrici vyskytují makromolekuly jako jsou proteiny, polysacharidy, lipidy a nukleové kyseliny. Proteiny a glykoproteiny tvoří cca 55 % hmotnosti matrice, z nichž většina je tvořena enzymy zajišťujícími metabolické dráhy v biofilmu (metabolismus sacharidů, aminokyselin, degradace matrice podporující rozptyl biofilmu). Druhou největší skupinou v matrici jsou polysacharidy. Ty jsou tvořeny monosacharidy arabinosa, manosa, glukosa a xylosa. Jejich vzájemná koncentrace se liší. Nejhojněji zastoupené jsou mannany, konkrétně α -1,2, rozvětvené a α -1,6-mannany spojené s lineárními β -1,6-glukany v komplex zvaný mannan-glukanový komplex (MGCx). V hojnosti zastoupení jsou na třetím místě lipidy. Biofilm tak obsahuje z převážné části glycerolipidy a minoritní složkou jsou sfingolipidy. Na neutrálních glycerolipidech jsou ukotveny mastné kyseliny, z nichž jsou nejvíce zastoupená kyselina olejová a linoleová, s nižší koncentrací pak kyselina palmitolejová, palmitová, stearová a myristová. Zástupcem polárních glycerolipidů je fosfatidylethanolamin. Dalšími lipidy přítomnými v biofilmu je ergosterol, hlavní zástupce sterolů, a prostaglandin – prekurzor eikosanoidů. Z nukleových kyselin se zde vyskytuje eDNA složená z náhodných nekódujících sekvencí. eDNA je do matrice uvolňována buněčnou lyzí, systémem quorum sensing a vylučováním z vezikul [13, 23].

Mezi jednotlivými exopolymerními složkami extracelulární matrice dochází k interakci a dává vzniknout celé struktuře matrice. Výsledná struktura má vzhled soudržné hydratované trojrozměrné sítě. Hlavním příspěvkem ke struktuře je interakce komplexu MGCx. Interference se syntézou nebo exportem konkrétní složky vede ke změně koncentrací ostatních polysacharidů. U smíšených biofilmů s mutantními kmeny je matrice koordinována extracelulárně u těch mutantů, kterým chybí daný typ polysacharidu, je doplněna sousedními buňkami. Dalšími fyzikálně - chemickými interakcemi, které přispívají ke stabilitě biofilmu,

je vzájemné „propletení“ biopolymerů. Významnou roli zde má i eDNA zajišťující strukturální integritu potřebnou pro udržení biofilmu [27, 28].

1.1.4.3 Regulace biofilmu

Tvorba biofilmu je řízena devíti hlavními regulačními geny (*EFG1*, *BCR1*, *BRG1*, *NDT80*, *TEC1* a *ROB1*, *FLO8*, *GAL4*, *RFX2*) [29, 30]. *EFG1* a *TEC1* regulují buněčnou morfologii, *NDT80* se podílí na tvorbě struktury biofilmu a *BCR1* propojuje funkci buněk s hyfami. Geny *BGR1* a *ROB1* jsou přítomny pouze u druhu úzce spojených s *C. albicans*. Další regulační geny zajišťují specifitější procesy jako např. *HWPI* růst hyf, *GSCI* a *MNN1* produkci extracelulární matrice a geny *CDR1* a *MDR1* se podílejí na rezistenci léčiv. U buněk, které exprimují výše zmíněné geny, byly zjištěny mírné rozdíly fenotypu biofilmu, např. snížená tloušťka vytvořeného biofilmu, menší počet hyfálních buněk či nedostatečná adherence k podkladu. V souladu s těmito experimenty je třeba identifikovat i mnohé další geny zodpovědné za růst a funkci biofilmu [29, 31].

Proces adherence zahrnuje více genů kódujících adheziny. Adheziny obsahují glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Tvorba adhezín souvisí s typem povrchu (silikonový povrch, polystyrén, zde se uplatňuje především *BCR1*) [29].

Na produkci extracelulární matrice se podílejí transkripční modulátory Rlm1 a Zap1 (transkripční modulátor citlivý na zinek). Extracelulární matrice je směsí převážně glykoproteinů, sacharidů, dále pak lipidů a nukleových kyselin. Součástí jsou také extracelulární enzymy zajišťující několik funkcí, a to především trávení buněčných složek, podporu disperze a ochranu před imunitním systémem [18, 29, 30].

Jak již bylo řečeno, hyfy jsou tvořeny po celou dobu zrání biofilmu. Na tvorbě hyf se podílejí už zmíněné geny *EFG1*, *NDT80*, *ROB1* a *TEC1*. U některých příbuzných druhů např. *C. parapsilosis* lze vidět hyfy kratší a v menším počtu vůči hyfám u *C. albicans*. Výsledný biofilm je tak stabilnější. Vyzrálý biofilm je poté schopný disperze. Tento proces je regulován transkripčními regulátory Ume6, Nrg1 a Pes1 [29, 30, 31].

1.1.4.4 Quorum-sensing

Quorum-sensing slouží nejen kandidám, ale i obecně mikroorganismům ke vzájemné interakci a řadí se tak mezi univerzální systém chemické komunikace. Jde tedy o komunikaci *C. albicans* s jinými buňkami v biofilmu. Komunikace je řízena rozpustnými quorum - sensing molekulami (QSM) nebo autoinduktory, ty jsou do okolí vylučovány v závislosti na buněčné hustotě biofilmu. *C. albicans* reguluje dělení buněk a tvorbu polysacharidové matrice [32]. Nejvýznamnějšími zástupci QSM je farnesol, tyrosol, homoserin lakton (HSL – QSM *P. aeruginosa*). Současně je komunikace umožněná i díky přítomnosti mastných kyselin, (především kyselinou máselnou, kaprinovou, palmitolejovou, linolovou a arachnoidovou), dále pak pomocí eikosanoidům proteinům a peptidům, rapamycinu, geldanamycinu a inhibitorům histondeacetyláz. Některé z vyjmenovaných molekul jsou produkovány přímo kvasinkami za účelem autoregulace tvorby hyf (např. QSM, eikosanoidy) a jiné jsou sekretovány buňkami hostitelského organismu či jeho střevní mikroflóry (mastné kyseliny, proteiny, peptidy apod.) [25].

Aktivované signální dráhy stimulují morfogenezi a expresi HAG. Následuje kaskáda aktivačních a inhibičních reakcí, jejichž výsledkem je regulace morfogeneze a koregulace široké škály znaků virulence. Výsledkem kaskády reakcí je také aktivace nebo inhibice klíčových transkripčních regulátorů např. Efg1, Czf1, Cph1, Tec1, Flo8 a Nrg1. Ty řídí expresi genů potřebných pro tvorbu hyf a genů asociovaných s hyfami [25].

1.1.4.5 Klinické důsledky biofilmu

C. albicans společně s *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* spadají mezi multirezistentní patogeny způsobující invazivní onemocnění [19].

Invazivní kandidóza je nozokomiální infekce, přičemž hlavní zdroj nákazy je jednotka intenzivní péče. Má vysokou morbiditu i mortalitu především u dětí, imunosuprimovaných a starších osob. Klinická diagnóza je obtížná z důvodu nespecifických systémových příznaků [19].

Nejvýznamnější rizikové faktory pro vznik infekce jsou: antibiotická léčba s následným chirurgickým zákrokem, neutropenie, parenterální výživa, močový katetr, některá onemocnění (např. hemoragická malignita, solidní nádor, srdeční onemocnění, trauma, neurologické onemocnění, gastrointersticiální, plicní, cévní onemocnění, transplantace orgánů, genetické onemocnění či vrozená malformace, onemocnění ledvin, jater, slinivky břišní, *diabetes mellitus*). U těžce imunokompromitovaných pacientů

se z lokálních povrchových infekcí úst, hrdla nebo reprodukčních orgánů vyvíjí systémová infekce postihující oběhový systém a další hluboké tkáně. Chronická expozice *C. albicans* atopické dermatitidy vede k produkci specifického imunoglobulinu E (IgE) vůči antigenům této kandidy [19, 20].

1.1.5 Morfologie *C. guilliermondii*

Candida guilliermondii spadá mezi vzácné druhy rodu *Candida*, které představují 8 % výskytu z celého rodu [33]. Podobně jako *C. albicans* je *C. guilliermondii* geneticky heterogenní komplex [26, 34]. Zahrnuje několik fenotypově nerozeznatelných druhů, jako jsou: *C. guilliermondii sensu stricto*, *Candida fermentati*, *Candida carpophila* a *Candida xestobii* [33, 34]. Z nichž jsou *C. guilliermondii sensu stricto*, *Candida fermentati* a *Candida carpophila* považované za lidské patogeny [33]. Kandidémie iniciované *C. guilliermondii* se vyskytují v omezené míře pouze v 1–3 % případů v závislosti na geografické poloze [34]. Virulence celkově u komplexu *C. guilliermondii* je mnohonásobně nižší, než u *C. albicans*. U komplexu *C. guilliermondii* je potvrzená nižší náchylnost k azolům a echinokandinům a infekce kandidemií byla hlášena hlavně u pacientů s chronickým onemocněním, zejména s rakovinou. Současně nízký počet hlášených případů znamená nedostatečnou identifikaci tohoto komplexu jako původce infekce [33].

Buňky *C. guilliermondii* jsou drobného a kulatého tvaru, ty se následně prodlužují do podlouhlého tvaru a vytvářejí pseudohyfy. Rozmnožují se pučením [26]. Schopnost tvořit biofilm je výrazně nižší než u *C. albicans* (wt) kmene SC5314 [34]. V prostředí antimykotik (anidulafunginem a mikafunginem) byly zjištěny změny v růstu biofilmu. Komplexní biofilm byl tvořen převážně vrstvou sevřených blastospor bez hyf a pseudohyf [33].

Buněčný obal skládající se z buněčné stěny a cytoplazmatické membrány je obdobný jako u *C. albicans*. Obsahuje chitin, jehož koncentrace se zvyšuje při reakci na expozici subletální koncentrace kaspofunginu (antimykotikum ze skupiny echinokandiny) [15].

1.2 Rod *Pseudomonas*

Z rodu *Pseudomonas* je nejvýznamnějším druhem *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). *P. aeruginosa* je gramnegativní, pohyblivá tyčinka. Délka tyčinky je 1-5 μm a na šířku 0,5-1,0 μm . Řadí se mezi fakultativně aerobní bakterie. Současně je schopná i anaerobního růstu v prostředí dusičnanů jako terminální akceptor elektronů. Během růstu vykazuje omezené fermentační vlastnosti, díky kterým je snížen nebo zcela pozastaven růst kolonií. *P. aeruginosa* je schopná růstu v rozmezí teplot od 4-42 °C, přičemž optimální teplota kultivace je 37 °C. Původní kmeny *P. aeruginosa* jsou schopné rozkládat polycyklické

aromatické uhlovodíky a často tak jsou detekovány ve vodních nádržích odpadních vod, ale i v nemocničním prostředí [35].

Pseudomonas aeruginosa je oportunně patogenní bakterie, způsobující akutní i chronické infekce otevřených ran a močového měchýře. Může být i komplikací během chemoterapeutické léčby nebo jakéhokoli zdravotního stavu oslabující imunitní systém (např. cystická fibróza) [36]. *P. aeruginosa* je také častý původce nozokomiálních infekcí, zároveň je i obtížně léčitelná díky její schopnosti obrany vůči přirozené imunitní reakci hostitele a vysoké odolnosti k širokému spektru antibiotických látek. Má široké spektrum virulentních mechanismů, díky kterým snadno dochází k infekci a kolonizaci. Jedním ze zásadních mechanismů je quorum-sensing (viz kapitola 1.1.4.4. Quorum-sensing) a hlavní sekreční systémy typu 2, 3, 6 (tedy T2SS, T3SS, T6SS). Jejich vylučované proteiny a toxiny působí jako faktory virulence [37]. Konkrétně T2SS v extracelulárním prostředí vylučuje proteázy IV, elastázy LasA a LasB, fosfolipázy C a enterotoxin, pyoverdin [36, 37]. Všechny tyto proteiny jsou transportovány přes cytoplazmatickou membránu pomocí Sec a Tat mechanismům. T3SS v blízkosti cílové buňky „vstříkují“ enterotoxiny (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) přímo do cytoplazmy. Dochází tak k inaktivaci buněčných substrátů včetně GTPáz. T6SS je složen z jaderných genů (*TssA-C*, *TssE-G*, *TssJ-M*, *HCP*, *VGRG* a *CLPV*) tvořící klíčové struktury. T6SS tedy kóduje shluky označované jako H1-T6SS, H2-T6SS, H3-T6SS. H1-T6SS se podílí na transportu sedmi antimikrobiálních toxinů, které se zaměřují na buněčnou stěnu, nukleové kyseliny a další buněčné kompartmenty. H3-T6SS je schopen získávat železo a ovlivňovat antimikrobiální aktivitu [37].

Tvorba biofilmu je ovlivněna mnoha faktory včetně podmínek kultivace a počáteční velikosti inokula. Díky tvorbě biofilmu, podobně jako *Candida*, jsou schopné snadno přežít na biotických i abiotických površích, jako je lékařské vybavení po dezinfekci. K většímu rozvoji infekce přispívá i vznik perzistentních buněk neboli subpopulace vykazující nedělicí se stav, nízkou sílu pohybu protonů, sníženou translaci a nižší hladiny ATP. Výskyt těchto buněk bývá vyvolán nadužíváním konvenčních antibiotik a enviromentálním stresem. Perzistentní buňky se od kmene nejvíce se vyskytujícího v přirozeném prostředí (wt) liší i ve fenotypu: menší velikost kolonií, pigmentace. Během léčby např. antibiotiky tyto perzistentní buňky přechází do hybridního stavu, ve kterém jsou schopny tolerovat vysoké dávky léčiva a po ukončení podávání léčiva se dostávají opět do metabolicky aktivního stavu [36].

Tvorba biofilmu je komplexní proces, během kterého buňka přijímá signály z okolí, na které následně reagují regulační mechanismy. Zásadní roli hraje tvorba extracelulární

polymerní látky (EPS). Její regulace tak zahrnuje především bis-(3'-5')-cyklický dimerní guanosinmonofosfát (c-di-GMP), dvousložkové systémy GacA/GacS a quorum sensing. c-di-GMP je intracelulární druhý posel a jeho úlohou v bakteriích je stimulace biosyntézy adhezinů a exopolysacharidů vznikem biofilmu. Současně inhibuje motilitu bakterií řídící přechod mezi planktonickou formou a stavem v biofilmu. GacA/GacS regulují expresi genů *PEL* a *PSL* pro produkci exopolysacharidů. Spřaženým mechanismem jsou dvě histidinkinázy LadS a RetS působící opačným způsobem. Systém GacA/GacS řídí transkripci dvou regulačních RNA (sRNA), to vede ke snížení nebo naopak ke zvýšení translace operonu *PEL* nebo *PSL*. RetS je také nezbytný pro expresi virulentních genů (jako jsou T3SS, T6SS) a geny související se syntézou exopolysacharidů. Exopolysacharidy jsou rovněž regulovány quorum sensing prostřednictvím tyrosin fosfatázy. Ta je řízena systémem LasR/I a negativně reguluje produkci polysacharidu *Pel* pomocí defosforylace proteinu. *Psl* a *Pel* jsou klíčové polysacharidy pro tvorbu biofilmu, a tudíž jejich regulace probíhá na několika úrovních [38].

Původními geny u *P. aeruginosa* jsou geny *PAO1* a *PA14*. U genomu však často dochází k mutacím jako jsou jednonukleotidový polymorfismus (SNP), krátké inserce či delece. Ročně jsou v průměru odhaleny tři SNP a 0,4-2,7 menším indeltů za rok. Oproti tomu je známá i hypermutabilita, která u *P. aeruginosa* vzniká opravou DNA. [39].

1.3 Polymikrobiální interakce

Polymikrobiální interakce jsou v přírodě zcela běžné, např. interakce bakterií a hub v biotopech. Co se týče lidského těla, lze polymikrobiální interakce nalézt např. v gastrointersticiálním traktu, v plicích nebo v kožních poraněních [40].

Candida albicans je schopná s celou řadou bakterií (např. rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*) tvořit polymikrobiální biofilm. Polymikrobiální biofilm ovlivňuje jak celý průběh onemocnění, tak i jeho léčbu. Zjednodušeně lze specifické interakce v biofilmu rozdělit na synergické a antagonistické. V polymikrobiálním biofilmu probíhá obousměrná interakce regulovaná mezidoménovou signalizací a molekulárními mechanismy [41].

Nejen složením a povahou mikrobů tvořící biofilm, ale také chemickou komunikací mezi nimi je dána závažnost polymikrobiální infekce. Univerzální chemická komunikace mezi buňkami v biofilmu je quorum-sensing (viz kapitola 1.1.4.4. *Quorum-sensing*). Interakce QS se vyskytují jak mezi buňkami stejného druhu, tak i mezi buňkami různých druhů. Hlavní quorum-sensing molekulou (QSM) produkovanou *C. albicans* je farnesol. Inhibicí syntézy

homoserinu laktonu potlačuje *P. aeruginosa*. To má za následek redukci pohybu bakterií a signalizaci pyocyaninů a chinolonů. Farnesol současně působí i na samotnou *Candidu* a inhibuje filamentaci prostřednictvím útlumu adenylylcyklázy v dráze Ras1-cyklické AMP proteinkinázy A, která za běžného stavu reguluje růst hyf. Farnesol je také spouštěčem buněčného oxidačního stresu a apoptózy. QSM vylučované *P. aeruginosa* je *N* - (3 - oxododekanoyl)-L-homoserin lakton. Má strukturní podobnost a účinky s farnesolem. Stejným mechanismem inhibuje filamentaci u *C. albicans* [31, 32].

Kromě molekul QS mají v interakci významnou roli i fenaziny. Nejlépe prostudovanými bakteriálními fenaziny je pyocyanin neboli methyl-1-hydroxyfenazin. Je produkovaný *P. aeruginosa* a jeho úlohou je udržování stability poměru NADH/NAD⁺ v buňce. Dále snižuje cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), což je problém zejména pro *C. albicans*, která tuto molekulu potřebuje pro přechod kandid do stádia hyf. Kromě cAMP inhibuje u kandid přechod na hyfy i fenazinů-1-karboximid, jehož mechanismem účinku se zvyšuje produkce reaktivní formy kyslíku (ROS), která má toxický účinek. Zásadní vliv i polymikrobiální interakci mají také metabolity mastných kyselin. *C. albicans* i *P. aeruginosa* metabolizuje exogenní mastné kyseliny na různé lipidové metabolity, včetně eikosanoidů. V biofilmu tvořeném *P. aeruginosa* a *C. albicans* se snižuje schopnost obou kultur metabolizovat eikosanoidy. Zvýšená koncentrace eikosanoidů podporuje nárůst *P. aeruginosa* [40, 42].

C. albicans nejen, že ochotně přetrvává v polymikrobiálním biofilmu s gram - negativními bakteriemi (např. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), ale její zastoupení se významně zvyšuje na úkor bakterií. Rovněž bylo zjištěno, že *Candida* po 24 hodinách kultivace indukují vyšší hladiny genové exprese a také hodnoty cytokinů IL-8 a TNF- α vůči jednodruhovému biofilmu [43], na rozdíl od dřívějších studií, kde byla stanovena koncentrace *C. albicans* v biofilmu s totožnou gram-negativní bakterií. *A. actinomycetemcomitans* vykazovala antagonistické nebo synergické růstové chování vůči *C. albicans* [44].

Příkladem onemocnění vzniklou mezidruhovou biofilmovou infekcí je cystická fibróza či další chronické plicní infekce, způsobené metabolicky různorodými populacemi. U pacientů s cystickou fibrózou jsou běžně izolovány patogeny *C. albicans* a *P. aeruginosa*. Interakce těchto dvou mikroorganismů je dobře prostudovaná v modelových koloniích na agaru. Bylo prokázáno, že během statické kultivace se *P. aeruginosa* přednostně váže na hyfy *C. albicans* a současně inhibuje přechod z kvasinky na hyfu. *C. albicans* má naopak zvýšený růst v tekutých kulturách. Produkce ethanolu během růstu kvasinek podporuje současně i tvorbu biofilmu,

inhibuje motilitu buněk a u *P. aeruginosa* zvyšuje produkci antifungálních fenazinů. Mezi *C. albicans* a *P. aeruginosa* probíhá vzájemná interakce prostřednictvím vylučovaných faktorů, včetně fenazinů, sideroforů, ethanolu a autoinduktorům quorum-sensing měnící dostupnost železa a kyslíku v prostředí. Pro statickou kultivaci biofilmu platí, že faktory produkované buňkami každého druhu v biofilmu mají různé účinky na vzájemnou náchylnost k tvorbě biofilmu nebo setrvání v disperzním stavu. Co se týče biofilmu kultivovaného při kontinuálním toku ovlivňující fyziologii a povrchovou interakci, lze pozorovat zvýšenou schopnost filamentace u *C. albicans*. Současně dochází u obou druhů ke zvýšení akumulace biomasy biofilmu doprovázené poklesem buněk opouštějící substrátový podklad [45].

1.4 Polymery

Během tvorby biofilmu je zásadní adheze k cílovému podkladu. V systémech *in vitro* jsou používány různé typy polymerních materiálů testující přilnavost biofilmu. Vaznost na tyto materiály ovlivňují fyzikální a chemické vlivy. Počáteční přilnavost planktonických buněk je také zprostředkována díky hydrofobním interakcím a elektrostatickým silám a van der Waalovým silám [46, 47]. Fakt, že kvasinky jsou schopné kolonizovat nejrůznější typy syntetických materiálů, má nepříznivé důsledky nejen v medicíně. V medicíně jsou však kritické především implantáty. Infekce těchto zdravotnických potřeb *C. albicans* vede u imunokompromitovaných jedinců k vážným negativním následkům. Pokročilá infekce vyžaduje výměnu implantátu [13].

Tvorba biofilmu je složitý proces a ovlivňují jí jak biotické, tak abiotické faktory. Je zřejmé, že adhezi populace buněk výrazně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti použitých polymerních materiálů. Nejvýznamnějším faktorem je povrchová energie polymeru vycházející z povrchového napětí. Hydrofilní povrchy s vysokou povrchovou energií jsou příznivější pro adhezi oproti hydrofobním materiálům s nižší povrchovou energií. Povrch polymeru může být ošetřen chemií, která mění vlastnosti povrchu. Nejlepší adhezi tak poskytují v tomto pořadí: hydrofilní substráty s kladným nábojem, hydrofobní substráty s negativním povrchovým nábojem a hydrofilní substráty s negativním povrchovým nábojem. Další povrchový fyzikální faktor ovlivňující adhezi je drsnost, textura, pórovitost a vláknitost povrchu. Obecně lze říci, že čím hrubší povrch, tím lepší přilnavost planktonických buněk [47].

Veškeré vlastnosti polymerů vychází z jejich struktury. Tyto struktury lze rozdělit na struktury chemické, molekulové a nadmolekulární. Chemická struktura určuje veškeré základní vlastnosti polymeru. Spojením monomerních jednotek vzniká makromolekula, jejímž

základem jsou atomy uhlíku, vodíku apod. Tvar makromolekul může být lineární, rozvětvený nebo síťovaný. Lineární tvar obsahuje pouze základní páteř řetězce bez postranních řetězců. Rozvětvený tvar už obsahuje i postranní řetězce. Síťové makromolekuly vznikají z lineárních spojením sousedních řetězců na více místech. Dalším parametrem jsou mezimolekulární síly. V makromolekulách mezi atomy se uplatňují velmi silné primární chemické vazby (kovalentní vazby). Molekuly v makromolekule spojují slabší sekundární síly (přirozené a indukované elektrické dipóly). O velikosti sil v polymeru tak rozhoduje polarita. V silně polárních polymerech se uplatňují i vodíkové můstky. Nadmolekulární struktury jsou dvojího typu: amorfní a krystalické, mezistupeň je pak semikrystalické struktury [48].

Schopnost buněk vázat se na plastové polymery tak závisí na struktuře polymeru. Výskyt hydrofilních funkčních skupin ve struktuře polymeru a drsnost povrchu usnadňuje jak přilnavost buňky, tak zvýšení sekrece extracelulárních enzymů buňky. Konkrétně tvorba biofilmu bakterií *Pseudomonas* na povrchu polyethylenu (PE), vykazující hydrofobní vlastnosti a velkou molekulovou hmotnost, vyžaduje upravení polymeru buď oxidací, nebo ošetřením chemikáliemi tak, aby zvýšily povrchové interakce s bakteriemi. Současně exopolysacharidy vylučované biofilmem napomáhají kotvení biofilmu k povrchu [49].

Všudypřítomné druhy rodu *Pseudomonas* jsou schopny degradovat i polyaromatické uhlovodíky včetně polyethylenu a polystyrenu. Buňky zakotvené v biofilmu jsou schopné lépe rozkládat polymer než buňky planktonní. Těto schopnosti se využívá v bioremediaci polymerů. Polymery jsou rozkládané nejprve na oligomery či monomery. Vzniklé monomery jsou schopné přecházet přes buněčnou membránu, následuje asimilace a intracelulární metabolismus. Polystyren je rozložen na styren, toluen a benzen, které jsou metabolizovány *Pseudomonas sp.* U PE a jeho příbuzných materiálů (např. polyvinylalkohol, polyethylen glykol, polyester) závisí rozklad jednak na strukturním uspořádání polymeru, tak na typu kmenu *Pseudomonas* [49].

Žilní a močové katetry či endotracheální kanyly je možné navrhnout a vyrobit z takových polymerních materiálů, které budou upraveny, aby zabránily přichycení bakteriálních buněk. Jedná se tak o aplikaci antimikrobiálního činidla (např. lysozymem) na polymerní povrch [50].

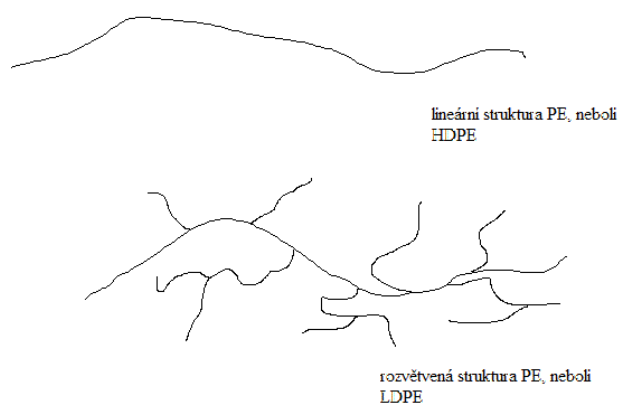
1.4.1 Polyethylen

Polyethylen je jedním z nejrozšířenějších syntetických plastů. Je součástí nejrůznějších předmětů, jako například plastové obalové materiály, láhve, hračky ale i zdravotnické pomůcky a implantáty. Jak znázorňuje rovnice na obr.č. 5 polyethylen vzniká polymerací ethylenu.

Vysoce hydrofobní polyethylen obsahuje ve své struktuře řetězec nasycené ethylové vazby a má tvar lineární struktury (viz obr. č. 6). V případě rozvětveného řetězce není možný vznik krystalické struktury, jako tomu je u lineární struktury. Hovoří se tak o PE s nízkou hustotou. Naopak PE o vysoké hustotě je definováno jako lineární řetězce polymeru, které jsou schopné se seskládat do krystalické struktury a tvořit tak silné mezimolekulární síly [51].



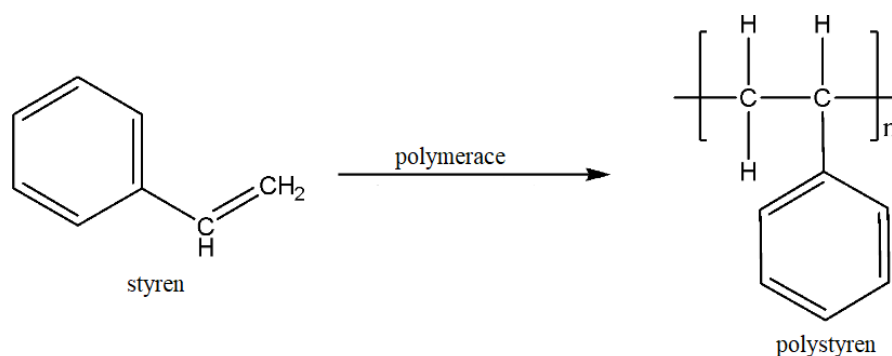
Obrázek 5 Polymerace ethylenu, převzato a upraveno ze zdroje [51].



Obrázek 6 Prostorové uspořádání molekul PE, převzato a upraveno ze zdroje [51].

1.4.2 Polystyren

Polystyren spadá do skupiny polymerů společně s polyethylenem, polykarbonátem či polyesterem. Polystyren je vyroben polymerací styrenu. Stabilizovaný styrenový monomer polymeraci snadno podléhá. Styren je primárně syntetická chemikálie nesoucí vinylovou skupinu. Chemický vzorec styrenu je $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$. Strukturu styrenu a polystyrenu lze vidět na obr. č. 7 [52].



Obrázek 7 Polymerace styrenu, převzato a upraveno ze zdroje [64].

Polystyren je známý také jako vinylbenzen nebo ethenylbenzen. Je nerozpustný ve vodě, ale naopak snadno se rozpouští v organických chemikáliích (např. ethanol, aceton, ether). Polystyren je běžně používaným materiálem, který je součástí elektroniky, hraček, syntetických vláken, laboratorního vybavení a mnoha dalších předmětech používaných v běžném životě [52].

Polystyrenové desky, které se následně používají ke kultivaci, lze upravit tak, aby se zlepšily vlastnosti povrchu pro lepší uchycení a stability biofilmu. Tyto úpravy současně mění hydrofobicitu buněčného povrchu a mění se vzorce adherence. Běžně se desky sterilizují chemicky nebo UV zářením. Za účelem vzniku hydrofilních povrchů je použita optomechanika nebo ošetření povrchu plazmou.

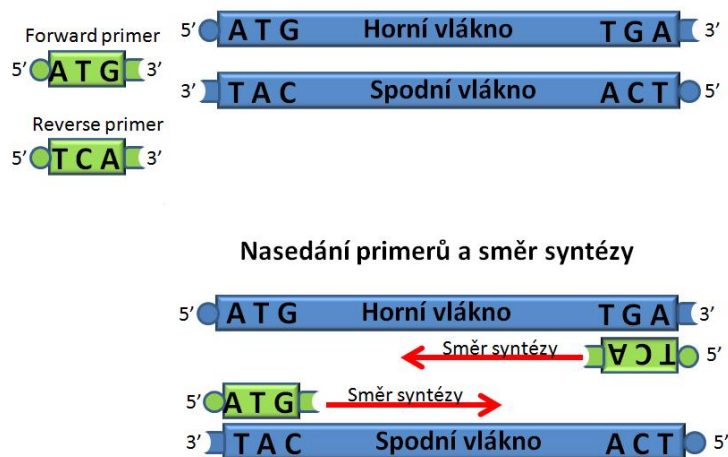
Hydrofobní adheze je k hydrofilnímu povrchu slabá. Účinné ukotvení částice na povrchu i na delší vzdálenost lze zvýšit použitím mŕstkového polymeru [46].

1.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) spadá mezi základní techniky v molekulární biologii. Slouží k amplifikování krátkých segmentů DNA nebo RNA. Tuto techniku poprvé popsal v roce 1985 Kary Mullis, za níž společně s Michaelem Smithem dostal v roce 1993 Nobelovu cenu [53]. Metoda byla použita k zesílení amplifikaci genu β -globinu za účelem diagnostiky srpkovité anémie. V roce 1988 Saiki *et.al.* nahradil polymerázu izolovanou z *Escherichie coli* za termostabilní polymerázu (Taq polymeráza) purifikovanou z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato inovace vedla k praktickému využití PCR [54].

Proces PCR využívá několika kroků, které se opakují v 20 až 40 cyklech, dle požadavků na množství amplifikovaného produktu. Amplifikovaný produkt je po každém cyklu použit jako výchozí materiál pro další PCR cyklus. Jedná se o proces exponenciálního růstu výtěžku. K PCR reakci je třeba výchozích látek: izolovaná nukleová kyselina ze vzorku, přední tzv.

„forward primer“ (F-primer) a zadní tzv. „reverse primer“ (R-primer) jak znázorňuje obr. č. 8, reakční pufr, hořčnatý kationt, směs deoxynukleotid trifosfát (dNTP), a termostabilní DNA polymerázu. Jako vzorek k PCR je možné použít genomovou nebo plazmidovou DNA, RNA převedenou reverzní transkriptázou na cDNA (komplementární DNA) [4]. F a R-primery jsou krátké oligonukleotidy (o velikosti 20-25 nukleotidů) komplementární ke koncovým sekvencím cílové DNA. Tak je zajištěno, že po denaturaci dsDNA oba primery nasednou na konce amplifikované oblasti (viz obr. č. 8) [55, 56].

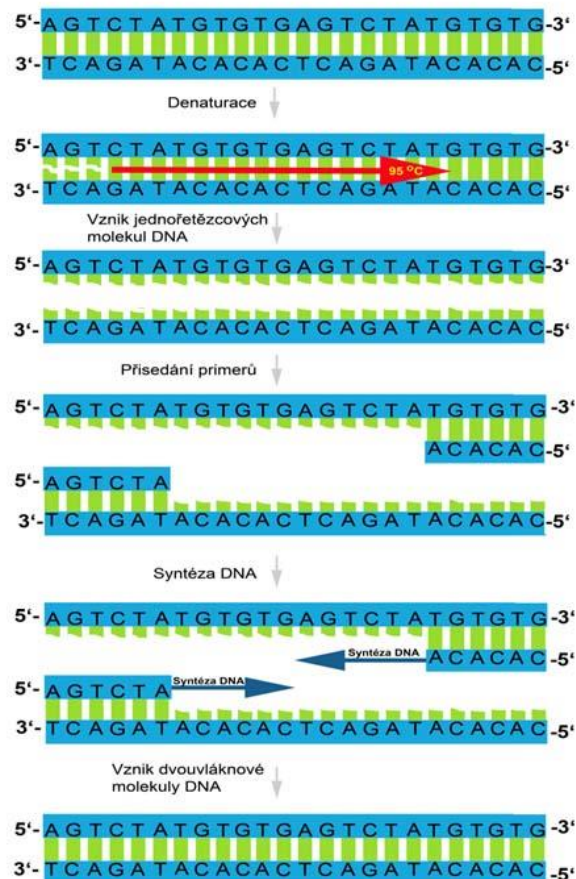


Obrázek 8 Design primerů a elongace vlákna, převzato a upraveno ze zdroje [56].

Nejpoužívanější termostabilní polymerázou je Taq DNA polymeráza. Je vhodná pro rutinní použití a zároveň zlepšuje účinky jiných polymeráz. Koncentrace hořčnatých iontů je do PCR směsi přidávána ve formě $MgCl_2$ za účelem ovlivnění aktivity enzymů, konkrétně zajišťuje procesivitu a přesnost Taq polymerázy. Obvyklá koncentrace $MgCl_2$ je 1,5 mM. Odvíjí se však od koncentrace dNTP, přičemž koncentrace dNTP musí převažovat. Směs dNTP obsahuje směs volných oligonukleotidů dATP, dTTP, dGTP, dCTP a v reakci slouží jako stavební materiál pro vznik nového vlákna. Standardní koncentrace každého oligonukleotidu je 0,2 mM. Součástí PCR roztoku je i reakční pufr o obvyklém složení 50 mM KCl a 10 mM Tris - HCl, pH 8,3. Reakční pufr dodá reakci potřebné pH a koncentraci solí. Koncentrace zmíněných solí ovlivňuje primárně činnost DNA-polymerázy a současně specifitu reakce. Poslední komponentou je voda tvořící výsledný objem PCR roztoku. Voda musí být sterilní a purifikovaná [56].

Jednotlivé reakční kroky se nazývají denaturace (separace cílové DNA), navázání primerů na DNA a vytvoření kopie neboli elongace DNA. Během denaturace dochází k narušení vodíkových můstků v molekule DNA zvýšením teploty na 94-98 °C. Tato teplota je udržována po dobu 20-30 sekund. Dvouvláknová DNA se rozvolní na dvě samostatná vlákna.

Následuje nasedání primerů na rozvolněná vlákna a současně se naváže i DNA polymeráza. Tento krok je umožněn snížením teploty na 50–65 °C. Syntéza DNA vyžaduje opětovné zvýšení teploty na 72–80 °C. V tomto kroku se syntetizují obě vlákna DNA současně. Syntéza probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci. Všechny tři kroky se několikanásobně opakují. Celý průběh PCR je znázorněn na obrázku č. 9 [55, 56].



Obrázek 9 Reakční schéma PCR, převzato a upraveno ze zdroje [56].

1.5.1 Princip real-time PCR

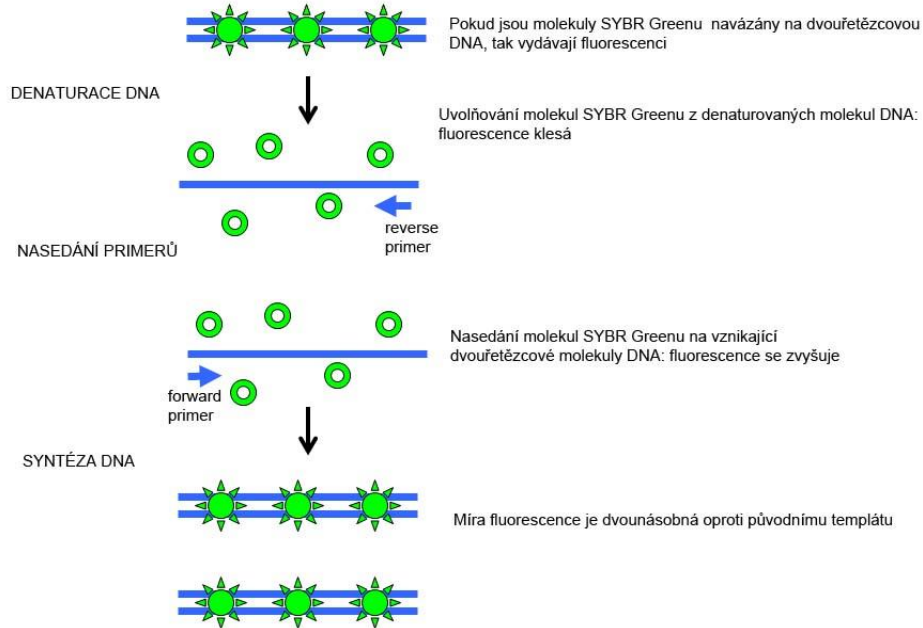
Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) v reálném čase (jinak označovaná jako real-time PCR) kombinuje princip klasické PCR a amplifikaci založené na principu fluorescence. Kvantitativní PCR je běžně aplikována pro zjišťování, identifikaci, kvantifikaci a genotypizaci mikroorganismů v diagnostice. Kvantitativní testy qPCR jsou široce využívány díky relativní a absolutní kvantifikaci umožňující genovou kvantifikaci a analýzu exprese genů. Metodou relativní kvantifikace se genová exprese jednoho vzorku porovnává s referenčním genem. Relativní kvantifikace je v praxi využívána častěji. V případě absolutní kvantifikace se hodnoty koncentrace vzorku odečítají z kalibrační křivky o známých koncentracích. Součástí přístroje je i software pro snadnější analýzu dat [57, 60].

Hlavní výhodou této techniky je vysoká citlivost, specifita široký rozsah dynamické kvantifikace a vznik cílového genového multiplexu. Dalšími výhodami je dostupnost vybavení, nízká technická obtížnost a jednoduché vyhodnocení. Současně má real-time PCR vysoký limit detekce (LoD = minimální detekovatelná koncentrace nukleové kyseliny) a mez kvantifikace neboli mez stanovitelnosti (LoQ = nejnižší množství analytu, které může být ještě stanoveno) [57].

Real-time PCR se liší od klasické PCR především v kontinuálním zaznamenávání množství DNA v průběhu každého cyklu. Detekce množství DNA je možná díky fluorescenčním sondám, které jsou přidávány do PCR směsi. Fluorescenční sondy se vážou na DNA. Vzniklá fluorescence je přímo úměrná koncentraci amplikonu ve vzorku. Na trhu existuje několik forem fluorescenčních sond [58].

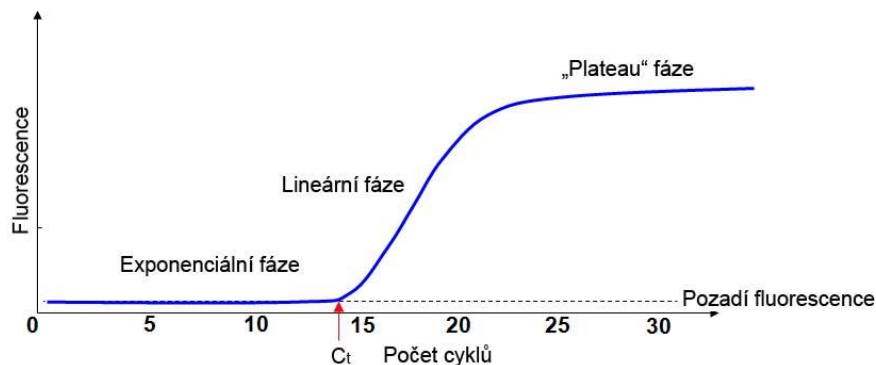
Nespecifickou metodou detekce vznikajícího PCR produktu je využití SYBRGreen barviva (SGI). Jedná se o monomerní cyaninové barvivo. Používá se k testování nukleových kyselin díky jeho vysoké afinitě k dsDNA. Pokud je SYBRGreen volně v roztoku, tak i přesto dochází k fluorescenci. V případě navázání sondy na dvouřetězcovou molekulu DNA dojde ke zvýšení fluorescenčního záření. Přesnost výsledků tak může být v některých případech zavádějící [58]. Během reakce tak dochází k opakujícímu poklesu a nárůstu fluorescence jako důsledek aktuálně probíhající fáze. Celý mechanismus fungování SYBRGreenu je znázorněn na obrázku č. 10.

Další fluorescenční sondy jsou Molecular Beacon sondy, TaqMan sondy, Scorpion sondy a FRET [54, 56]. Tyto typy sond zvyšují specifitu reakce, neboť specificky nasedají na cílový PCR produkt. Díky využití několika fluorescenčních značek v jedné reakci umožňují multiplexní detekci až 5 cílových sekvencí v jedné reakci. Což je další výhoda oproti detekci pomocí SYBRGreen [59].



Obrázek 10 Princip fluorescenčního značení pomocí SYBRGreenu, převzato a upraveno ze zdroje [56].

Kinetika PCR reakce (viz obr. č. 11) se rozděluje do čtyř fází. V 1. fázi je nízká koncentrace templátové DNA, a tudíž i nízká míra fluorescence, 2. fáze je exponenciální a množství DNA se v ideálním případě zvyšuje dle vzorce 2^n (n je pořadí cyklu), 3. fáze je lineární 2^{n+1} . Dochází ke strmému nárůstu fluorescence v závislosti na zvýšené koncentraci templátové DNA. Poslední fáze je také nazývána jako „plateau“ fáze. Kinetika reakce zpomaluje, detektor zaznamenává vysokou míru fluorescence, ta však nemusí odrážet reálné množství templátové DNA dodané do reakce. Proto není vhodné tuto fázi využívat ke kvantifikaci DNA. Na obr. č. 11 je znázorněna také hodnota C_t (Cycle of treshold), která reflektuje cyklus, během kterého fluorescence narůstá nad práh pozadí. Čím nižší je hodnota C_t , tím více do reakce templátové DNA vstoupilo [56, 60].



Obrázek 11 Kinetika PCR reakce, převzato a upraveno ze zdroje [56].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Inkubátor Environmental Shaker – Incubator ES-20/60 (Biosan)
Spektrofotometr Nano – MD PDA UV-VIS Bio Spectrophotometer (Scinco)
Nano kyvety Nano Stick-D (Scinco)
Autokláv UV Clave (Benchmark)
Vortex IKA Vortex 1 (Thermofisher)
Vortex Heidolph (Thermofisher)
Multi-Rotator PTR-35 Grant-bio (Biosan)
Inkubátor Roto-Therm Mini (Benchmark)
Odstředivka MiniSpin (Eppendorf)
Inkubátor INCU-line (VWR)
Real-Time PCR Cycler Rotor-Gene 3000 (Corbett Research)
Mikrovlákná trouba LG
Notebook Hp ProBook 590
Stolní počítač Dell OptiPlex 780

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie potřebné k izolaci DNA

Ethanol 96% P.a. (Lach-ner)
Ethanol 75% P.a.
PCI (trichlormethan-fenol-isomaylalkohol 50 : 50 : 1 Hm %), od firmy Carl Roth
Octan sodný 3 M, pH 5,2
Sterilní voda
Extrakční roztok: směs A+B 1:1
Roztok A: 0,2 M NaCl, 20 mM EDTA, 10% SDS
Roztok B: 100 mM TRIS-HCl, pH 7,5

2.2.2 Chemikálie potřebné k přípravě PP sklíček

Savo
Ethanol 96%

2.2.3 Agary a tekuté půdy

LB médium – Luria-Bertani (Duchefa Biochemie) – trypton, chlorid sodný, kvasničný extrakt, pH 7,2

Kultivační půda YPD – (Yeast Extract-Peptone-Dextrose medium, Serva) – kvasničný extrakt, pepton, dextróza, agar, pH 6,5- 7,5

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

2.2.4 Používané kmeny

Kmeny *Candida albicans*

SC5314 – kontrolní kmen

Δcdr1, *Δhap5*, *Δhap43*, *Δrhb1* – poskytl profesor Chung-Yu Lan z National Tsing Hua z Univerzity na Tchaj-wanu

Kmen *Pseudomonas aeruginosa* – CCM1960 – poskytl Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně

Kmen *Candida guilliermondii* – poskytl Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně

2.2.5 PCR komponenty

EliZyme qPCR mix (Elisabeth Pharmacon)

PCR voda

Primery pro *P.aeruginosa*

OPR1 5 μM, sekvence 5'-GCTCTGGCTCTGGCTGCT-3'

OPR2 5 μM, sekvence 5'- AGGGCACGCTCGTTAGCC-3'

Primery pro *C.albicans*

CA3F 5 μM, sekvence 5'-TGGCTTAGGGGTTGAATGTC-3'

CA3R 5 μM, sekvence 5'- CCATCGATTTGAATGGCTCT-3'

Primery pro *C.guilliermondii*

CGR 5 μM, sekvence 5'-TACACGCGGATTACATTGGA-3'

CGF 5 μM, sekvence 5'-CGGCTTCCAAAGAGTAGTCG-3'

2.3 Ostatní materiály

Polystyrénová sklíčka

Automatické pipety o objemu 10, 20, 100, 1000 μ l (Eppendorf)

Kahan

Parafín

Skleněné korálky 425-600 μ m (Sigma-Aldrich)

Stojánek na mikrozkušavky

Párátka, bakteriologická klička

Plastový materiál na jedno použití: pipetovací špičky, mikrozkušavky, mikrotitrační destičky, rukavice, PCR zkušavky, kónické zkušavky PP s víčkem (25 a 50 ml)

2.4 Pracovní postup

Pracovní postup přípravy a analýza vzorků byl následující:

2.4.1 Příprava kultivačních médií

Pro přípravu médií bylo použito předem vypočtené a navážené množství média v prášku. Následně bylo médium rozpuštěno v destilované vodě o objemu 100 ml.

Médium LB odpovídá koncentraci 20 g/l.

Médium YPD odpovídá koncentraci 50 g/l.

Médium YNB odpovídá koncentraci 20 g/l.

2.4.2 Příprava polymerních materiálů

Polystyrénové destičky byly připraveny následujícím způsobem:

Z polystyrénové fólie byly připraveny jednotlivé obdélníky o velikosti 5x10 mm. Destičky poté byly omyty Savem a ethanolem, následně byly vysušeny ve flowboxu pod UV světlem po dobu 30 minut. Takto připravené destičky byly vloženy do zkušavky se šroubovacím uzávěrem a uchovány k dalšímu použití.

Polyethylenové mikrozkušavky, používané jako materiál k růstu biofilmu, byly již od výrobce sterilizovány. Před samotným použitím byly Savem znovu sterilizovány ve flowboxu pod UV světlem po dobu 30 minut a uchovány v uzavíratelné nádobě.

2.4.3 Kultivace mikroorganismů

Ze zásobních vzorků sledovaných mikroorganismů byly na Petriho misky s pevným médiem YPD (Yeast Extract Peptide Dextrose) naočkovány kmeny *C. albicans* s druhovými zástupci SC5314, *Δcdr1*, *Δhap5*, *Δhap43*, *Δrhb1* a *C. guilliermondii* metodou roztěru. Na pevné médium LB (Lauria-Bertani) byl naočkován vzorek *P. aeruginosa* s označením CCM metodou roztěru.

Takto připravené plotny se vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Po uplynutí inkubace byly vzorky mikroorganismů *C. albicans* a *C. parapsilosis* přeneseny do tekutého média YNB-Glu (Yeast Nitrogen Base, pH 5) a *P. aeruginosa* do tekutého média LB. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 24 h za neustálého třepání 110 RPM. Po ukončení inkubace byly vzorky zhomogenizovány a z důvodu reprodukovatelnosti experimentu byla u všech vzorků změřena optická denzita při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Inokulum *C. albicans* by mělo mít hodnotu $OD_{600} = 1,5$ a *P. aeruginosa* 0,5. Takto byly vzorky připraveny k dalšímu použití.

2.4.3.1 Příprava směsných kokultur

Po přepočítání hodnot OD_{600} bylo do jednorázových zkumavek odměřeno 25 ml média YNB-Glu pH 5. Následně byly přidány jednotlivé vzorky o vypočítaném množství jednoho kmene *C. albicans* a jednoho kmene *P. aeruginosa*. Tato připravená směsná kultura se ponechala inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin v rotační třepačce.

2.4.4 Inkubace polymerních materiálů se směsnými kulturami

Po inkubaci na spektrometru bylo postupně změřeno OD všech kokultur při vlnové délce 600 nm. Do připravených a označených eppendorfek byly vloženy 3 ks sterilních PS fólií. Poté byl k fóliím přidán 1 ml kokultury. Naočkované eppendorfky se kultivovaly 24 h při 37 °C v rotační třepačce s otáčecím módem 15 RPM.

Po kultivaci bylo zapotřebí odstranit planktonní buňky tak, aby byla vyizolovaná DNA pouze z přisedlých buněk v biofilmu. Postup promytí byl tedy následující: PS fólie byly 3x promyty ponořením do sterilní vody a vloženy do nových mikrozkuavek, což umožňovalo souběžně izolovat DNA i z vnitřního povrchu původních mikrozkuavek. Mikrozkuavky, ve kterých proběhla inkubace, byly 3x promyty 1 ml sterilní vody. Takto připravený materiál byl využit k následné izolaci DNA buněk.

2.4.5 Izolace DNA

Prvním krokem samotné izolace DNA biofilmu byla fenol-chloroformová extrakce. Všechny mikrozkušavky byly označeny a bylo do nich přidáno 500 µl pufru pro extrakci DNA a 2 lžičky skleněných kuliček. Dále se na 5 minut všechny mikrozkušavky vložily do vortexu. Následovalo odstranění PS fólií z mikrozkušavek a bylo přidáno 600 µl PCI a opět proběhlo vortexování další 1 minutu. Po uplynulém čase došlo k odstředění na 5 minut při RPM 3000. Díky tomu vznikly dvě fáze: spodní organická s buněčnými kompartmenty a horní vodní fáze s uvolněnou DNA. Mezi těmito dvěma fázemi se nacházela i mezifáze s proteiny. Pro tuto analýzu byla důležitá zejména vodná fáze s DNA. Následovalo tak přenesení této vodné fáze do nové mikrozkušavky. Opět bylo přidáno 600 µl PCI, následovalo vortexování 1 minutu, odstředění 5 minut při RPM 3000 a přenesení horní vodné fáze do čisté mikrozkušavky. K vodné fázi byl přidán 0,1 díl (30 µl) 3 M CH₃COONa pH 5,2 a 2,5 dílu 95% EtOH (1 ml). Roztoky v mikrozkušavkách byly promíchány a ponechány 1 hodinu v mrazáku se srážet. Po srážení byly mikrozkušavky opět stočeny při RPM 3000 na 5 minut. Díky tomuto kroku čistá DNA pevně přilnula ke stěně mikrozkušavky a vzniklý supernatant tak mohl být vyhozen. Přilnutá DNA neboli peleta byla opláchnuta pomocí 400 µl 75% EtOH. Následně byly mikrozkušavky vloženy do termostatu cca na 5 minut dnem vzhůru, dokud nedošlo k vysušení stěn mikrozkušavek. Peleta byla rozpuštěna ve sterilní vodě v objemu 10-30 µl, podle velikosti pelety. Pro ověření byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru při vlnové délce 260/280 nm. Takto připravený roztok DNA byl použit ke stanovení koncentrace na real-time PCR.

2.4.6 Kvantifikace vyizolované DNA pomocí real-time PCR

2.4.6.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivace mikroorganismů, použitých jako standardy pro vytvoření kalibrační křivky, byla zpracována stejným postupem jako kultivace mikroorganismů vedených jako vzorky. Jako standardy byly použity čisté kmeny *C. albicans* SC5314, *C. guilliermondii* a *P. aeruginosa* CCM.

2.4.6.2 Izolace DNA

K izolaci byla opět použita fenol-chloroformová extrakce pro uvolnění DNA z buněk. Tekutá kultura daného mikroorganismu byla centrifugována 2 minuty při 3000 RPM, supernatant se odstraní a k peletě se přidá 500 µl vody. Peleta se ve vodě rozpustí a přenesla se do mikrozkušavky. Poté se opět centrifugovala 2 minuty při 3000 RPM, supernatant

se odstraní a peleta byla připravena k izolaci. Další postup izolace DNA je popsán v kapitole 2.4.5. Izolace DNA. Vyizolovaná DNA byla naředěna tak, aby se pokryla měřitelná oblast vzorků a byla připravena pro stanovení kalibrační křivky pomocí real-time PCR. Real-time PCR vyizolované DNA

Nejprve byl připraven mastermix. Byl použit kit EliZyme™ Green MIX AddROX od firmy Elisabeth Pharmacon. Na jednu PCR reakci bylo potřeba 20 µl mastermixu. Mastermix obsahoval 10 µl 2xEliZyme™ qPCR Mix, 0,8 µl forward primer (10 µM), 0,8 µl reverse primer (10 µM), 1 µl templátové DNA a PCR a vodu tak, aby výsledný objem byl 20 µl.

Tabulka 1 Profil real-time PCR pro *C. albicans*.

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Iniciace denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	5 sec	40
Anneling/Extenze	60 °C	30 sec	40
Melt curve analysis	70-90 °C		
Chlazení	45 °C	1 min	

Tabulka 2 Profil real-time PCR pro *P. aeruginosa*.

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Iniciace denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	5 sec	40
Anneling/Extenze	61 °C	30 sec	40
Melt curve analysis	70-90 °C		
Chlazení	45 °C	1 min	

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této kapitole budou postupně prezentovány a diskutovány výsledky naměřených koncentrací DNA vzorků. Členění odpovídá chronologickému postupu práce.

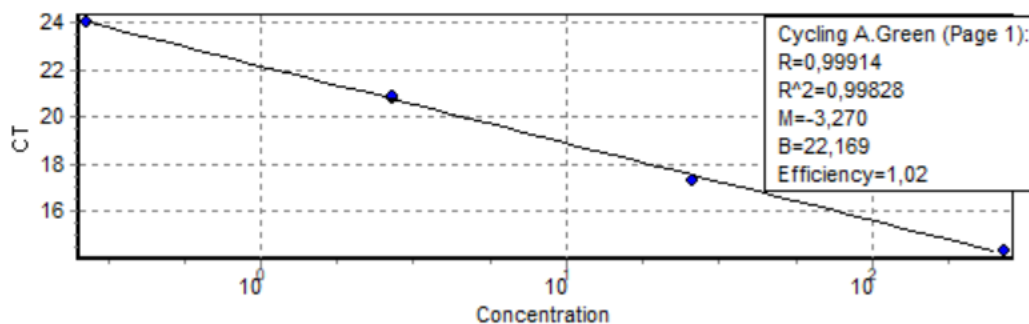
3.1 Kalibrační řady DNA pro jednotlivé sledované mikroorganismy

Před samotným stanovením byla vytvořena kalibrační křivka pro jednotlivé druhy mikroorganismů. K tomuto kroku byla vyizolovaná použitá DNA z čistých kultur *P. aeruginosa*, *C. albicans* a *C. guilliermondii*. Vzorky čistých kultur byly kultivovány a izolovány za identických podmínek jako vzorky vlastního měření. Bylo provedeno ředění jednotlivých vzorků tak, aby lineární rozsah pokryl měřitelnou oblast vzorků.

Kalibrace je vyjádřením závislosti signálu na koncentraci, zde se jedná o hodnotu Ct (Cycle of treshold). Hodnoty uvedené v jednotlivých tabulkách jsou převzaty společně s grafy z vyhodnocovacího programu qPCR (Rotor-Gene Q Series).

Tabulka 3 Hodnoty kalibrační řady pro *C. albicans*.

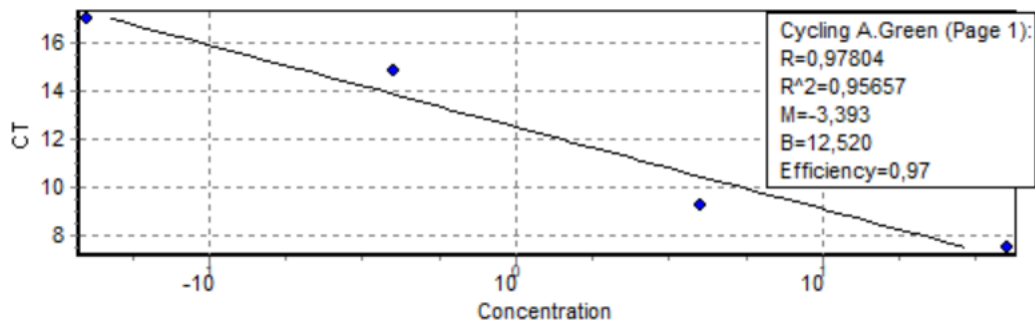
ředění	Ct hodnota	c(ng/μl)
1x	14,34	247,6030
10x	17,31	24,7600
100x	20,90	2,4760
1000x	24,02	0,2476



Obrázek 12 Kalibrační křivka čistých kultur *C. albicans*. Na ose x je hodnota koncentrace vynesena v logaritmické škále, na ose y se nachází hodnoty Ct. Modré body vyznačují jednotlivé body kalibrace a jsou propojeny křivkou lineární regrese.

Tabulka 4 Hodnoty kalibrační řady pro *P. aeruginosa*.

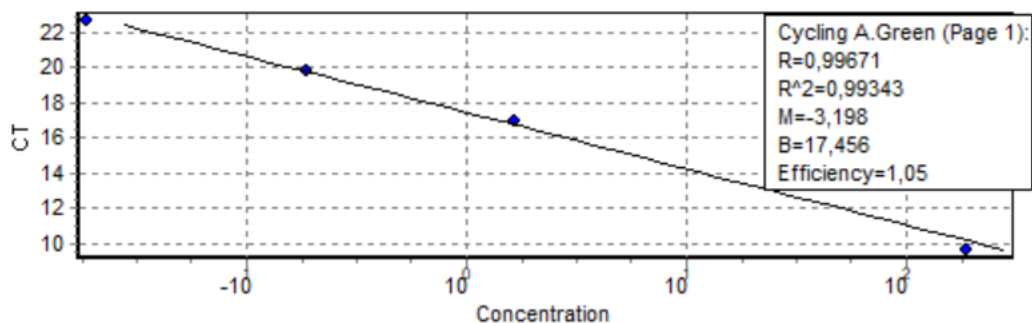
ředění	Ct hodnota	c(ng/μl)
100x	7,54	29,3300
1000x	9,30	2,9330
10000x	14,85	0,2930
100000x	17,00	0,0293



Obrázek 13 Kalibrační křivka čisté kultury *P. aeruginosa*. Na ose x je hodnota koncentrace vynesena v logaritmické škále, na ose y se nachází hodnoty Ct. Modré body vyznačují jednotlivé body kalibrace a jsou propojeny křivkou lineární regrese.

Tabulka 5 Hodnoty kalibrační řady pro *C. guilliermondii*.

ředění	Ct hodnota	c(ng/μl)
0,001x	9,64	277,9900
0,1x	13,32	27,7990
1x	16,99	2,7990
10x	19,87	0,2799
100x	22,68	0,0279



Obrázek 14 Kalibrační křivka čisté kultury *C. guilliermondii*. Na ose x je hodnota koncentrace vynesena v logaritmické škále, na ose y se nachází hodnoty Ct. Modré body vyznačují jednotlivé body kalibrace a jsou propojeny křivkou lineární regrese.

3.2 Optická hustota čistých a směsných kultur

K určení počtu buněk v suspenzi byla stanovena optická hustota (OD) pomocí spektrofotometrického měření. Byla měřena absorbance jednotlivých mikroorganismů v tekutém kultivačním médiu. Jako blank bylo použito čisté kultivační médium. Všechny vzorky byly měřeny při vlnové délce 600 nm.

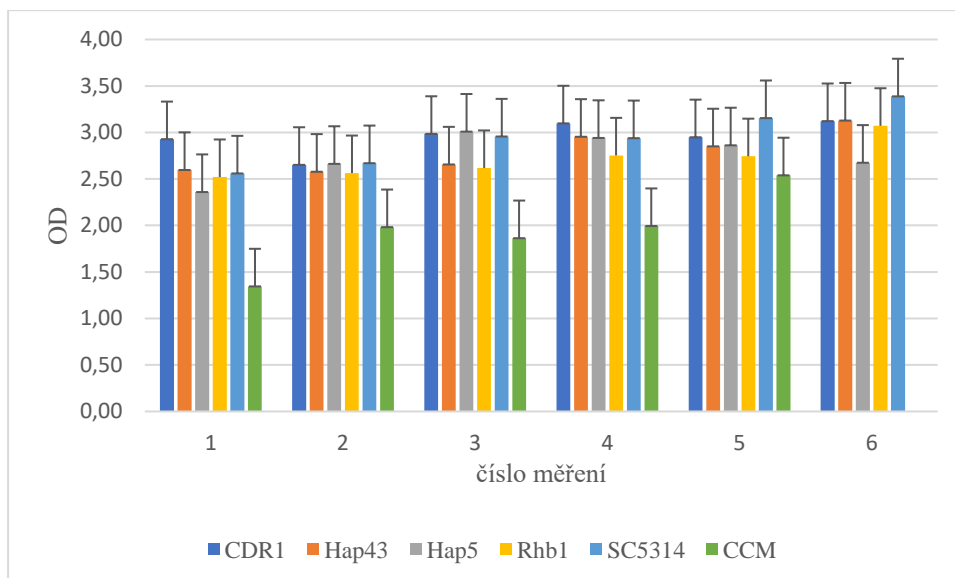
$$OD = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Obrázek 15 Výpočet optické hustoty (OD) pomocí dekadického logaritmu v závislosti na transmitaci (T), převzato a upraveno z [61].

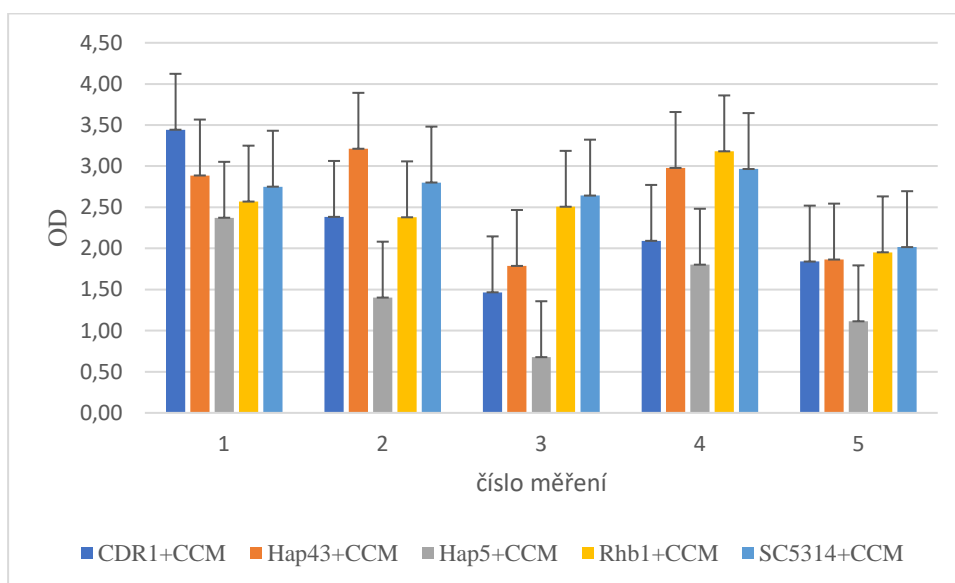
Tabulka 6 Tabulka prezentuje naměřené hodnoty optické hustoty pro čisté a směsné kultury. Bylo provedeno 5-6 měření. Všechny vzorky byly měřeny při vlnové délce 600 nm. Zkratka NEG v tabulce znamená negativní vzorek a zkratka CCM je pracovní zkratkou pro *P. aeruginosa*.

	Název	Optická hustota (600 nm)					
čistá kultura	<i>Δcdr1</i>	2,93	2,65	2,98	3,10	2,95	3,12
	<i>Δrhb1</i>	2,52	2,56	2,62	2,75	2,74	3,07
	<i>Δhap5</i>	2,36	2,66	3,01	2,94	2,86	2,67
	<i>Δhap43</i>	2,60	2,58	2,66	2,95	2,85	3,13
	SC5314	2,56	2,67	2,96	2,94	3,15	3,39
	CCM	1,34	1,98	1,86	1,99	2,54	NEG
	<i>C.guilliermondii.(C.g.)</i>	2,08	2,70	2,61			
	CCM	0,18	2,40	2,50			
směsná kultura	<i>Δcdr1</i> +CCM	3,44	2,38	1,47	2,09	1,84	
	<i>Δrhb1</i> +CCM	2,57	2,38	2,51	3,18	1,95	
	<i>Δhap5</i> +CCM	2,37	1,40	0,68	1,80	1,11	
	<i>Δhap43</i> +CCM	2,89	3,21	1,79	2,98	1,86	
	SC5314+CCM	2,75	2,80	2,64	2,97	2,02	
	<i>C.g.</i> +CCM	1,27	1,28	1,79	0,94	NEG	

Z hodnot uvedených tabulce byly vytvořeny následující grafy. Z naměřených hodnot je patrné, že všechny mutantní kmeny *C. albicans* a *C. guilliermondii* vykazovaly přibližně stejnou optickou hustotu v čistých kulturách. OD čisté kultury *P. aeruginosa* je snižená. Ve směsných kulturách se OD kokultur od čistých kultur zásadně lišila. Vyskytují se zde pouze menší odchylky, které pokazují na nižší OD kokultur, např. OD kokultury *C. guilliermondii* a *P. aeruginosa* je nižší ve všech měřeních.



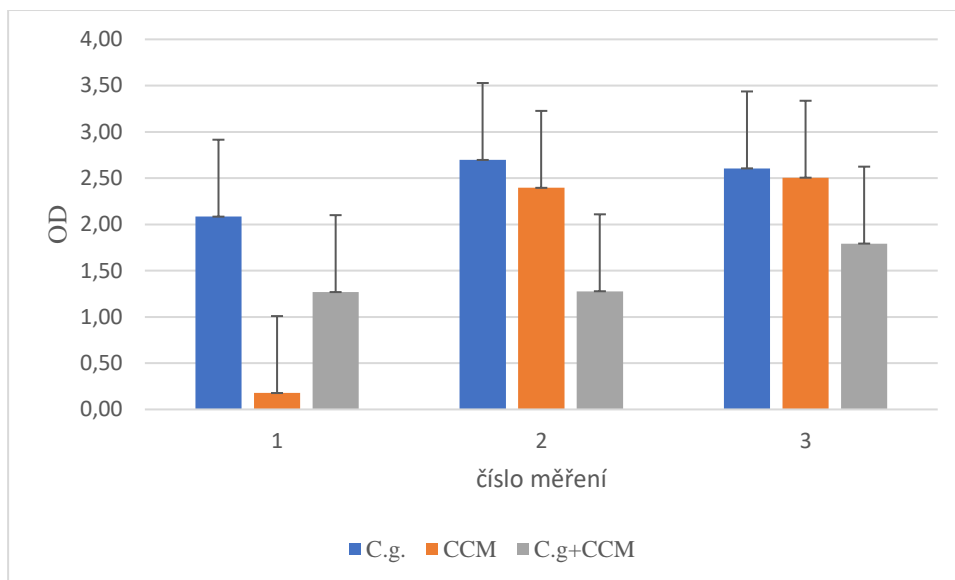
Obrázek 16 Naměřená optická hustota čistých kultur. Graf pro přehlednost obsahuje pouze hodnoty *C. albicans* a *P. aeruginosa*. Na ose x se nachází číslo měření a na ose y optická hustota (OD). U obou mikroorganismů bylo provedeno šest měření, přičemž poslední měření *P. aeruginosa* vyšlo negativní. Kultury byly inkubované po dobu 24 h.



Obrázek 17 Naměřená optická hustota směsných kultur. Graf pro přehlednost obsahuje pouze hodnoty *C. albicans* a *P. aeruginosa*. Na ose x se nachází číslo měření a na ose y optická hustota (OD). Pro směsné kultury bylo provedeno pět měření. Kultury byly inkubované po dobu 24 h.

Z grafu obr. 16 je patrné, že OD čistých kultur se nikterak zásadně neliší, mimo *P. aeruginosa*, jejíž OD je nižší. Obr. 17 vykazuje již nižší hodnoty OD pro směsné kultury. Nejnižší OD má kokultura $\Delta hap5+CCM$ (vyznačena šedě). I když všechny inkubace probíhaly

za stejných podmínek, je na grafu vidět rozdílný nárůst kolonií v jednotlivých měření. V měření 1 je vysoký nárůst všech kokultur oproti měření 5, ve kterém je nárůst všech kokultur nejnižší.



Obrázek 18 Graf vyjadřuje optickou hustoty čistých kultur *C. guilliermondii*, *P. aeruginosa* (CCM) a současně optickou hustotu směsné kultury (*C. g.* +CCM). Na ose x se nachází číslo měření a na ose y optická hustota (OD). Pro čisté i směsné kultury byly provedeny tři měření.

Měření 1 vykazuje nižší hodnoty vůči dalším dvěma měřením, současně ale kokultura *C. g.* + CCM má ve všech třech měřeních přibližně stejné OD. Co se týče čistých kultur, tak v měření 2 a 3 se jejich OD pohybuje okolo hodnoty 2,50.

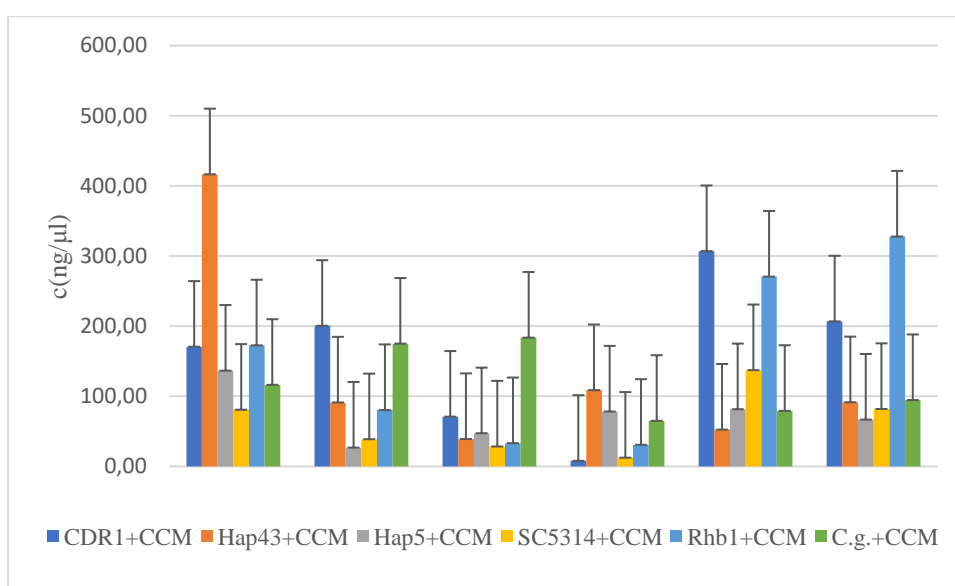
3.3 Koncentrace DNA kokultur měřená na spektrofotometru

Po izolaci DNA vzorků byla orientačně změřena koncentrace vyizolované dsDNA u jednotlivých mikroorganismů. Koncentrace byla naměřena na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm. V tabulce č. 7 jsou zaznamenány koncentrace směsných biofilmů kultivovaných na polyethylenu. V tabulce č. 8 jsou sepsány koncentrace směsného biofilmu rostoucím na polystyrenu. Z naměřených koncentrací jsou vyneseny grafy. Hodnoty dat se podstatně liší jednak vzájemně mezi jednotlivými kokulturami, tak ale i mezi jednotlivými měřeními. Vyizolované množství DNA zásadně ovlivnila kultivace vzorků. Z grafů je patrné, že vyšší koncentrace všech kokultur je na polyethylenu oproti polystyrenu. Současně ze všech kmenů *C. albicans* nejstabilnější růst na PE i PS má $\Delta cdr1$ (vyznačena tmavě modře). Relativně stabilní koncentraci vykazuje i *C. guilliermondii*. Zároveň o něco vyšší koncentrace kokultury byla

naměřena na polystyrenu. Naopak nejnižší koncentraci na PE vykazují kokultury *Δhap5*+CCM a zároveň její koncentrace na PS je proměnlivá.

Tabulka 7 Naměřená koncentrace izolátu DNA z biofilmů kokultur na pěstovaných materiálu z polyethylenu.

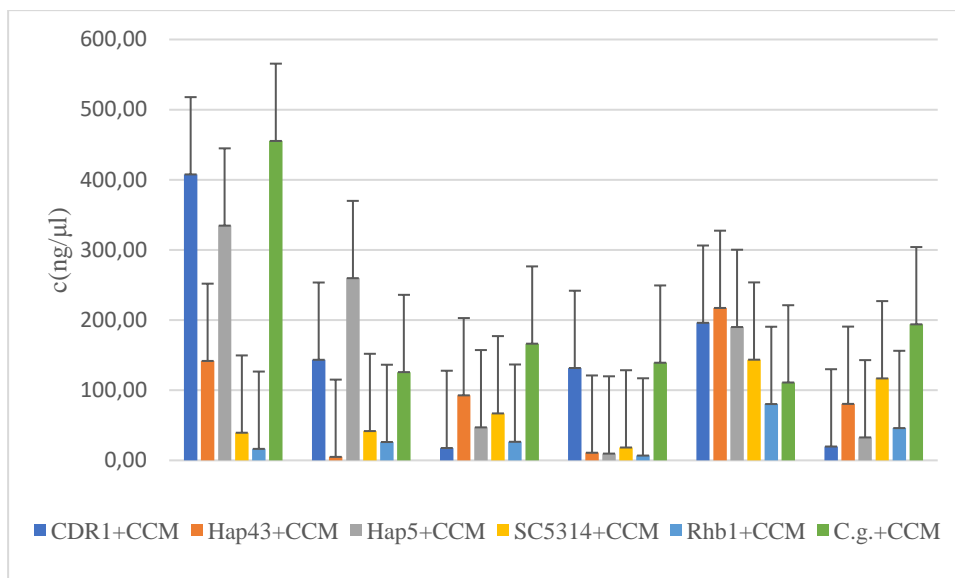
Naměřená koncentrace (ng/μl)						
CDR1+CCM	Hap43+CCM	Hap5+CCM	SC5314+CCM	Rhb1+CCM	C.g.+CCM	
170,62	416,43	136,53	80,81	172,58	116,30	
200,44	91,19	26,82	38,72	80,39	175,02	
70,96	39,07	47,29	28,42	33,13	183,60	
8,00	108,74	78,28	12,44	30,88	65,01	
306,96	52,47	81,55	137,25	270,61	79,19	
206,74	91,51	66,75	81,89	327,78	94,65	



Obrázek 19 Graf znázorňující naměřené hodnoty koncentrace jednotlivých kokultur kultivovaných na polyethylenu (PE). Na ose x jsou vyneseny kokultury v jednotlivých měření a na ose y je vynesena koncentrace kokultur kultivovaných PE.

Tabulka 8 Naměřená koncentrace izolátu DNA z biofilmů kokultur na pěstovaných materiálu z polystyrenu.

Naměřená koncentrace (ng/μl)						
CDR1+CCM	Hap43+CCM	Hap5+CCM	SC5314+CCM	Rhb1+CCM	C.g.+CCM	
407,63	141,74	334,61	39,41	16,41	455,35	
143,36	4,93	259,73	41,74	26,17	125,81	
17,59	92,66	47,05	66,94	26,48	166,35	
131,64	10,86	9,65	18,31	6,84	139,18	
196,12	217,26	190,09	143,52	80,29	111,01	
19,75	80,51	32,72	116,84	46,01	193,9	



Obrázek 20 Graf znázorňující naměřené hodnoty koncentrace jednotlivých kokultur kultivovaných na polystyrenu (PS). Na ose x jsou vyneseny kokultury v jednotlivých měření a na ose y je vynesena koncentrace kokultur kultivovaných na PS.

3.4 Prezentace dat z real-time PCR

Pomocí real-time PCR byla změřena koncentrace vyizolované dsDNA všech vzorků. Všechny vzorky byly kultivovány za stejných podmínek v polymikrobiálním biofilmu na dvou typech polymeru (polyethylen a polystyren). Koncentrace DNA byla měřena postupně pro jednotlivé mikroorganismy. Vzorky byly připraveny a měřeny v párech za účelem lepšího porovnání výsledků mezi sebou. Koncentrace DNA byla měřena postupně pro jednotlivé mikroorganismy. Uvedené hodnoty koncentrací v tabulkách (viz níže) jsou pro kokultury kultivované na dvou typech polymeru. V příloze na obrázku P7 je jako příklad vložena real-time PCR křivka zobrazující analýzu kokultury *C. albicans*.

Všechna data byla vyhodnocena jsou a prezentována v následujících tabulkách.

Tabulka 2 Naměřené hodnoty koncentrace izolátu DNA *C. albicans* v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS). Jednotlivé mutantní kmeny *C. albicans* byly kultivovány společně s *P. aeruginosa*. Bylo provedeno pět měření a následně byl spočítán medián.

	Název	Hodnoty koncentrace c (ng/μl) v pěti měřeních					Medián
		Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	
PE	CDR1	5,699	0,268	0,056	14,770	9,761	5,699
	Rhb1	-	6,407	5,548	7,258	2,525	5,978
	Hap5	-	1,540	0,074	1,404	1,242	1,323
	Hap43	-	4,581	0,161	3,654	9,637	4,118
	SC5314	7,868	3,722	0,908	1,000	8,995	3,722
PS	CDR1	-	0,806	0,075	5,595	0,401	0,604
	Rhb1	18,300	8,320	0,451	28,852	2,536	8,320
	Hap5	51,367	0,595	0,047	4,643	0,246	0,595
	Hap43	21,023	15,984	1,649	2,213	1,204	2,213
	SC5314	9,453	1,306	1,048	9,182	9,044	9,044

Tabulka 10 Naměřené hodnoty koncentrace DNA *P. aeruginosa* v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS). Jednotlivé mutantní kmeny *P. aeruginosa* byly kultivovány společně s *C. albicans*. Bylo provedeno pět měření a následně byl spočítán medián.

	Název	Hodnoty koncentrace c (ng/μl) v párech					Medián
		Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	
PE	CDR1	0,0188	0,0098	0,0569	0,0872	0,0847	0,0569
	Rhb1	0,0191	0,0060	0,0306	0,0321	0,1719	0,0306
	Hap5	0,0236	0,0170	0,0756	0,0658	0,7973	0,0658
	Hap43	0,0249	0,0027	0,0537	0,0260	0,0702	0,0260
	SC5314	0,0198	0,0061	0,0206	0,0520	0,1735	0,0206
PS	CDR1	0,0166	0,0009	0,0381	0,0221	0,1616	0,0221
	Rhb1	0,1153	0,0017	0,0266	0,0264	0,0785	0,0266
	Hap5	0,0205	0,0011	0,0575	0,0456	0,0861	0,0456
	Hap43	0,0169	0,0008	0,0272	0,0416	0,2033	0,0272
	SC5314	0,0103	0,0004	0,0223	0,0220	0,0933	0,0220

Tabulka 11 Naměřené hodnoty koncentrace DNA *C. guilliermondii* v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS). Jednotlivé mutantní kmeny *C. guilliermondii* byly kultivovány společně s *P. aeruginosa*. Bylo provedeno pět měření a následně byl spočítán medián.

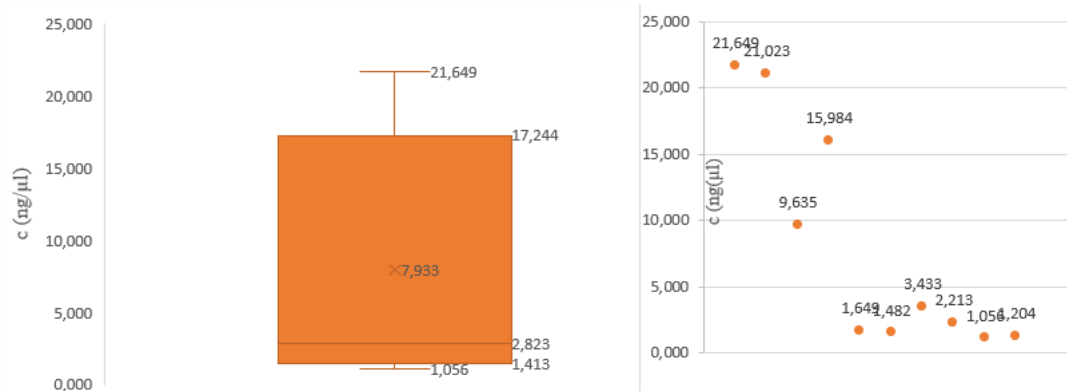
Název	Hodnoty koncentrace c (ng/μl) v párech					Medián
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	
PS	80,545	216,124	758,603	163,254	0,044	163,254
	7,781	1,109	2,128	4,405	0,041	2,128
PE	255,401	300,743	461,802	417,181	428,251	417,181
	32,892	33,104	46,837	59,155	10,550	33,104

Tabulka 12 Naměřené hodnoty koncentrace DNA *P. aeruginosa* v biofilmu kultivovaném na polyethylenu (PE) a polystyrenu (PS). Jednotlivé mutantní kmeny *P. aeruginosa* byly kultivovány společně s *C. guilliermondii*. Bylo provedeno pět měření a následně byl spočítán medián.

Název	Hodnoty koncentrace c (ng/μl) v párech					Medián
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	
PS	0,000	0,000	0,000	0,753	0,679	0,000
	0,568	0,571	0,530	0,542	0,453	0,542
PE	0,000	0,000	0,000	93,583	31,970	0,000
	0,532	0,293	0,272	0,548	15,270	0,532

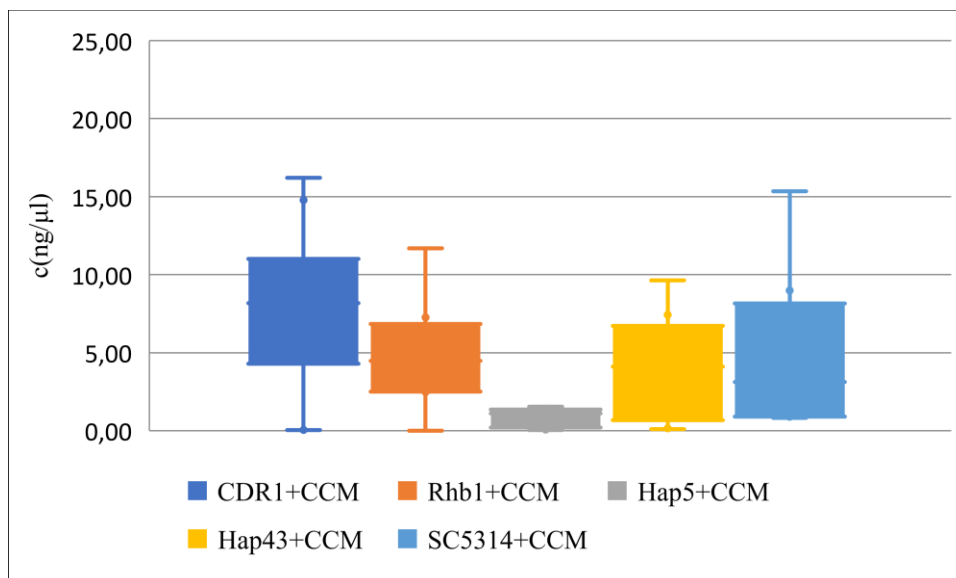
3.4.1 Vyhodnocení stanovení DNA pomocí q-PCR

Z výchozích dat (uvedené v tabulkách 9-12) byly vytvořeny grafy pro jednotlivé vzorky kultivované v polymikrobiálním biofilmu. Krabicové grafy jsou jednoduchým zobrazením dat dle toho, jak jsou rozloženy a v jakém rozsahu se pohybovaly naměřené hodnoty. Vztah mezi hodnotami a krabicovým boxem nejlépe demonstruje obrázek 21. Všechna data v této podkapitole jsou prezentována stejným způsobem.

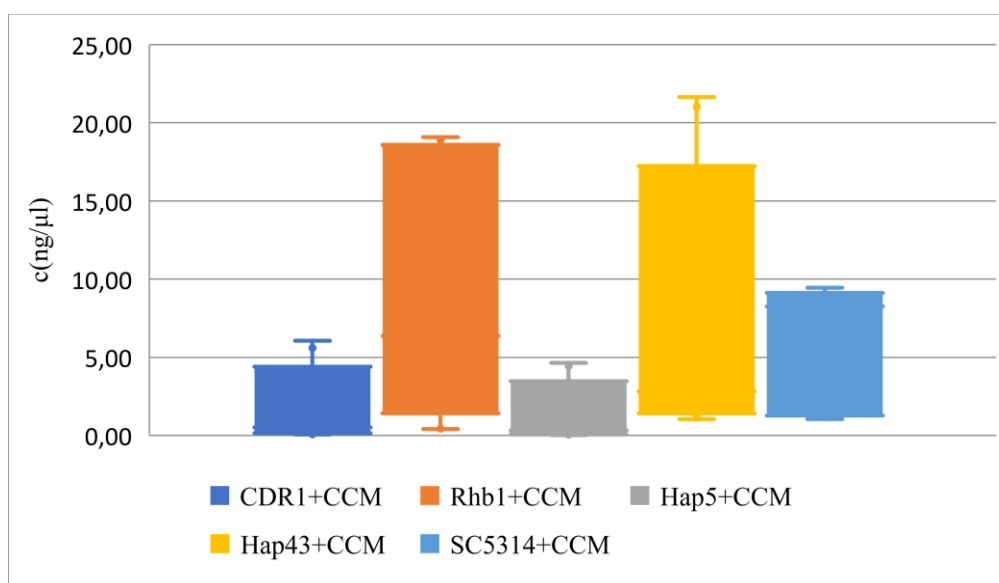


Obrázek 21 Tato dvojice grafů zobrazuje výsledky měření na $\Delta hap43$ +CCM na PS. Pro zjednodušení zobrazení mých dat jsem použila krabicové grafy, které zobrazují rozložení hodnot a směrodatnou odchylku. Pro upřesnění je uveden i bodový graf ve stejném měřítku, který slouží jako ilustrace pro to, jak dané krabicové grafy interpretovat.

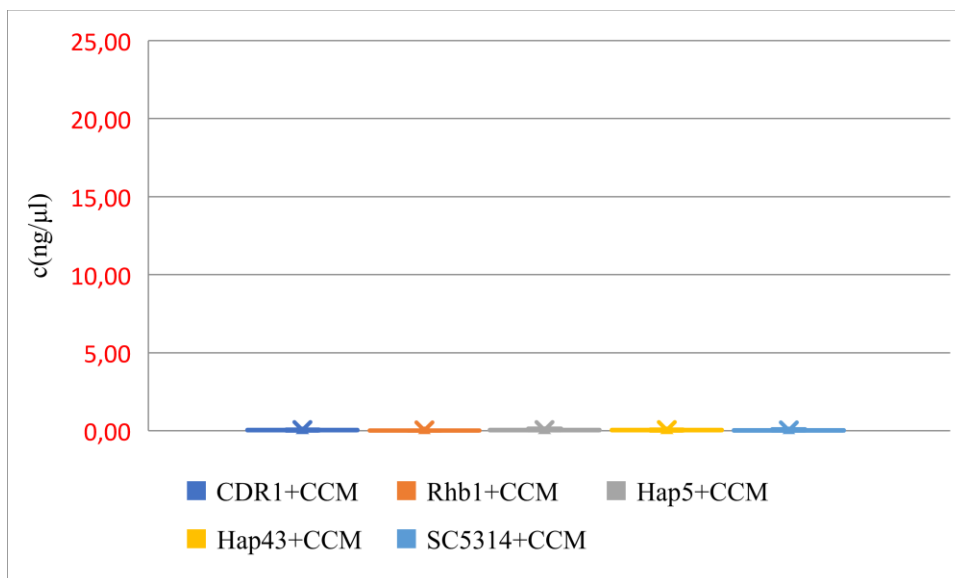
C. albicans má celkově vyšší nárůst vůči *P. aeruginosa*. Medián koncentrací pro *C. albicans* se pohybuje v širokém rozpětí 0,50-8,52 ng/μl v závislosti na kultuře a typu adhezního materiálu. Zatímco rozmezí mediánu koncentrací *P. aeruginosa* je výrazně menší, a to 0,02-0,05 ng/μl. Obecně se dá říci, že biofilm jako takový více rostl na polyethylenu než na polystyrenu. Toto tvrzení není však jednoznačné pro všechny typy kokultur. Z příložených grafů pro *C. albicans* je patrné, že na polyethylenu i polystyrenu nejméně rostl mutantní kmen $\Delta hap5$. Zatímco kmeny $\Delta cdr1$ a SC5314 měly vyšší nárůst na polyethylenu a kmeny $\Delta hap43$ a $\Delta rhb1$ podstatně více rostly na polystyrenu. Na grafech s *P. aeruginosa* byl zaznamenán větší růst $\Delta cdr1$, $\Delta hap5$, $\Delta hap43$ a SC5314 na polyethylenu, naopak $\Delta rhb1$ jako jediná měla zvýšenou koncentraci na polystyrenu. Polymery PS a PE se vyskytovaly současně v jednom roztoku se směsným inokulem a z tohoto důvodu volné buňky měly možnost zvolit si pro adhezi jeden nebo druhý typ polymeru. Na grafu je tak vidět, že pokud více buněk vytvořilo biofilm na PE, koncentrace na PS je snížena a naopak. Stejný jev je pozorovatelný i v případě *C. guilliermondii* a *P. aeruginosa*.



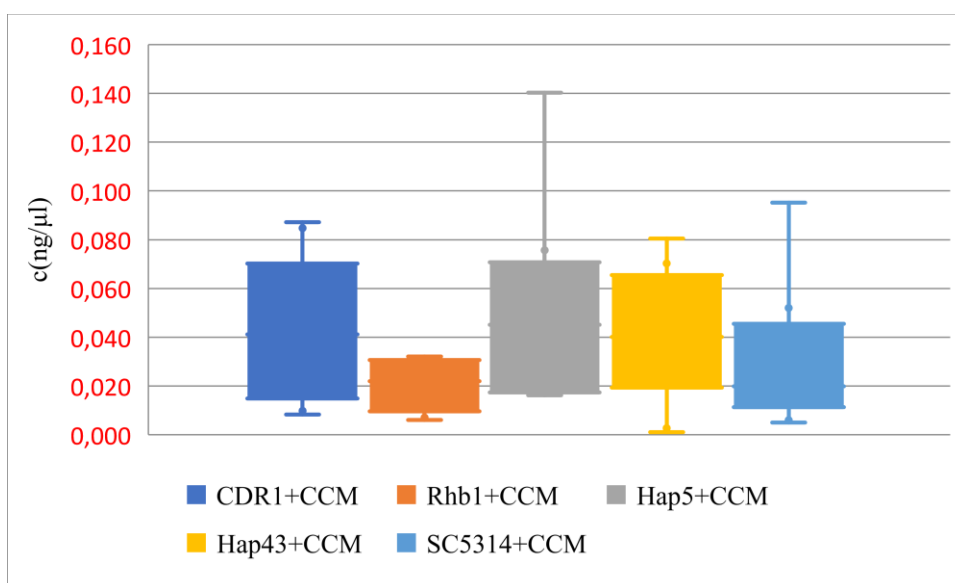
Obrázek 22 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA všech mutantních kmenů *C. albicans* a kontrolního kmene (SC5314) kultivovaných v biofilmu s *P. aeruginosa* (CCM) na polyethylenu. Barevně vyznačené výšeče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů.



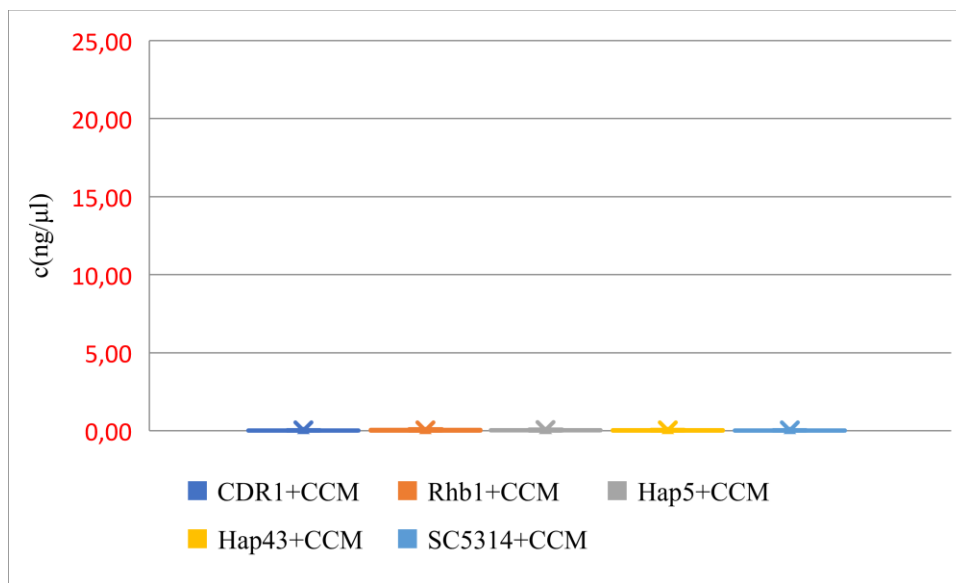
Obrázek 23 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA všech mutantních kmenů a kontrolního kmene (SC5314) *C. albicans* kultivovaných v biofilmu s *P. aeruginosa* (CCM) na polystyrenu. Barevně vyznačené výšeče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů.



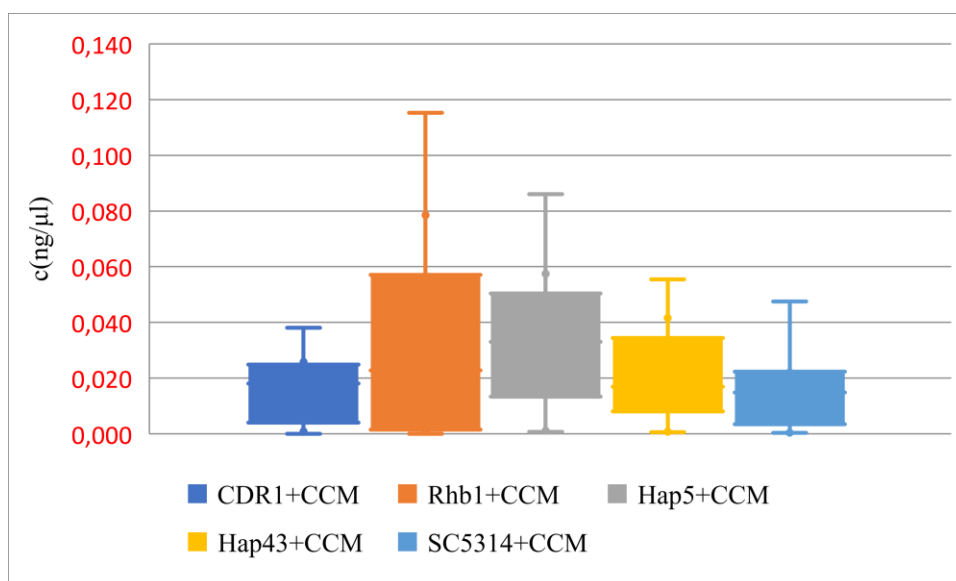
Obrázek 24 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA *P. aeruginosa* kultivovaných v biofilmu mutantními kmeny *C. albicans* a kontrolním kmenem (SC5314) na polyethylenu. Barevně vyznačené výšeče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů. **Měřítka osy x je zde výrazně větší než u obrázku 25.**



Obrázek 25 Krabicový graf s přiblíženým měřítkem pro lepší znázornění koncentrací jednotlivých kokultur. **Měřítka osy x je zde výrazně menší než u obrázku 24.**



Obrázek 26 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA *P. aeruginosa* kultivovaných v biofilmu mutantními kmeny *C. albicans* a kontrolním kmenem (SC5314) na polystyrenu. Barevně vyznačené výšeče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů. **Měřítka osy x je zde výrazně větší než u obrázku 27.**

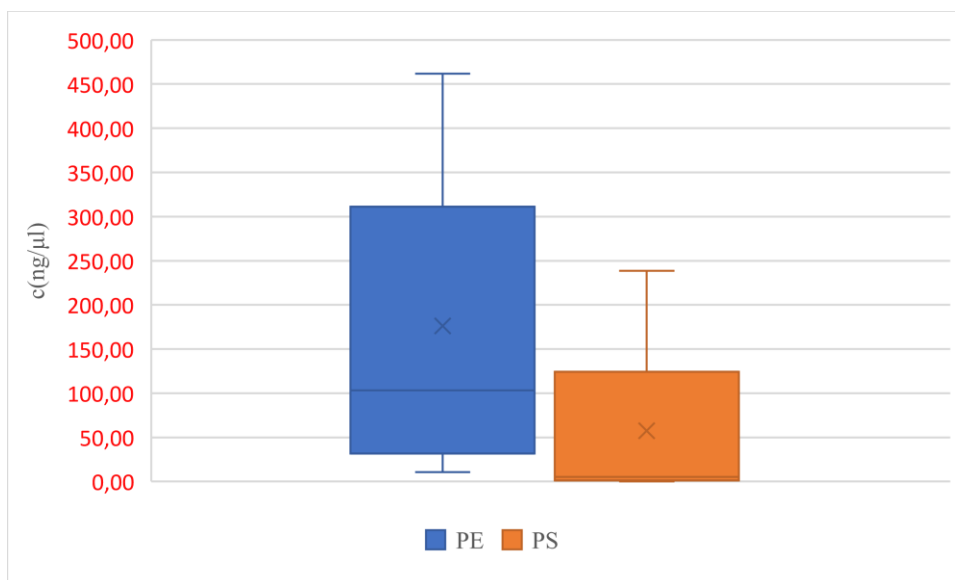


Obrázek 27 Krabicový graf s přiblíženým měřítkem pro lepší znázornění koncentrací jednotlivých kokultur. **Měřítka osy x je zde výrazně menší než u obrázku 26.**

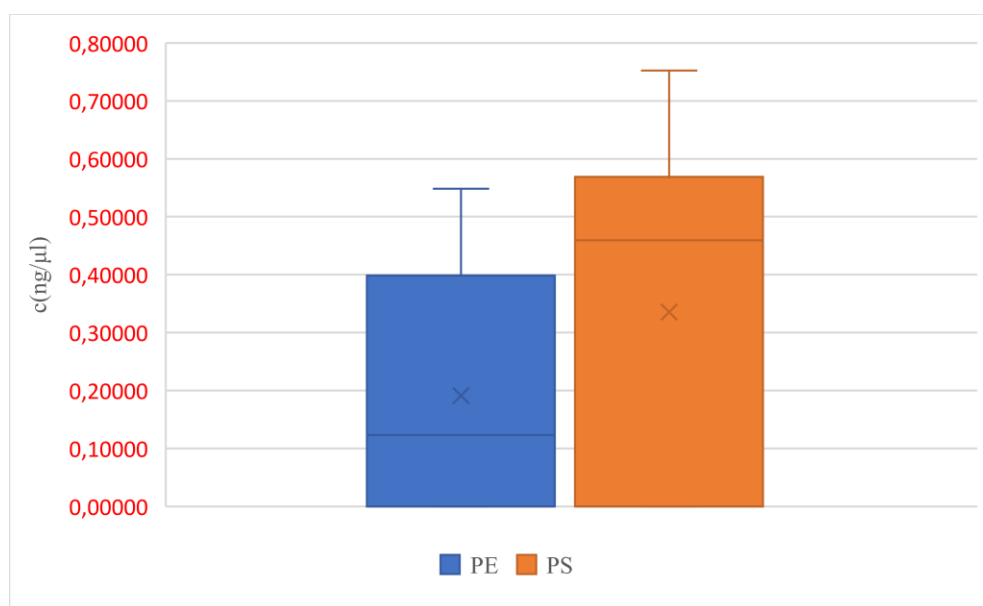
Co se týče koncentrace *C. guilliermondii*, tak její nárůst byl jednoznačně vyšší oproti *P. aeruginosa*. Současně *C. guilliermondii* více rostla na polyethyleny. Medián koncentrace *C. guilliermondii* na PE pro jednu sadu měření se pohyboval v okolo hodnoty 280,18 ng/μl a pro druhou sadu měření okolo hodnoty 33,00 ng/μl. Medián koncentrace *C. guilliermondii*

na PS měl také rozdílné výsledky a to 162,07 ng/μl a 1,69 ng/μl. Nicméně je patrné, že koncentrace na PE jsou vyšší.

P. aeruginosa měla zvýšený nárůst na polystyrenu. Rovněž u *C. guilliermondii* byl zaznamenán mnohonásobně vyšší nárůst oproti *C. albicans*. *P. aeruginosa* v biofilmu s *C. guilliermondii* měla přibližně shodný nárůst jako *P. aeruginosa* kultivovaná společně s *C. albicans*.



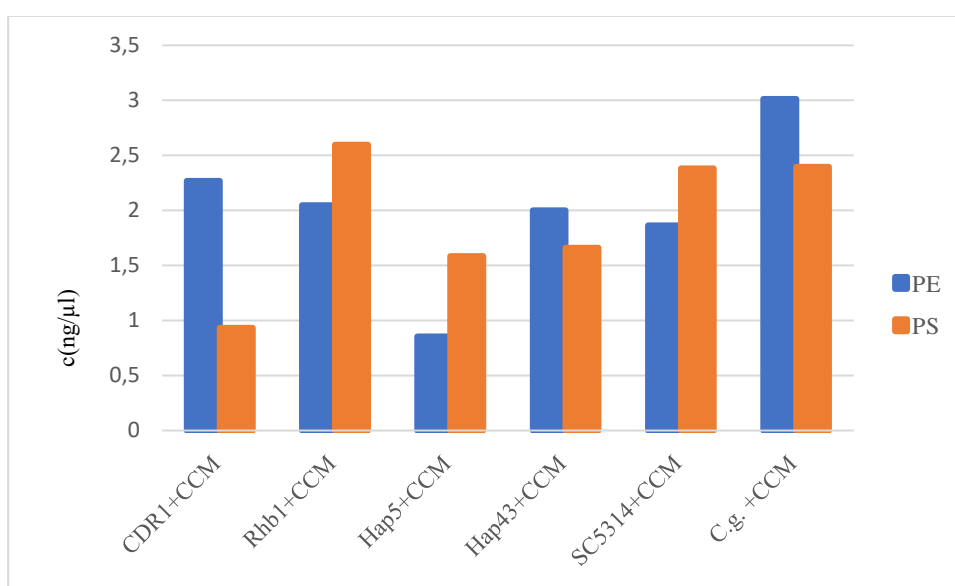
Obrázek 28 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA *C. guilliermondii* kultivovaných v biofilmu s *P. aeruginosa* na polystyrenu i polyethylenu. Barevně vyznačené výseče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů. **Měřítka osy x je zde výrazně větší než u obrázku 29.**



Obrázek 29 Krabicový graf reprezentující naměřenou koncentraci DNA *P. aeruginosa* kultivovaných v biofilmu s *C. guilliermondii* na polystyrenu i polyethylenu. Barevně vyznačené výseče představují zastoupení koncentrací jednotlivých polymikrobiálních biofilmů. **Měřítka osy x je zde výrazně menší než u obrázku 28.**

3.4.2 Logaritmus poměru koncentrací sledovaných kokultur

Z naměřených dat byl vypočítán logaritmus poměru koncentrací *C. albicans* / *P. aeruginosa* a *C. guilliermondii* / *P. aeruginosa*. Jedná se o souhrnné vyjádření růstu jednotlivých kokultur na polymerech. Z grafu je snadné vyvodit, na kterém polymeru byl větší nárůst biofilmu. Co se týče polyethylenu, tak zde se koncentrace biofilmu jednotlivých kokultur pohybovala okolo 2,0 ng/μl mimo kokulturu $\Delta hap5+CCM$, u níž byla koncentrace nižší. Koncentrace biofilmů na polystyrenu u třech vzorků dosahovala hodnot vyšší než 2,0 ng/μl. Avšak u dalších třech vzorků byla nižší než 2 ng/μl. Z grafu je taktéž patrné, že největší nárůst na polyethylenu byl zaznamenán u *C. g.*+ CCM a největší nárůst na polystyrenu měl biofilm $\Delta rhb1+CCM$. Tento fakt, je dobře pozorovatelný i v grafech obr.22 až 29.



Obrázek 30 Sloupcový graf znázorňující logaritmus poměru koncentrací kokultur *C. albicans* / *P. aeruginosa* a *C. guilliermondii* / *P. aeruginosa*. Na ose y je vypočítaná koncentrace a na ose x jednotlivé kokultury.

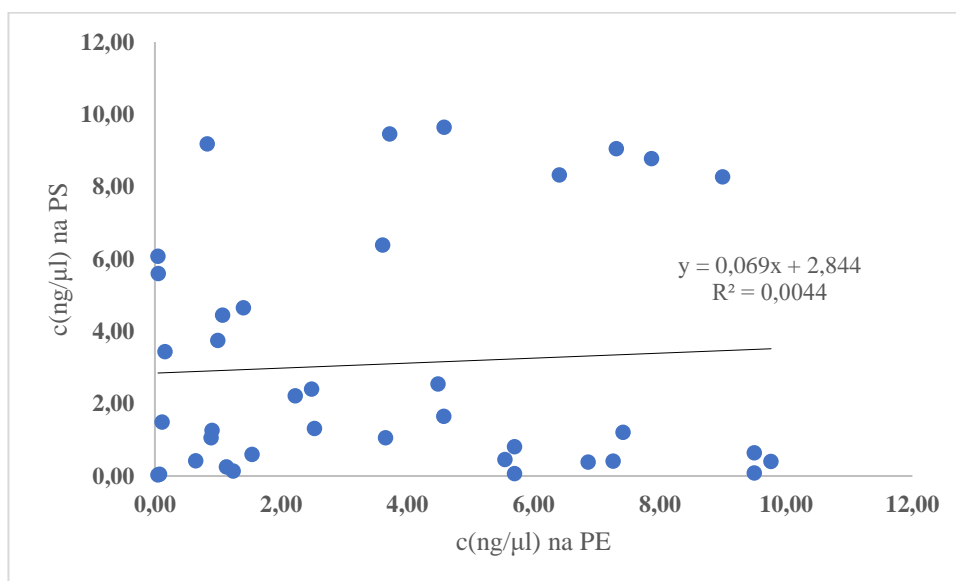
3.4.3 Korelační koeficient

Z naměřených hodnot koncentrace vyizolované DNA ze vzorků byl vypočítán korelační koeficient pro jednotlivé druhy mikroorganismů. Korelace je lineární závislost mezi dvěma hodnotami a míra korelace je vyjádřena korelačním koeficientem. Tento koeficient nabývá hodnot od -1 (jedná se o silně negativní korelaci) do 1 (jedná se o silně pozitivní korelaci). Do výpočtu byly vloženy hodnoty koncentrací jednotlivých mikroorganismů proti sobě PS a PE [62, 63]. Grafy reprezentující korelační koeficient pro jednotlivé mikroorganismy mají odlišné měřítko, z důvodu řádově odlišných koncentrací vzorků.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) s_x s_y}$$

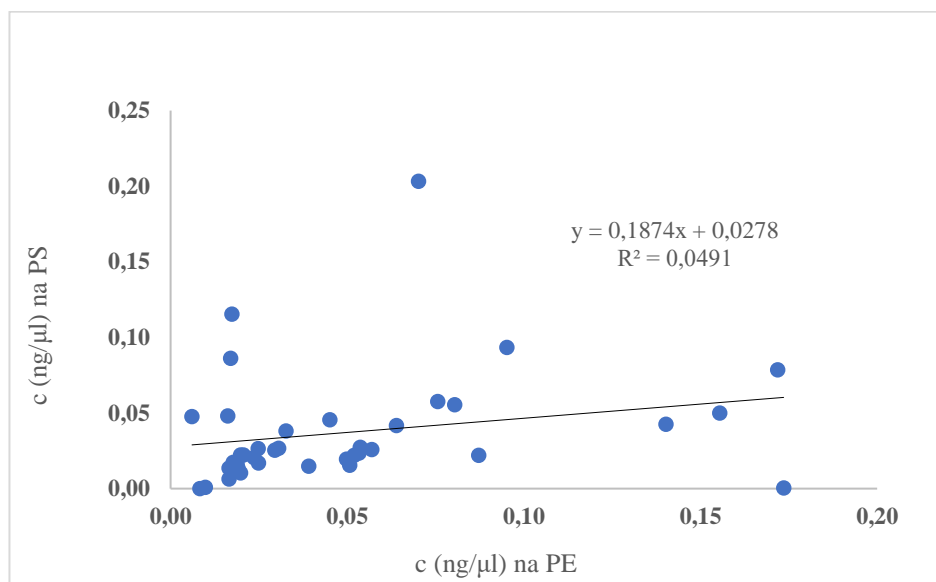
Obrázek 31 Výpočet výběrového Pearsonova korelačního koeficientu r , kde \bar{x} a \bar{y} jsou výběrové průměry, s_x a s_y jsou výběrové průměry směrodatné odchylky a náhodný vektor o rozsahu n . Převzato a upraveno ze zdroje [62].

Výsledky Pearsonovy korelace ukázaly pro koncentraci *C. albicans*, že mezi osou x a y existuje jistá korelace vyjádřená hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu $r = 0,5591$.



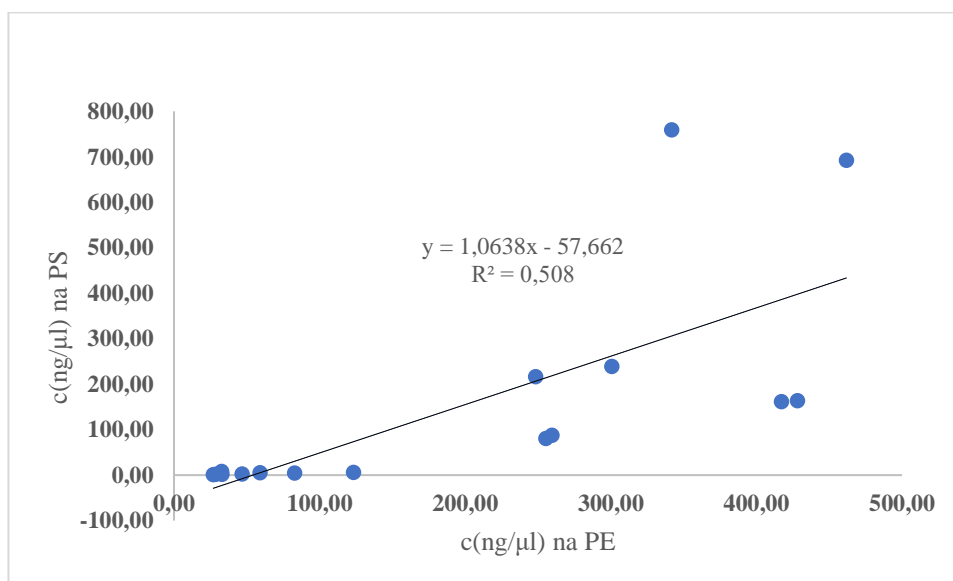
Obrázek 32 Bodový graf reprezentující korelační koeficient *C. albicans*. Na ose x se nachází koncentrace naměřená na polystyrenu a na ose y pak koncentrace z polyethylenu

Výsledky Pearsonovy korelace ukázaly pro koncentraci *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. albicans*), že mezi osou x a y existuje významná korelace vyjádřená hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu $r = 0,4498$.



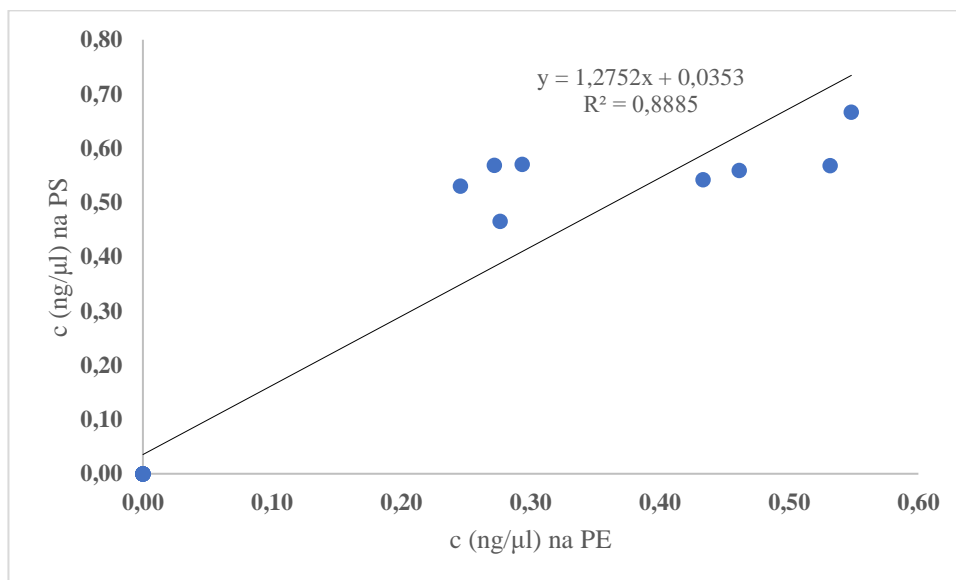
Obrázek 33 Bodový graf reprezentující korelační koeficient *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. albicans*). Na ose x se nachází koncentrace naměřená na polystyrenu a na ose y pak koncentrace z polyethylenu.

Výsledky Pearsonovy korelace ukázaly pro koncentraci *C. guilliermondii*, že mezi osou x a y existuje významná korelace vyjádřená hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu $r = 0,7354$.



Obrázek 34 Bodový graf reprezentující korelační koeficient *C. guilliermondii*. Na ose x se nachází koncentrace naměřená na polystyrenu a na ose y pak koncentrace z polyethylenu.

Výsledky Pearsonovy korelace ukázaly pro koncentraci *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. guilliermondii*), že mezi osou x a y existuje významná korelace vyjádřená hodnotou Pearsonova korelačního koeficientu $r = 0,9590$.



Obrázek_35 Bodový graf reprezentující korelační koeficient *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. guilliermondii*). Na ose x se nachází koncentrace naměřená na polystyrenu a na ose y pak koncentrace z polyethylenu.

Díky korelaci naměřených hodnot víme, že se x a y chovají velmi podobně. Znamená to tedy, že nárůst jednotlivých sledovaných mikroorganismů na polystyrenu a polyethylenu je obdobný. Korelační hodnoty *C. albicans* jsou na sobě nejméně závislé a mají široký rozsah koncentrací na obou polymerech, v porovnání s *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. albicans*), jejíž hodnoty se ve většině nachází v oblasti nižší koncentrace. Většina hodnot *C. guilliermondii* leží v blízkosti středové linie a hodnoty koncentrace jsou zde vyšší než u *P. aeruginosa*. Rozložení hodnot *P. aeruginosa* (v biofilmu s *C. guilliermondii*) je přesnější. Koncentrace je nižší, ale body se nachází v blízkosti středové osy a v blízkosti sobě samých.

Jelikož se jedná o živý mikroorganismus, výsledky nejsou průkazně totožné, i když všechna měření proběhla za identických podmínek. Co se týče manuálního provedení kultivace, domnívám se, že za rozdílností výsledků stojí nestejně množství odebraného inokula kultury ke kultivaci. Analýza DNA byla jistě zatížena i chybou způsobenou odlišným množstvím vizolované DNA.

3.5 Popis přílohy

V příloze jsou přiloženy snímky zkoumaných kultur. Snímky byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku. Největší nárůst $\Delta rhb1$ +CCM na polyesteru potvrzuje i snímek v příloze na obrázku P1, na kterém je zachycen biofilm Rhb1 na polystyrenu v hojném počtu. Současně v příloze na obrázku P4 je zachycen biofilm $\Delta cdr1$, jehož nárůst na polystyrenu není nikterak velký.

ZÁVĚR

Náplní této práce bylo stanovit interakci patogenních kvasinek *Candida albicans* s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida guilliermondii* s bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Interakce byla stanovena v rámci polymikrobiálního biofilmu na dvou typech polymerů, a to polyethylenu a polystyrenu. V rámci stanovení byly připraveny směsné kultury *Candida albicans* s *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida guilliermondii* s *Pseudomonas aeruginosa*. Připravené kokultury byly inkubovány na abiotickém materiálu a vzniklý biofilm byl kvantifikován pomocí real-time PCR.

První část diplomové práce byla zaměřena na kalibraci metody, měření optické hustoty čistých a směsných kultur a na měření koncentrace DNA na spektrofotometru. Nejprve byly vytvořeny kalibrační řady pro jednotlivé vzorky. Hodnoty kalibrace byly změřeny pomocí real-time PCR a byly vytvořeny kalibrační křivky. Měření optické hustoty čistých a směsných kultur bylo provedeno vždy před izolací DNA. Naměřené hodnoty OD čistých kultur se výrazně nelišily, avšak hodnoty OD směsných kultur byly vůči čistým kulturám nižší. Mezi jednotlivými měřeními se objevovaly větší odchylky způsobené inkubací vzorků. Hodnoty koncentrací směsných biofilmů naměřených na spektrofotometru se vzájemně liší jednak mezi jednotlivými kokulturami, tak ale i mezi jednotlivými měřeními. Z výsledků je ale patrné, že vyšší nárůst biofilmu je na polyethylenu a současně ze všech vzorků nejlépe roste *C. albicans* Δ *cdr1* v biofilmu s *Pseudomonas aeruginosa*.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na stanovení biofilmů směsných kultur pomocí real-time PCR. Každý vzorek byl měřen v dubletu a celkem u každého vzorku bylo provedeno pět až šest měření. Z naměřených dat se prokázalo následující: růst biofilmu jednoznačně nepřevažoval na jednom typu polymeru, ale poněkud mírně vyšší nárůst biofilmu byl zaznamenán na polyethylenu. Díky tomu, že více buněk kokultury adherovalo na polyethylenu a vytvořilo tak větší vrstvu biofilmu, koncentrace na polystyrenu byla snížena. Kokultura *C. albicans* Δ *rhb1* kultivovaná s *P. aeruginosa* ve všech měřeních tvořila větší vrstvu biofilmu na polystyrenu. Dle mého názoru tento fakt může souviset s vlastnostmi *C. albicans* Δ *rhb1*. Tento mutantní gen kóduje tzv. G protein, který se aktivně zapojuje do filamentózního růstu při hladovění buňky. Díky tomu má zvýšenou tvorbu biofilmu v nepříznivých konkurenčních podmínkách. Dále bylo zjištěno, že *Candida albicans* a *Candida guilliermondii* mají vícenásobně vyšší růst v biofilmu vůči *Pseudomonas aeruginosa*. To by mohlo souviset s faktem, že bakterie jsou obecně náročnější na kultivaci a v prostředí s kandidami jsou snadno

potlačeny. Současně *C. guilliermondii* vykazuje vyšší nárůst než *C. albicans*. Z rodu *C. albicans* se nejvíce dařilo kultuře $\Delta cdr1$ kultivované společně s *P. aeruginosa*.

Veškeré hodnoty koncentrací vzorků naměřených na qPCR byly porovnány s kalibračními křivkami použitých mikroorganismů. Hodnoty koncentrací jednotlivých měření jsou relativně rozdílné. Mezi hodnotami však existuje významná korelace vyjadřující závislost kokultur na sobě samých. Nárůst biofilmu jednotlivých kokultur byl obdobný jak na polyethylen, tak na polystyrenu. Avšak jak potvrdily výsledky z qPCR, více kokultur tvořilo větší množství biofilmu na polyethylen. Množství vytvořeného biofilmu jednotlivých kokultur, dle mého názoru, závisí na schopnosti mikroorganismu adaptovat se na kultivační podmínky a dále pak na kompetici obou kultur v polymikrobiálním biofilmu. Velkou roli zde má i struktura polymeru, především povrchové vrypy, které usnadňují buňkám adhezi. Další roli zde hraje i hydrofilita povrchu. K polystyrenu, jakožto hydrofilnímu povrchu je nutná hydrofobní interakce buňky, která je v tomto případě slabá.

Tato analýza polymikrobiálního biofilmu v *in vitro* prostředí by mohla v klinické praxi přispět k pochopení adheze buněk na abiotické materiály a následnému zabránění této kontaminace. Zároveň tato diplomová práce může přispět k vhledu do interakcí mezi mikroorganismy v polymikrobiálním biofilmu. V širším kontextu a po dalším výzkumu by mohl být předložen návrh k předúpravě klinických materiálů pomocí činidel, které by inhibovaly adherované buňky.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] 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* [online]. 2012, 36(2), 288-305 [cit. 2023-02-26]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- [2] MELANIE POLKE, BERNHARD HUBE a D. JACOBSEN. *Candida* Survival Strategies. *Advances in Applied Microbiology* [online]. 2014, 2015(91), 139-235 [cit. 2022-07-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216414000537?via=ihub#>
- [3] TAVANTI, ARIANNA, AMANDA D. DAVIDSON, NEIL A. R. GOW, MARTIN C. J. MAIDEN, FRANK C. ODDS a JOANA AZEREDO. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2005, 43(1), 284-292 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.43.1.284-292.2005
- [4] GULATI, MEGHA a CLARISSA J. NOBILE. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection* [online]. 2016, 18(5), 310-321 [cit. 2022-07-21]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002
- [5] R. PEREIRA, R.O. dos SANTOS FONTENELLE, S.M. de Morais a E.H.S. de BRITO. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2021, 29 November 2020, 2021(131), 11-22 [cit. 2022-07-26]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/jam.14949>
- [6] MACIAS-PAZ, IGNACIO URIEL, SALVADOR PÉREZ-HERNÁNDEZ, ALEJANDRA TAVERA-TAPIA, JUAN PEDRO LUNA-ARIAS, JOSÉ EUGENIO GUERRA-CÁRDENAS a ELIZABETH REYNA-BELTRÁN. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología* [online]. 2022 [cit. 2023-04-03]. ISSN 03257541. Dostupné z: doi:10.1016/j.ram.2022.08.003
- [7] HOSSAIN, SAIF, EMMA LASH, AMANDA O. VERI a LEAH E. COWEN. Functional connections between cell cycle and proteostasis in the regulation of *Candida albicans* morphogenesis. *Cell Reports* [online]. 2021, 34(8) [cit. 2022-11-14]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2021.108781
- [8] NOBLE, SUZANNE M., BRITTANY A. GIANETTI a JESSICA N. WITCHLEY. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2017, 15(2), 96-108 [cit. 2022-11-14]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2016.157

- [9] HOSSAIN, SAIF, AMANDA O. VERI, LEAH E. COWEN a MICHAEL LORENZ. The Proteasome Governs Fungal Morphogenesis via Functional Connections with Hsp90 and cAMP-Protein Kinase A Signaling. *MBio* [online]. 2020, 11(2), e00290-20 [cit. 2022-11-14]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00290-20
- [10] LOLL-KRIPPLEBER, RAPAHÉL, CHRISTOPHE D'ENFERT, ADELINÉ FÉRI, DOROTHÉE DIOGO, AURÉLIE PERIN, MARINA MARCET-HOUBEN, MARIE-ELISABETH BOUGNOUX a MÉLANIE LEGRAND. A study of the DNA damage checkpoint in *Candida albicans*: uncoupling of the functions of Rad53 in DNA repair, cell cycle regulation and genotoxic stress-induced polarized growth. *Molecular Microbiology* [online]. 2014, 91(3), 452-471 [cit. 2022-11-15]. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/mmi.12471
- [11] TSUI, CHRISTINA, Eric F. KONG, MARY ANN JABRA-RIZK a HARRY MOBLEY. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease* [online]. 2016, 74(4), 19-31 [cit. 2022-07-28]. ISSN 2049-632X. Dostupné z: doi:10.1093/femspd/ftw018.
- [12] K.E.PRISTOV a M.A.GHANNOUM. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2019, červen 2017, 2019(7), 792-798 [cit. 2022-09-29]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19301491>
- [13] COAD, BRYAN R., SARAH E. KIDD, DAVID H. ELLIS a HANS J. GRIESSER. Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, 32(2), 296-307 [cit. 2022-11-01]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.015
- [14] MORACE, GIULIA, FEDERICA PERDONI a ELISA BORGHI. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. 2014, 2(4), 254-259 [cit. 2022-09-30]. ISSN 22137165. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgar.2014.09.002
- [15] NAVARRO-ARIAS, MARÍA J., TATIANA A. DEFOSSE, KARINE DEMENTHON, et al. *Candida guilliermondii* Complex Is Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of Candidemia. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, 7(7), e00099-17 [cit. 2022-10-15]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01951
- [16] MUZAFAR, SURAYA, RAVI DATTA SHARMA, ABDUL HASEEB SHAH, NASEEM A. GAUR, UJJAINI DASGUPTA, NEERAJ CHAUHAN, RAJENDRA PRASAD a AARON P. MITCHELL. Identification of Genomewide Alternative Splicing Events in Sequential, Isogenic Clinical Isolates of *Candida albicans* Reveals a Novel Mechanism of Drug Resistance and Tolerance to Cellular Stresses. *MSphere* [online]. 2020, 5(4), e00608-20 [cit. 2022-09-27]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00608-20

- [17] ENE, IULIANA V, RICHARD J BENNETT a MATTEHEW Z ANDERSON. Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2019, 52, 47-54 [cit. 2023-03-27]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2019.05.001
- [18] NOBILE, CLARISSA J. a ALEXANDER D. JOHNSON. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2015, 69(1), 71-92 [cit. 2022-10-16]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-micro-091014-104330
- [19] DADAR, MARYAM, RUCHI TIWARI, KUMARAGURUBARAN KARTHIK, SANDIP CHAKRABORTY, YOUCEF SHAHALI a KUPLDEEP DHAMA. *Candida albicans* – Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, 117, 128-138 [cit. 2022-11-22]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2018.02.028
- [20] JAFARIAN, HADIS, MARAL GHARAGHANI, SEYED SAEED SEYEDIAN a ALI ZAREI MAHMOUDABADI. Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in *Candida albicans* from esophageal candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2021, 35(7) [cit. 2022-11-23]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.23826
- [21] UniProt database. Swiss: The UniProt Consortium, 2023 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5ANA3/entry>
- [22] RUMBAUGH, KENDRA P. a KARIN SAUER. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2020, 18(10), 571-586 [cit. 2022-10-24]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-0385-0
- [23] ZARNOWSKI, ROBERT, WILLIAM M. WESTLER, GHISLAIN ADE LACMBOUH, et al. *MBio* [online]. 2014, 5(4) [cit. 2022-10-26]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01333-14
- [24] WALL, GINA, DANIEL MONTELONGO-JAUREGUI, BRUNA VIDAL BONIFACIO, JOSE L LOPEZ-RIBOT a PRIYA UPPULURI. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2019, 52, 1-6 [cit. 2022-07-26]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2019.04.001
- [25] POLKE, MELANIE, BERNHARD HUBE a ILSE D. JACOBSEN. *Candida Survival Strategies* [online]. Elsevier, 2015, 2015, 139-235 [cit. 2022-10-28]. Advances in Applied Microbiology. ISBN 9780128022504. Dostupné z: doi:10.1016/bs.aambs.2014.12.002
- [26] SACHIVKINA, NADEZHDA, IRINA PODOPRIGORA a DMITRY BOKOV. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Veterinary World* [online]. 1608-1614 [cit. 2022-10-15]. ISSN 22310916. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2021.1608-1614

- [27] DELANEY, CHRISTOPER, BRYN SHORT, RANJITH RAJENDRAN, RYAN KEAN, KARL BURGESS, CRAIG WILLIAMS, CAROL A. MUNRO a GORDON RAMAGE. An integrated transcriptomic and metabolomic approach to investigate the heterogeneous *Candida albicans* biofilm phenotype. *Biofilm* [online]. 2023, 5 [cit. 2023-04-06]. ISSN 25902075. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioflm.2023.100112
- [28] MITCHELL, KAITLIN F., ROBERT ZARNOWSKI, HIRAM SANCHEZ, JESSICA A. EDWARD, EMILY L. REINICKE, JENIEL E. NETT, AARON P. MITCHELL a DAVID R. ANDES. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, 112(13), 4092-4097 [cit. 2022-10-26]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1421437112
- [29] LOHSE, MATTHEW B., MEGHA GULATI, ALEXANDER D. JOHNSON a CLARISSA J. NOBILE. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2018, 16(1), 19-31 [cit. 2022-07-28]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro.2017.107
- [30] NOBILE, CLARISSA J., EMILY P. FOX, JENIEL E. NETT, et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in *Candida albicans*. *Cell* [online]. 2012, 148(1-2), 126-138 [cit. 2023-02-27]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.10.048
- [31] PONDE, NICOLE O., LÉA LORTAL, GORDON RAMAGE, JULIAN R. NAGLIK a JONATHAN P. RICHARDSON. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2021, 47(1), 91-111 [cit. 2022-12-04]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2020.1843400
- [32] BANDARA, H. M. H. N., D. L. A. WOOD, I. VANWONTERGHEM, P. HUGENHOLTZ, B. P. K. CHEUNG a L. P. SAMARANAYAKE. Fluconazole resistance in *Candida albicans* is induced by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2022-10-27]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-64761-3
- [33] MARCOS-ZAMBRANO, LAURA JUDITH, MIREIA PUIG-ASENSIO, FELIPE PÉREZ-GARCÍA, et al. *Candida guilliermondii* Complex Is Characterized by High Antifungal Resistance but Low Mortality in 22 Cases of *Candidemia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2017, 61(7), e00099-17 [cit. 2022-10-15]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00099-17
- [34] HIRAYAMA, TATSURO, TAIGA MIYAZAKI, YUKA YAMAGISHI, et al. Clinical and Microbiological Characteristics of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2018, 62(6), e02528-17 [cit. 2022-10-14]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.02528-17

- [35] DIGGLE, STEPHEN P. a MARVIN WHITELEY. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* [online]. 2020, 166(1), 30-33 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.000860
- [36] ŽIEMYTĚ, MIGLE, MIGUEL CARDA-DIÉGUEZ, JUAN C. RODRÍGUEZ-DÍAZ, MARIA P. VENTERO, ALEX MIRA a MARÍA D. FERRER. *Real-time monitoring of Pseudomonas aeruginosa biofilm growth dynamics and persister cells' eradication* [online]. 2021, 10(1), 2062-2075 [cit. 2023-02-05]. ISSN 2222-1751. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2021.1994355
- [37] SAUVAGE, SALOMÉ a JULIE HARDOUIN. Exoproteomics for Better Understanding *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Toxins* [online]. 2020, 12(9) [cit. 2023-02-05]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins12090571
- [38] WEI, QING a LUYAN MA. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 14(10), 20983-21005 [cit. 2023-02-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms141020983
- [39] CAMUS, LAURA, FRANCOIS VANDENESCH a KAREN MOREAU. From genotype to phenotype: adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment. *Microbial Genomics* [online]. 2021, 7(3) [cit. 2023-02-05]. ISSN 2057-5858. Dostupné z: doi:10.1099/mgen.0.00051
- [40] FOURIE a POHL. Beyond Antagonism: The Interaction Between *Candida* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Fungi* [online]. 2019, 5(2) [cit. 2023-04-03]. ISSN 2309-608X. Dostupné z: doi:10.3390/jof5020034
- [41] POHL, CAROLINA H. Recent Advances and Opportunities in the Study of *Candida albicans* Polymicrobial Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022, 12 [cit. 2022-12-01]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2022.836379
- [42] FOURIE, RUAN, JACOBUS ALBERTYN, OLIHILE SEBOLAI, ONELE GCILITSHANA a CAROLINA H. POHL. *Candida albicans* SET3 Plays a Role in Early Biofilm Formation, Interaction With *Pseudomonas aeruginosa* and Virulence in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2021, 11 [cit. 2023-04-03]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.680732
- [43] BHARDWAJ, RADHIKA G., ARJUNA ELLEPOLLA, HANA DROBIOVA a MARIBASAPPA KARCHED. *BMC Microbiology* [online]. 2020, 20(1) [cit. 2023-03-06]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-020-01834-3
- [44] BACHTIAR, ENDGAN W., Boy M. BACHTIAR, LUCJA M. JAROSZ, LISA R. AMIR, HARI SUNARTO, HADAS GANIN, MICHAEL M. MEIJLER a BASTTIAN P. KROM. AI-2 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2014, 4 [cit. 2023-03-06]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2014.00094

- [45] KASETTY, SWETHA, DALLAS L. MOULD, DEBORAH A. HOGAN, CAREY D. NADELL a AARON P. MITCHELL. Both *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* Accumulate Greater Biomass in Dual-Species Biofilms under Flow. *MSphere* [online]. 2021, 6(3), e00416-21 [cit. 2022-12-01]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.00416-21
- [46] KIPANGA, PURITY N. a WALTER LUYTEN. Influence of serum and polystyrene plate type on stability of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2017, 139, 8-11 [cit. 2022-11-08]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2017.04.006
- [47] ZHOU, YUREN, PATRICK D. KIELY, RICHARD KIBBEE a BANU ORMECI. Effect of polymeric support material on biofilm development, bacterial population, and wastewater treatment performance in anaerobic fixed-film systems. *Chemosphere* [online]. 2021, 264 [cit. 2022-11-09]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128477
- [48] Ing. LUBOŠ BĚHÁLEK, Ph.D. Polymery. In: , Ing. Luboš Běhálek, Ph.D. *Polymery* [online]. Svitavy: Code Creator, 2016 [cit. 2022-11-09]. ISBN 978-80-88058-68-7. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/Impresum.html>
- [49] WILKES, R.A. a L. ARISTILDE. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017, 123(3), 582-593 [cit. 2023-03-06]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13472
- [50] MENG, XIAO, HAO XIONG, FANGLING JI, XIAORONG GAO, LULU HAN, ZHENLIN WU, LINGYUN JIA a JUN REN. Facile surface treatment strategy to generate dense lysozyme layer on ultra-high molecular weight polyethylene enabling inhibition of bacterial biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2023 [cit. 2023-03-06]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2023.113243
- [51] Polymer science learning centre. USA: University of Southern Mississippi, 2023 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.pslc.ws/mactest/pe.htm>
- [52] *National Library of Madecine: PubChem* [online]. Rockville Pike, Bethesda: U.S. National Library of Medicine, 2022 [cit. 2022-11-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=polystyrene%20structure>
- [53] Styl MLA: Tisková zpráva. NobelPrize.org. Nobelova cena Outreach AB 2023. Pon. 27. března 2023. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/press-release/>
- [54] MATSUDA, KAZUYUKI a DURAI PANDIAN REX ARUNRAJ. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 49(5), 45-72 [cit. 2022-11-28]. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780128120750. ISSN 1470-8175. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2016.11.002

- [55] SANTOS, CARLOS FERREIRA dos, VIVIEN THIEMY SAKAI, MARIA APARECIDA de ANDRADE MOREIRA MACHADO, DANIELA NICOLE SCHIPPERS a ANDREW SETH GREENE. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal of Applied Oral Science* [online]. Elsevier, 2004, 2017, 12(1), 1-11 [cit. 2022-11-28]. Advances in Clinical Chemistry. ISBN 9780128120750. ISSN 1678-7757. Dostupné z: doi:10.1590/S1678-77572004000100002
- [56] LabGuide: Průvodce laboratoří. ČR: 4WORKS Solutions, 2015 [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>
- [57] HARSHITHA, RAVIKUMAR a DURAI PANDIAN REX ARUNRAJ. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2021, 49(5), 800-812 [cit. 2022-11-28]. ISSN 1470-8175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.21552
- [58] ZHOU, XIAHONG, ABDUL GHAFAR MEMON, WEIMING SUN, FANG FANG a JINSONG GUO. Fluorescent Probe for Ag Detection Using SYBR GREEN I and C-C Mismatch. *Biosensors*. 2021, 11(1) [cit. 2023-03-28]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios11010006
- [59] BERÁNEK, MARTIN. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7
- [60] LIU, XIAO-ZHI, BIN ZHANG, WEI ZHAO, et al. Method validation of Q-PCR detection of host residual DNA in antibody drug based on protein A magnetic beads. *Biologicals* [online]. 2019, 62, 65-71 [cit. 2023-04-03]. ISSN 10451056. Dostupné z: doi:10.1016/j.biologicals.2019.09.004
- [61] ThorLabs. USA: [thorlabs.com](https://www.thorlabs.com), 2023 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: https://www.thorlabs.com/NewGroupPage9_PF.cfm?Guide=10&Category_ID=134&ObjectGroup_ID=6082
- [62] HOLČÍK, JIŘÍ, KOMENDA, MARTIN (eds.) a kol. *Matematická biologie: e-learningová učebnice* [online]. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-8095-9.
- [63] Statistic Kingdom. 2023 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.statkingdom.com/correlation-calculator.html>
- [64] Vedantu: Learn. Bangalore, Karnataka: Pooja Bheemaiah, 2020 [cit. 2022-11-08]. Dostupné z: <https://www.vedantu.com/question-answer/write-the-names-and-structures-of-the-monomers-class-12-chemistry-cbse-604c47252f30785e60c2dc0>
- [65] *Candida genome database*. US National Institutes of Health: National Institute of Dental & Craniofacial Reserch, 2005 [cit. 2023-04-26]. Dostupné z: <http://www.candidagenome>

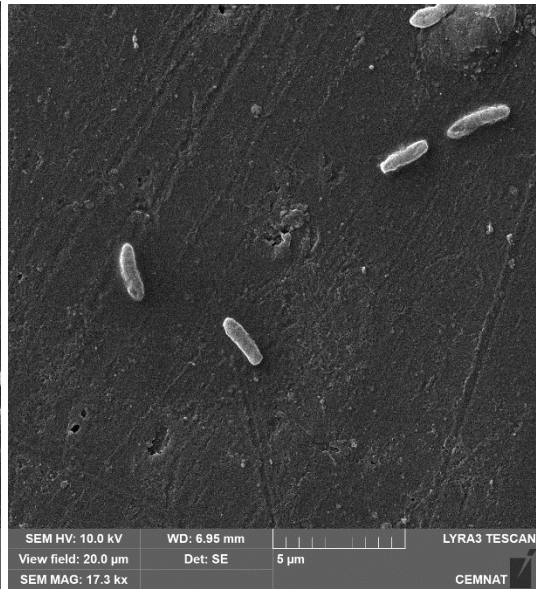
PŘÍLOHY

Obrázky

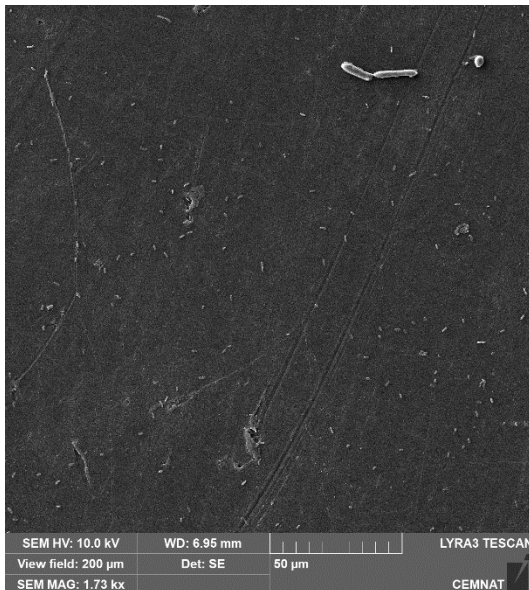
A



B

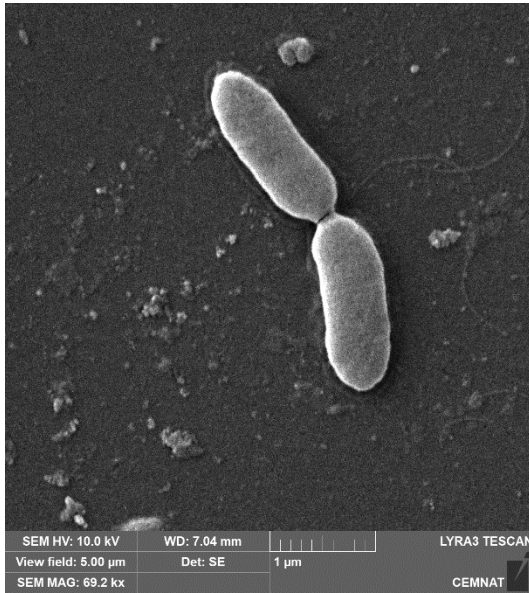


C

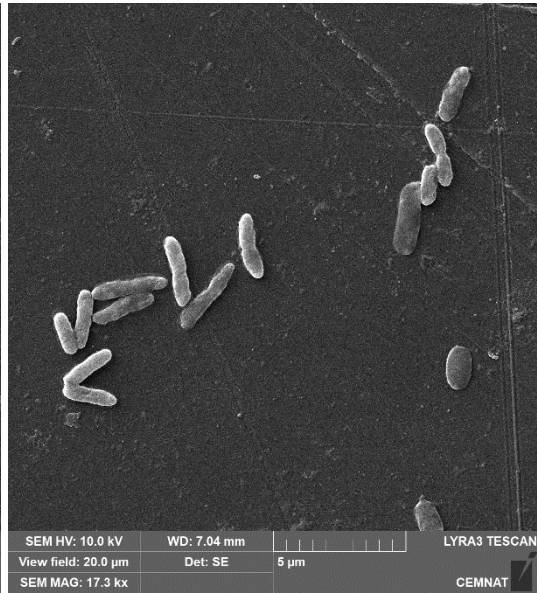


Obrázek P1 *Δrhb1* kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μm , na B je 20 μm a na C je 200 μm . Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.

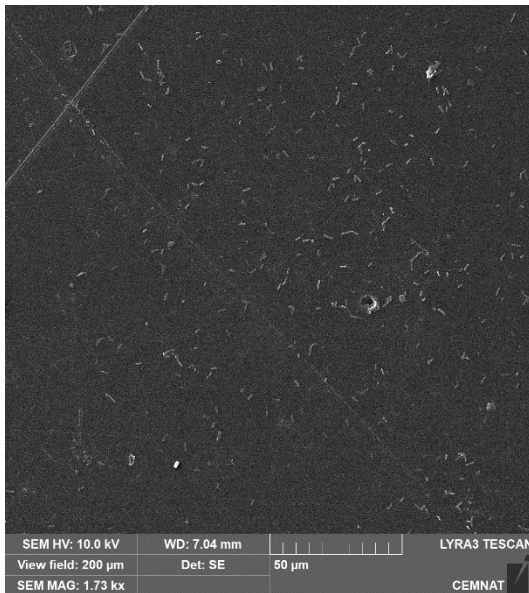
A



B



C

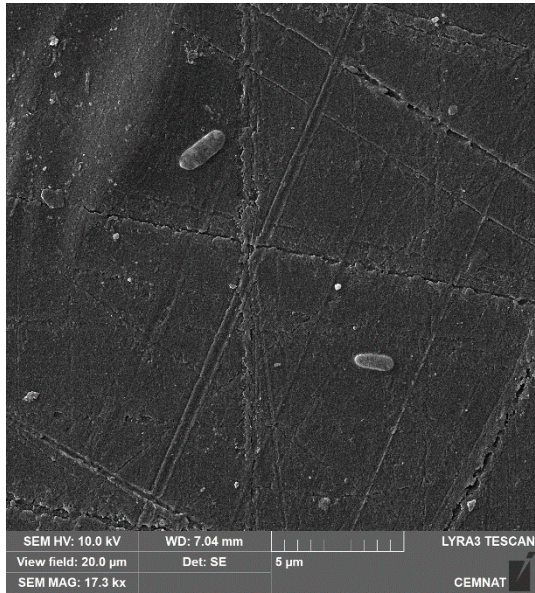


Obrázek P2 *Δhap43* kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μm, na B je 20 μm a na C je 200 μm. Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.

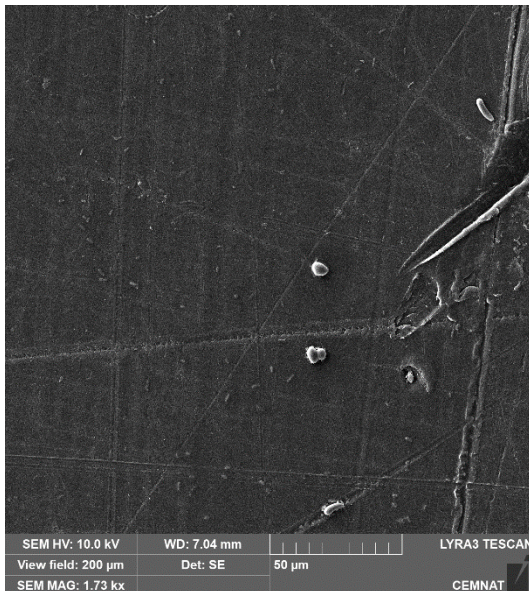
A



B



C

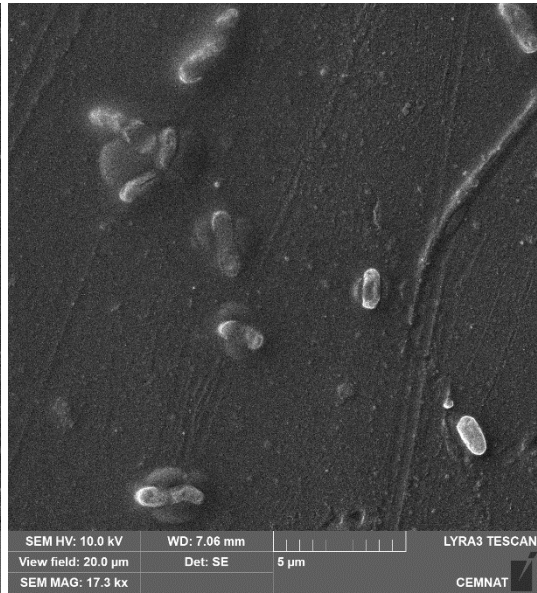


Obrázek P3 *Δhap5* kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μm , na B je 20 μm a na C je 200 μm . Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.

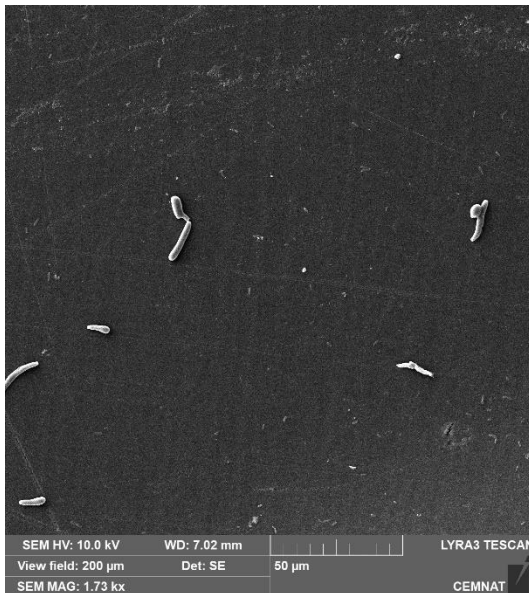
A



B



C



Obrázek P4 *Acdr1* kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μ m, na B je 20 μ m a na C je 200 μ m. Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.

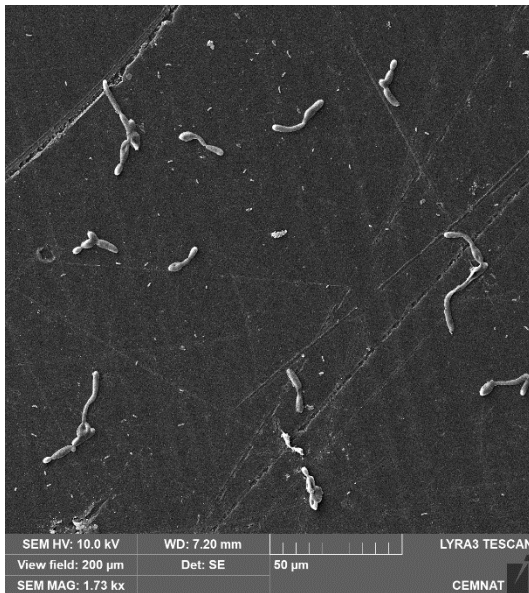
A



B



C

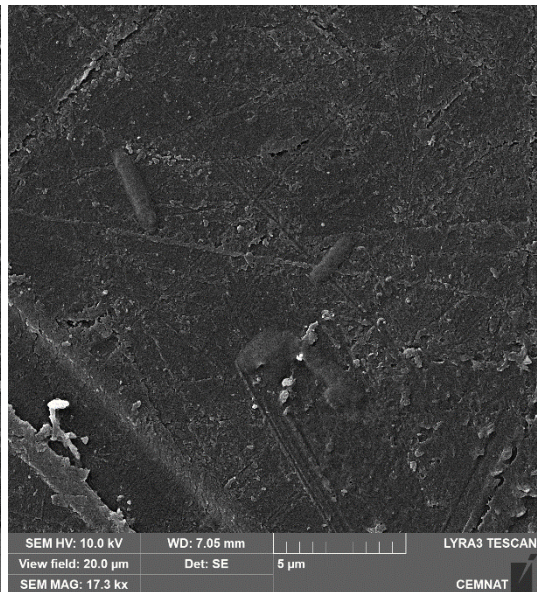


Obrázek P5 SC5314 kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μm , na B je 20 μm a na C je 200 μm . Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.

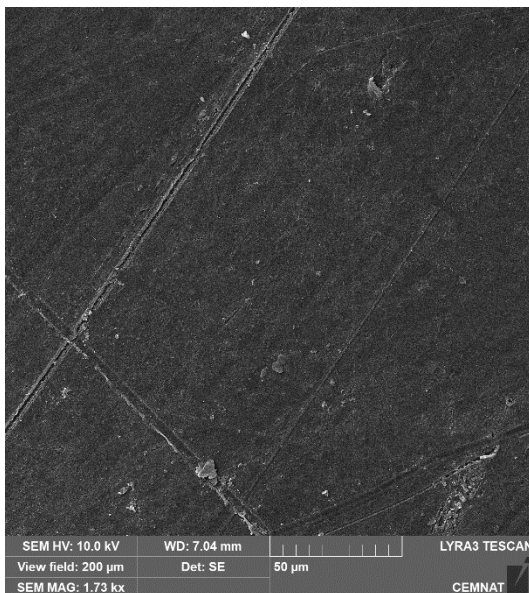
A



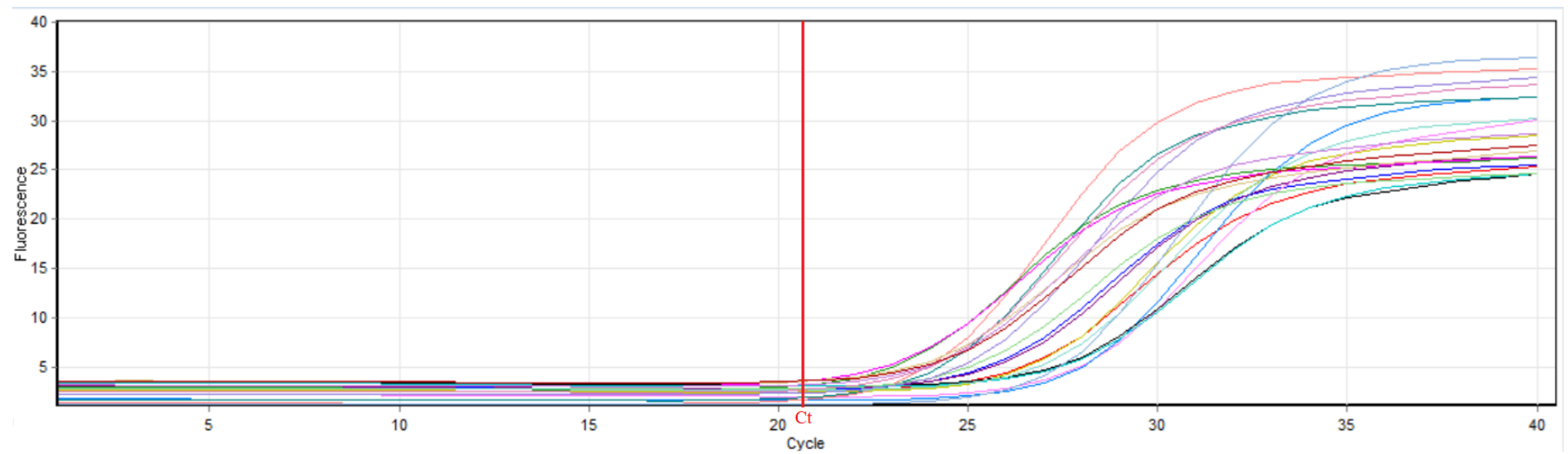
B



C



Obrázek P6 *C. guilliermondii* kultivovaná v biofilmu s CCM na polystyrenu, zobrazovací pole na A je 5 μm , na B je 20 μm a na C je 200 μm . Fotografie byly pořízeny pomocí duálního skenovacího systému s fokusovaným iontovým svazkem (LYRA3 GMH, TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.), vybaveným stíněním elektromagnetického pole, dávkováním plynů, STEM a EDX detektorem a litografií pomocí elektronového svazku.



Obrázek [P7](#) Graf demonstruje příklad výsledné real-time PCR křivky. Graf je zobrazením analýzy kokultur *C. albicans*. Na ose x se nachází počet cyklů a osa y odpovídá hodnotám relativní fluorescence. Každá barevná linie zobrazuje jeden testovaný vzorek. V blízkosti cyklu 20 se nachází Ct hodnota.

Zdroj: Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE.