

Imię i nazwisko autora rozprawy: Katarzyna Gucwa  
Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Oporność patogennych drożdżaków z rodzaju *Candida* na chemoterapeutyki przeciwgrzybowe i nowe sposoby jej przełamania

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Resistance of pathogenic *Candida* yeasts to antifungal chemotherapeutics and new ways of its overcoming

Promotor  <i>podpis</i>	Drugi promotor  <i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy  <i>podpis</i>	Kopromotor  <i>podpis</i>
dr inż. Piotr Szweda	

Gdańsk, rok 2017

*Serdecznie dziękuję Promotorowi Panu Profesorowi dr. hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu za przyjęcie mnie do grona swojego zespołu, ofiarowany mi przez te cztery lata czas i cenne porady podczas pisania rozprawy doktorskiej.*

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu Doktorowi Piotrowi Szwedzie za opiekę merytoryczną, wspaniałą atmosferę pracy, wyrozumiałość oraz za poświęcony mi czas i ogromną, nieocenioną pomoc.*

*Szczególnie mocno dziękuję mojej rodzinie: mojemu mężowi Miłkowi za nieustanne wsparcie, rodzicom i teściom za pomoc w opiece nad synkiem Krzysiem, co ułatwiło mi prowadzenie pracy naukowej.*

*Pragnę również podziękować Pani Profesor Annie Brillowskiej-Dąbrowskiej za życzliwość i cenne porady, a także wszystkim innym pracownikom oraz koleżankom z naszego zespołu.*

## STRESZCZENIE

Liczba dostępnych chemoterapeutyków o aktywności przeciwgrzybowej jest niewielka i obejmuje przede wszystkim leki z grupy tzw. azoli, echinokandyny, antybiotyki z grupy makrolidów polienowych oraz 5-fluorocytozynę. Ze względu na stosunkowo niską toksyczność dla organizmu gospodarza, w terapii chorób grzybiczych najczęściej stosowane są azole. Jednocześnie, ich powszechne stosowanie przyczynia się nieuchronnie do nabywania przez mikroorganizmy oporności na tę grupę związków, a przez to znaczącego obniżenia ich skuteczności.

Poznanie molekularnych mechanizmów oporności jest jednym z możliwych sposobów walki z tym problemem. Innym możliwym podejściem jest poszukiwanie alternatywnych źródeł związków o aktywności przeciwgrzybowej. Obydwa przedstawione tematy zostały podjęte podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Celem badań, których wyniki opisano w rozprawie, było określenie skuteczności obecnie stosowanych leków przeciwgrzybowych wobec licznej grupy izolatów z rodzaju *Candida* izolowanych od pacjentów z polskich szpitali. W dalszym etapie, sprawdzono jakie są możliwe mechanizmy warunkujące oporność na najczęściej stosowaną w terapii grupę leków, czyli azole. W kolejnym etapie, testowano aktywność przeciwgrzybową wybranych produktów pochodzących ze źródeł naturalnych, w tym olejków eterycznych i produktów pszczelich, które mogłyby stanowić alternatywę dla znanych leków. Podjęto także badania dotyczące mechanizmów ich działania przeciwgrzybowego.

W przebadanej puli izolatów *C. glabrata*, 22% wykazywało oporność na flukonazol, a 18,7% wykazywało dodatkowo tzw. oporność krzyżową na cztery testowane azole (flukonazol, posakonazol, itraconazol i worykonazol). Wszystkie przebadane szczepy były wrażliwe na echinokandyny oraz amfoterycynę B. W grupie izolatów *C. albicans*, liczba szczepów zaklasyfikowanych jako odporne na flukonazol zależna była od zastosowanej procedury testowania wrażliwości. Na podstawie testu Sensititre oporność występowała w 29 z 43 szczepów izolowanych od pacjentów ze szpitala w Warszawie i w 19 ze 104 ze szpitala we Wrocławiu, natomiast wyniki uzyskane na podstawie procedury rekomendowanej przez CLSI pozwoliły na oznaczenie oporności odpowiednio w 5 i 2 izolatach. Oporność krzyżowa wystąpiła w 28,2% przypadków. Większość przebadanych izolatów była wrażliwa na echinokandyny, a wszystkie na amfoterycynę B.

Analiza ekspresji genu *CDR1* w grupie izolatów *C. glabrata* wskazała znaczący wzrost poziomu ekspresji w przypadku 86,6% szczepów opornych na flukonazol. Nadekspresja genu *CDR2* występowała w 22,8% izolatów z grupy S-DD i w 35,7% z grupy opornych. W przypadku *C. albicans*, nadekspresja genu *CDR1* występowała w 4 z 5 szczepów opornych na flukonazol (wg metody rekomendowanej przez CLSI), a genu *CDR2* w 3. Dla genu *ERG11* nie zaobserwowano znaczących zmian ekspresji w żadnej z grup wrażliwości.

Znaczącą różnicą w mechanizmach oporności dla obydwu gatunków było występowanie mutacji w genie kodującym demetylazę 14- $\alpha$ -lanosterolu. W genie *ERG11* u gatunku *C. albicans* występowała znaczna liczba różnych mutacji skutkujących zmianami

w sekwencji aminokwasowej. Natomiast, w przypadku gatunku *C. glabrata* nie wykryto żadnej mutacji w odpowiednim genie.

W kolejnym etapie badań testowano aktywność wybranych produktów pochodzenia naturalnego (PPN) wobec drożdży z rodzaju *Candida*. W ramach badań przesiewowych sprawdzono aktywność 38 dostępnych komercyjnie olejków eterycznych z różnych gatunków roślin oraz 50 ekstraktów propolisów pszczelich (EEP) wobec szczepów referencyjnych (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* DSM 11226, *C. albicans* Gu4 i B3 wrażliwe na flukonazol oraz izolaty odporne na flukonazol Gu5 i B4). Dodatkową weryfikację przeciwwgrzybowego potencjału sześciu olejków wykazujących najwyższą aktywność: tymiankowego, cytrynowego, geraniowego, cynamonowego, bazyliowego i goździkowego przeprowadzono na grupie 259 izolatów klinicznych z rodzaju *Candida* (183 *Candida albicans* i 76 *Candida glabrata*). Oznaczone wartości parametru MIC mieściły się w zakresie od 0,002 do 2,5% (v/v), podobnie jak wartości MFC. Aktywność sześciu najaktywniejszych EEP oceniono wobec grupy 69 izolatów, dla których wartości MFC wynosiły od 0,08 do 2,5% (v/v).

Testowano ponadto możliwość występowania synergizmu pomiędzy związkami pochodzenia naturalnego a lekami przeciwgrzybiczymi. W większości przypadków, efekty działania kombinacji zaklasyfikowane zostały jako obojętne, natomiast w przypadku jednoczesnego zastosowania EEP oraz leków z grupy azoli stwierdzono bardzo silne oddziaływanie synergistyczne.

Określono również aktywność wybranych PPN wobec trzech gatunków drożdżaków tworzących biofilm na powierzchniach abiotycznych, w tym na płytkach polistyrenowych oraz cewnikach wykonanych z chlorku poliwinylu oraz silikonu. Zdecydowanie najtrudniejszy do eradykacji biofilm wytwarzany był przez gatunek *C. krusei* a następnie *C. glabrata*. Stężenia umożliwiające eradykację biofilmu w 50% (MBEC<sub>50</sub>) były znacznie wyższe niż MIC<sub>90</sub> wobec komórek w postaci planktonicznej i sięgały 5%.

W ramach realizacji projektu badawczego przeprowadzono również badania mające na celu ustalenie mechanizmów działania PPN o najwyższej aktywności. Uzyskane wyniki wskazują błonę komórkową za najbardziej prawdopodobny cel molekularny badanych PPN, w szczególności EEP. Ściana komórkowa stanowi cel raczej drugoplanowy. Ponadto dowiedziono, że EEP w znaczący sposób ograniczają transformację morfologiczną (tworzenie form mycelialnych) *C. albicans* oraz podwyższają poziom ekspresji genów kodujących transportery wielolekowe. Stwierdzono, że ani olejki eteryczne ani EEP nie powodują nabywania trwałej, dziedzicznej oporności.

Przeprowadzono także badania składu chemicznego wybranych olejków oraz ekstraktów propolisów. W przypadku EEP dokonano jedynie podziału występujących w nich związków na 5 grup. Umożliwiło to jednak stwierdzenie, że składnikami warunkującymi ich aktywność przeciwgrzybową są flawonole. Dla olejków eterycznych przedstawiono dokładną analizę składu chemicznego.

Zastosowanie niektórych PPN mogłoby stanowić interesującą alternatywę do konwencjonalnych terapii przeciwgrzybiczych, jednak z całą pewnością kwestia ta wymaga

wielu dalszych badań szczególnie nad mechanizmem działania. Istotna byłaby również identyfikacja konkretnych składników czy nawet grup związków w największym stopniu wpływających na aktywność i poznanie ich dokładnych celów molekularnych. Oprócz tego niezbędne jest wykonanie badań nie tylko w warunkach *in vitro*, ale także *in vivo*. PPN mogłyby także znaleźć zastosowanie w tzw. terapiach kombinowanych bądź do profilaktyki infekcji grzybiczych.

Słowa kluczowe: oporność na leki, propolis pszczele, olejki eteryczne, biofilm, synergizm, *Candida albicans*, *Candida glabrata*

## SUMMARY

The number of available chemotherapeutic agents with antifungal activity is low and includes primarily azoles, echinocandins, polienes, and 5-fluorocytosine. The most commonly used group of drugs in the treatment of fungal diseases are azoles due to their relatively low toxicity to the host. At the same time, their widespread use inevitably contributes to the acquisition of resistance to this group of compounds by microorganisms, and thus a significant reduction in their effectiveness.

Therefore, getting knowledge of the molecular mechanisms that govern the mechanisms of resistance is one of the possible ways to combat the problem of drug resistance. Another possible approach, is to look for alternative sources of compounds with antifungal activity. Both topics were undertaken during the preparation of this dissertation.

The purpose of the presented study was to determine the susceptibility toward currently used antifungals against a large group of *Candida* isolates isolated from patients from Polish hospitals. In the next experiments, mechanisms of resistance to the most commonly used class of drugs – azoles were evaluated. Due to the fact that resistance has occurred in a significant part of the gathered group of isolates, in the next step, the antifungal activity of naturally occurring compounds, which could be an alternative to synthetic chemotherapy, was tested. Studies on potential mechanisms of action have also been initiated.

In the examined population of *C. glabrata*, 22% of isolates revealed resistance to fluconazole and 18.7% - a cross resistance to four tested azoles (fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole). All the tested strains were susceptible to echinocandins and amphotericin B. In the group of *C. albicans* isolates, the number of fluconazole resistant strains was dependent on the diagnostic method used. Based on the Sensititre test, resistance was reported in 29 out of 43 isolates obtained from patients from hospital in Warsaw and 19 out of 104 from the hospital in Wrocław. The results from the CLSI-recommended method have revealed resistance in 5 and 2 isolates, respectively. Cross resistance occurred in 28.2% of cases. Most of the isolates tested were susceptible to echinocandins and all of them to amphotericin B.

Analysis of *CDR1* gene expression in *C. glabrata* isolates indicated a significant increase in expression level for 86.6% of fluconazole-resistant strains. Overexpression of the *CDR2* gene occurred in 22.8% of isolates from the S-DD group and 35.7% from the resistant group. For *C. albicans*, overexpression of the *CDR1* gene was observed in 4 out of 5 strains resistant to fluconazole (according to the CLSI recommendations) and the *CDR2* gene in 3. No significant expression changes were observed in the *ERG11* gene in any of the susceptibility groups.

A significant difference in resistance mechanisms for both species was the occurrence of mutations in gene coding for the 14- $\alpha$ -lanosterol demethylase. In *C. albicans* *ERG11* gene a huge number of different mutations resulting in changes in the amino acid sequence was identified. However, in the case of *C. glabrata*, no mutations in the sequence of the same gene were detected.

At the next stage of the study, the activity of compounds of natural origin against *Candida* yeasts was tested. In the initial screening phase, the activity of 38 commercially available essential oils of various plant species and 50 extracts of propolis against the reference strains (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* DSM 11226, *C. albicans* Gu4 and B3 susceptible to fluconazole and Gu5 and B4 resistant to fluconazole) was tested. Based on the fungicidal activity toward reference strains, the six most active essential oils: thyme, lemon, geranium, cinnamon, basil and clove, were selected and their activity was further evaluated on a group of 259 *Candida* isolates (183 *C. albicans* and 76 *C. glabrata*). The MIC values determined ranged from 0.002 to 2.5% (v/v), similarly like the MFC values. The activity of the six most active EEPs was assessed against the group of 69 isolates resulting with MFC values ranging from 0.08 to 2.5% (v/v).

The possibility of synergism between compounds of natural origin and antifungals has also been tested. Most of the tested combinations have been classified as indifferent, but in the case of EEP and azoles, a very strong synergistic effect has been identified.

The activity of selected compounds of natural origin was also determined against the three biofilm-producing *Candida* species on abiotic surfaces including polystyrene plates and catheters made of polyvinyl chloride and silicone. Definitely the most difficult to eradicate biofilm was produced by *C. krusei* followed by *C. glabrata*. Concentrations allowing eradication of biofilm in 50% (MBEC<sub>50</sub>) were significantly higher than MIC<sub>90</sub> for plankton cells and reached 5%.

The dissertation presents also the results of the research on mechanisms of action of compounds of natural origin. Their impact on cell walls and membranes as well as morphological transformation and gene expression levels of multi-drug pumps was presented. The obtained results indicate that the cell membrane is the most likely molecular target of compounds of natural origin (in particular propolis extracts). Cell walls comprise probably a secondary target. Furthermore, it has been demonstrated that EEPs significantly limit morphological transformation (creation of mycelial forms) and increases the level of multi-drug transporters in the cell membrane. A preliminary experiment concerning possibility of induction of resistance by tested compounds was also presented. The results obtained indicated that they do not contribute to the acquisition of permanent, inherited resistance.

Finally, the chemical composition of selected oils and propolis extracts was evaluated. For essential oils, a detailed analysis of the chemical composition is provided. In the case of EEPs compounds, they were divided into 5 groups. However, the flavonols were identified as the components that have the highest impact on EEPs' activity.

The use of compounds of natural origin would be an interesting alternative to conventional antifungal therapy, but certainly further research, particularly on the mechanism of action would be required. It would also be important to identify groups of compounds that have the highest impact on activity and to get to know their precise molecular targets. In addition, it is necessary to perform studies not only *in vitro* but also *in vivo*. PPN could also find use in so called combination therapies or prophylaxis of fungal infections.

Key words: drug resistance, apricot propolis, essential oils, biofilm, synergism, *Candida albicans*, *Candida glabrata*



## CEL I ZAKRES PARCY

Liczba zakażeń układowych wywołanych patogenami grzybiczymi ciągle rośnie. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym schorzeń grzybiczych są drożdże z rodzaju *Candida*. Są one jednocześnie przyczyną częstych, nawracających, a co za tym idzie trudnych w leczeniu infekcji powierzchniowych.

Liczba aktualnie dostępnych chemoterapeutyków przeciwgrzybiczych jest niewielka, a jednocześnie nie wszystkie mogą być bezpiecznie stosowane w terapii ze względu na toksyczność dla organizmu gospodarza (np. amfoterycyna B) czy możliwość nabywania oporności (np. 5-fluorocytozyna). Ponadto ciągle brakuje nowych bezpiecznych w użyciu chemoterapeutyków, które mogłyby być z powodzeniem stosowane w terapii infekcji grzybiczych.

W ramach niniejszej pracy postanowiono sprawdzić jak kształtuje się problem lekooporności w stosunku do azoli wśród izolatów izolowanych od pacjentów z polskich szpitali. Oceniono również poziomy wrażliwości na inne dostępne chemoterapeutyki przeciwgrzybicze. Dodatkowy aspektem, który nie był pierwotnym celem niniejszej rozprawy, było porównanie skuteczności dwóch metod określania wrażliwości na flukonazol.

Celem pracy było również oznaczenie, który z mechanizmów oporności na azole, dominuje wśród izolatów pozyskiwanych od pacjentów z polskich szpitali. Określano zarówno poziomy ekspresji najważniejszych genów warunkujących oporność jak i mutacje w kluczowym genie biorący udział w biosyntezie ergosterolu.

Kolejnym celem prowadzonych badań było sprawdzenie możliwości zwalczania patogennych drożdży, głównie lekoopornych, z wykorzystaniem naturalnych substancji nieantybiotykowych: olejków eterycznych i etanolowych ekstraktów propolisu pszczelego. Celem tej części badań było przede wszystkim ustalenie, które produkty wykazują największą aktywność i w jakim zakresie stężeń. Sprawdzano ich skuteczność do zwalczania biofilmu utworzonego na różnych powierzchniach abiotycznych. Testowano czy produkty pochodzenia naturalnego mogą oddziaływać synergistycznie w połączeniu z lekami stosowanymi powszechnie w terapii infekcji grzybiczych. Przeprowadzono analizę składu chemicznego w celu ustalenia, które związki bądź grupy związków mogą potencjalnie wpływać na aktywność produktów naturalnych. Przeprowadzono także szereg badań mających na celu określenie możliwych mechanizmów działania przeciwdrobnoustrojowego testowanych produktów. Sprawdzano również czy olejki i propolis pszczele mogą wpływać hamująco na tworzenie form mycelialnych, które są jednym z czynników patogenności gatunku *C. albicans*.

## SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE .....	3
SUMMARY .....	6
CEL I ZAKRES PARCY .....	9
WYKAZ SKRÓTÓW .....	14
1. WSTĘP TEORETYCZNY .....	16
1.1. Molekularne mechanizmy oporności .....	16
1.1.1. Mechanizmy oporności na chemoteraputyki przeciwgrzybowe z grupy azoli .....	19
1.1.1.1. Zwiększona ekspresja genów ERG .....	19
1.1.1.2. Mutacje w genie ERG11 .....	20
1.1.1.3. Nadekspresja genów kodujących pompy wielolekowe .....	21
1.1.1.4. Mechanizmy oporności dominujące u drożdżaków z rodzaju Candida .....	25
1.1.2. Specyficzne mechanizmy oporności komórek Candida spp. w strukturze biofilmu .....	25
1.1.2.1. Obniżone tempo wzrostu .....	26
1.1.2.2. Zmieniona ekspresja genów .....	26
1.1.2.3. Nadekspresja genów kodujących pompy wielolekowe .....	27
1.1.2.4. Komórki przetrwalne .....	27
1.1.2.5. Macierz zewnątrzkomórkowa .....	28
1.1.2.6. Odpowiedź na stres .....	29
1.1.2.7. Unikanie odpowiedzi immunologicznej .....	29
1.2. Alternatywne do istniejących chemoterapeutyków przeciwgrzybowych nie-antybiotyczne związki pochodzenia naturalnego .....	30
1.2.1. Charakterystyka olejków eterycznych: właściwości, aktywność przeciwdrobnoustrojowa oraz mechanizmy działania .....	32
1.2.2. Charakterystyka najaktywniejszych składników olejków eterycznych .....	34
1.2.2.1. Tymol .....	34
1.2.2.2. Aldehyd trans-cynamonowy .....	35
1.2.2.3. Eugenol .....	36
1.2.2.4. Cytral .....	36
1.3. Charakterystyka ekstraktów propolisów: właściwości, aktywność przeciwdrobnoustrojowa oraz mechanizmy działania .....	36
1.4. Aktywność nie-antybiotycznych produktów pochodzenia naturalnego w zwalczaniu biofilmu .....	40
1.5. Oporność drobnoustrojów na nie-antybiotyczne produkty pochodzenia naturalnego .....	41
2. MATERIAŁY I METODY .....	43

2.1.	Drobnoustroje będące przedmiotem badań .....	43
2.2.	Sprzęt i materiały laboratoryjne .....	43
2.3.	Stosowane podłoża .....	44
2.4.	Komercyjnie dostępne zestawy reakcyjne: .....	46
2.5.	Odczynniki stosowane do elektroforezy DNA w żelach agarozowych .....	47
2.6.	Roztwory .....	47
2.7.	Inne stosowane związki i odczynniki .....	48
2.8.	Olejki eteryczne .....	48
2.9.	Propolis pszczele i otrzymywanie ich ekstraktów etanolowych (EEP) .....	49
2.10.	Badania aktywności leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybiczych .....	50
2.10.1.	Ocena lekowrażliwości z zastosowaniem testu Sensititre .....	50
2.10.2.	Ocena wrażliwości na flukonazol z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeniowej rekomendowanej przez CLSI .....	50
2.11.	Badania mechanizmów oporności na najczęściej stosowane leki przeciwgrzybicze .	51
2.11.1.	Badanie poziomu ekspresji genów .....	51
2.11.1.1.	Procedura izolacji RNA z drożdżaków Candida .....	51
2.11.1.2.	Odwrotna transkrypcja .....	52
2.11.1.3.	Reakcja real time PCR .....	53
2.11.2.	Sekwencjonowanie genu ERG11 C. albicans .....	55
2.12.	Badania aktywności produktów pochodzenia naturalnego .....	56
2.12.1.	Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost .....	56
2.12.2.	Wyznaczanie minimalnego stężenia grzybobójczego .....	57
2.12.3.	Wyznaczanie synergizmu leków przeciwgrzybiczych z produktami pochodzenia naturalnego .....	57
2.12.3.1.	Metoda dyfuzyjno-krażkową .....	57
2.12.3.2.	Metoda checkerboard .....	58
2.12.4.	Aktywność PPN w eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych	59
2.12.5.	Aktywność PPN w eradykacji biofilmu z powierzchni cewników silikonowych oraz PVC	59
2.12.6.	Wpływ produktów pochodzenia naturalnego na kinetykę wzrostu .....	59
2.12.6.1.	„Time kill assay” .....	60
2.12.6.2.	Fluorescencyjna cytometria przepływowa .....	60
2.13.	Badanie mechanizmów aktywności produktów pochodzenia naturalnego .....	60
2.13.1.	Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na ścianę komórkową ..	60
2.13.1.1.	Obserwacje z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego .....	60
2.13.1.2.	Próba z zastosowaniem sorbitolu, czynnika stabilizującego ciśnienie .....	61
2.13.2.	Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na błonę komórkową ....	61
2.13.2.1.	Próba wiązania ergosterolu .....	61
2.13.2.2.	Pomiar depolaryzacji błony komórkowej .....	61
2.13.2.3.	Pomiar wypływu jonów potasu .....	62
2.13.3.	Badanie wpływu EEP na morfogenezę .....	62



2.13.4.	Wpływ ekstraktów etanolowych propolisów na pompy typu ABC .....	63
2.13.4.1.	Obserwacje z zastosowaniem szczepów znakowanych GFP .....	63
2.13.4.1.1.	Transformacja komórek <i>C. albicans</i> .....	63
2.13.4.1.2.	Obserwacje z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego .....	66
2.13.4.2.	Analiza ekspresji genów kodujących pompy typu ABC .....	66
2.13.4.2.1.	Przygotowanie komórek .....	66
2.13.4.2.2.	Izolacja RNA .....	67
2.13.4.2.3.	Usuwanie DNA .....	67
2.13.4.2.4.	Odwrotna transkrypcja .....	68
2.13.4.2.5.	Reakcja qPCR .....	68
2.14.	Wpływ związków pochodzenia naturalnego na nabywanie oporności .....	69
2.15.	Ocena składu chemicznego produktów pochodzenia naturalnego .....	70
2.15.1.	Ocena składu chemicznego propolisów .....	70
2.15.2.	Ocena składu chemicznego olejków eterycznych .....	70
3.	WYNIKI .....	71
3.1.	Analiza wrażliwości i lekooporności szczepów klinicznych drożdżaków z rodzaju <i>Candida</i> izolowanych od pacjentów .....	71
3.1.1	Ocena podatności na działanie leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybiczych .....	71
3.1.2	Analiza przyczyn lekooporności wyselekcjonowanych izolatów .....	76
3.1.2.1.	Analiza ekspresji genów odpowiadających za oporność <i>C. albicans</i> .....	77
3.1.2.2.	Analiza ekspresji genów odpowiadających za oporność drożdży <i>C. glabrata</i> .....	81
3.1.2.3.	Analiza mutacji w genie <i>ERG11</i> .....	84
3.2.	Analiza aktywności przeciwgrzybowej in vitro produktów pochodzenia naturalnego mogących stanowić alternatywę wobec obecnie stosowanych leków przeciwgrzybowych .....	88
3.2.1.	Aktywność olejków eterycznych .....	88
3.2.2.	Porównanie aktywności olejku cynamonowego i aldehydu cynamonowego .....	92
3.2.3.	Określenie kinetyki efektu grzybobójczego olejków eterycznych .....	94
3.2.3.1.	Fluorescencyjna cytometria przepływowa .....	95
3.2.3.2.	„Time kill assay” .....	96
3.2.4.	Aktywność ekstraktów etanolowych propolisów .....	98
3.2.5.	Wpływ ekstraktów propolisu na kinetykę wzrostu drobnoustrojów .....	99
3.2.6.	Badanie działania kombinacji leków przeciwgrzybiczych z produktami pochodzenia naturalnego .....	100
3.2.6.1.	Określanie efektu skojarzonego działania metodą dyfuzyjno-krażkową .....	101
3.2.6.2.	Badanie efektu skojarzonego działania metodą checkerboard .....	104
3.2.7.	Efektywność eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych przez EEP .....	105
3.2.8.	Efektywność eradykacji biofilmu z powierzchni cewników silikonowych oraz PVC .....	108

3.3. Badanie mechanizmów aktywności przeciwgrzybowej produktów pochodzenia naturalnego .....	110
3.3.1. Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na ścianę komórkową ....	110
3.3.1.1. Obserwacje mikroskopowe .....	110
3.3.1.2. Wpływ obecności czynnika stabilizującego ciśnienie osmotyczne na efekt grzybostatyczny.....	112
3.3.2. Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na błonę komórkową.....	113
3.3.2.1. Wpływ obecności ergosterolu w podłożu na efekt grzybostatyczny .....	113
3.3.2.2. Określanie stopnia depolaryzacji błony komórkowej .....	113
3.3.2.3. Indukcja wypływu jonów potasu pod działaniem produktów pochodzenia naturalnego .....	115
3.3.3. Wpływ EEP na morfogenezę.....	116
3.3.4. Wpływ związków naturalnych na poziomy ekspresji genów kodujących pompy wielolekowe .....	119
3.3.5. Wpływ EEP ekstraktów etanolowych propolisów na biosyntezę pomp typu ABC ....	125
3.3.5.1. Transformacja komórek <i>C. albicans</i> .....	125
3.3.5.2. Wpływ EEP na biosyntezę Cdr1p i Cdr2p.....	126
3.4. Próba indukcji oporności <i>C. albicans</i> na działanie produktów pochodzenia naturalnego .....	129
3.5. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych .....	132
3.6. Ocena składu chemicznego propolisów .....	136
DYSKUSJA .....	138
PODSUMOWANIE .....	149
PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ.....	150
WYKAZ LITERATURY .....	152
SPIS DOROBKU .....	168

## WYKAZ SKRÓTÓW

ABC	rodzina białek transporterów wielolekowych, <i>ang. ATP Binding Cassette</i>
ACT1	gen kodujący aktywę, gen referencyjny
AmB	amfoterycyna B
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Komórkowych, <i>ang. American Type Culture Collection</i>
CDR1	gen kodujący białko Cdr1p
Cdr1p	transporter wielolekowy z rodziny ABC, <i>ang. Candida Drug Resistance 1</i>
CDR2	gen kodujący białko Cdr2p
Cdr2p	transporter wielolekowy z rodziny ABC, <i>ang. Candida Drug Resistance 2</i>
CLSI I	Instytut ds. Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych, <i>ang. Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DiBAC <sub>4</sub>	<i>ang. (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol)</i>
DMSO	dimetylosulfotlenek
EEP	ekstrakt etanolowy propolisu
EO	olejek eteryczny, <i>ang. essential oil</i>
ERG11	gen kodujący demetylazę 14- $\alpha$ -lanosterolu
FDA	dioctan fluoresceiny, <i>ang. Fluorescein Diacetate</i>
FIC	<i>ang. Fractional Inhibitory Concentration</i>
FL	flukonazol
GFP	białko zielonej fluorescencji, <i>ang. green fluorescent protein</i>
LSC2	gen kodujący podjednostkę $\beta$ ligazy bursztynylo-CoA
MBEC <sub>50</sub>	minimalne stężenie eradykujące biofilm w 50% ( <i>ang. minimal biofilm eradication concentration</i> )
Mdr1	gen kodujący białko Mdr1p
Mdr1p	transporter wielolekowy z rodziny MFS, <i>ang. Multi Drug Resistance 1</i>
MFC	minimalne stężenie grzybobójcze, <i>ang. Minimal Fungicidal Concentration</i>
MFS	rodzina białek MFS, <i>ang. Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost, <i>ang. minimal inhibitory concentration</i>
MOPS	kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy
MTT	<i>ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NAT	gen kodujący acetylotransferazę nourseotrycyny
OD <sub>660</sub>	gęstość optyczna mierzona przy długości fali $\lambda = 660$ nm, <i>ang. optical density</i>
PBS	bufor fosforanowy, <i>ang. Phosphate-buffered saline</i>
PI	jodek propidyny, <i>ang. propidium iodide</i>
PMA1	gen kodujący ATPazę jonów H <sup>+</sup> , gen referencyjny
PPN	produkty pochodzenia naturalnego
PVC	chlorek poliwinylu, <i>ang. Polyvinyl chloride</i>
RIP1	gen kodujący kinazę serynowo-treoninową 1, <i>ang. Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1</i> , gen referencyjny

RPMI 1640	<i>ang. Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
S-DD	wrażliwe zależnie od dawki, <i>ang. Susceptible-Dose-Dependent</i>
SYO	komercyjny test wrażliwości drożdży na leki, <i>ang. Sensititre Yeast One</i>
<i>Ura3</i>	gen kodujący Dekarboksylazę Orotydyno-5'-fosforanu, <i>ang. Orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase</i> , gen referencyjny
XTT	<i>ang. (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)</i>
YPD	podłoże, ekstrakt-pepton-dekstroza, <i>ang. Yeast Extract Peptone-Dextrose</i>

## 1. WSTĘP TEORETYCZNY

Do niedawna drożdżaki z rodzaju *Candida* uważane były za organizmy saprofitycznie normalnie bytujące w organizmie zdrowego człowieka, jednocześnie rzadko wywołujące poważne schorzenia. Jednak w ciągu ostatnich około 30 lat obserwowany jest ciągły wzrost liczby układowych zakażeń grzybiczych. Ma to związek z rozwojem medycyny, zwłaszcza w zakresie transplantologii, leczenia nowotworów, wydłużeniem czasu przeżycia chorych poddanych leczeniu immunosupresyjnemu, chorych z upośledzeniem odporności oraz wprowadzeniem bardziej inwazyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Problemem jest także nadmierne stosowanie chemoterapeutyków o szerokim spektrum aktywności, zarówno w lecznictwie jak i profilaktyce (Al Thaqafi et al., 2014). Dlatego też coraz częściej ze środowisk szpitalnych izolowane są od pacjentów szczepy lekooporne, bądź też zaliczane do gatunków, które uprzednio rzadko identyfikowano jako czynnik etiologiczny infekcji. W efekcie, obserwuje się zwiększenie śmiertelności z powodu zakażeń grzybiczych. Obecnie kandydozy stanowią czwartą co do częstotliwości występowania przyczynę zakażeń szpitalnych, a śmiertelność w wyniku zakażenia wynosi od 15 do 35%, w zależności od gatunku je wywołującego (Pfaller & Diekema, 2007). Za najpowszechniejszy patogen człowieka z rodzaju *Candida* uznaje się *C. albicans*, jednak ostatnio coraz częściej izoluje się szczepy zaliczane do innych gatunków, które w literaturze określa się wspólną nazwą *non-albicans*. Spośród nich, najpowszechniejszy jest *C. glabrata*. Gatunek ten nie posiada wielu czynników wirulencji charakterystycznych dla innych przedstawicieli rodzaju, takich jak tworzenie grzybni, wydzielanie enzymów proteolitycznych czy fosfolipaz oraz adhezyn odpowiedzialnych za adhezję do tkanek gospodarza (Kaur et al., 2005) (Rodrigues et al., 2014). Uważa się, że zwiększenie liczby infekcji wywołanych przez *C. glabrata* jest głównie wynikiem jego naturalnie niskiej podatności na tzw. azole, środki powszechnie stosowane do leczenia, a także profilaktyki zakażeń grzybiczych. Podobnie jak w przypadku innych gatunków z rodzaju *Candida* (szczególnie *C. albicans*), *C. glabrata* należy do naturalnej mikroflory jamy ustnej, przewodu pokarmowego i dróg rodnych ludzkiego organizmu. Eliminacja innych gatunków drożdży z organizmu gospodarza poprzez nadużywanie azoli prowadzi do selekcji opornych szczepów, w tym *C. glabrata*, co powoduje różne objawy kliniczne, począwszy od drobnych infekcji błon śluzowych do zagrażających życiu zakażeń ogólnoustrojowych.

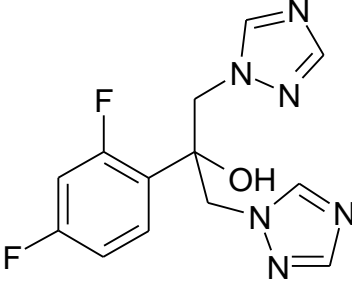
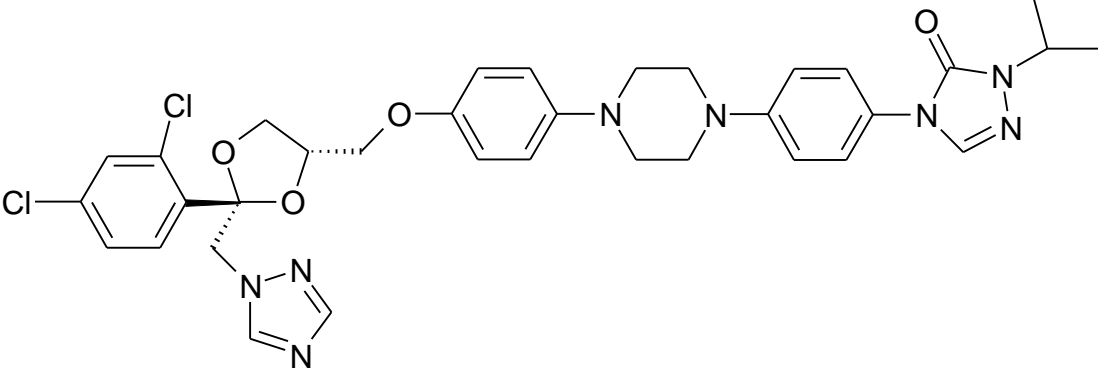
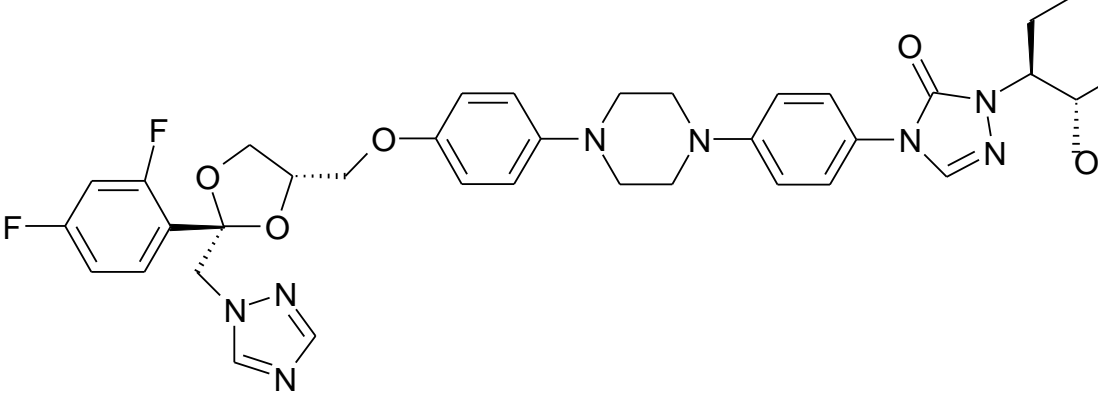
### 1.1. Molekularne mechanizmy oporności

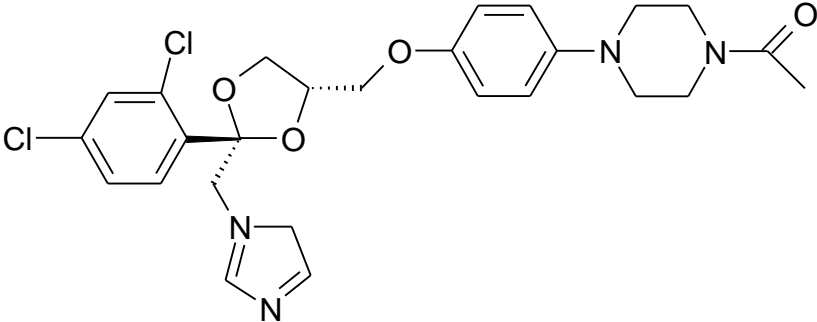
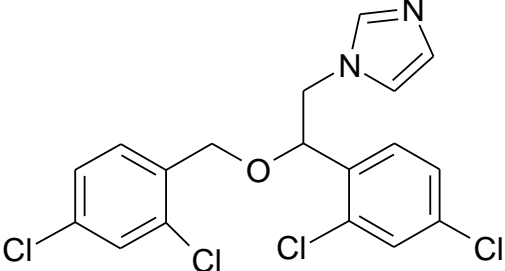
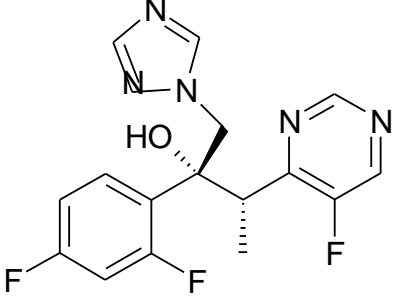
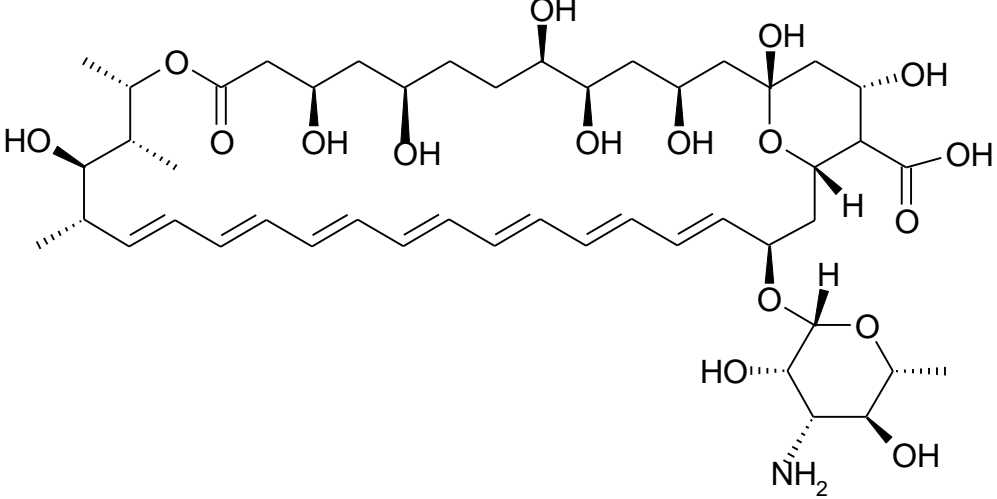
Obecnie dostępnych jest kilka klas antymykotyków, o różnych mechanizmach działania grzybobójczego bądź grzybobójczego. Tak zwane "azole", takie jak flukonazol, ketokonazol, itraconazol, mikonazol, worykonazol, posakonazol czy rosakonazol blokują biosyntezę ergosterolu przez inhibicję enzymatycznej demetylacji lanosterolu. Ponadto są one odpowiedzialne za brak możliwości budowania i odnowy steroli w błonie komórkowej oraz uniemożliwianie niektórych procesów życiowych, takich jak transport komórkowy, sygnalizacja molekularna, endocytoza i egzocytoza. Leki kolejnej ważnej grupy, tzw. makrolidów polienowych, np. amfoterycyna B, nystatyna czy pimarcyna łączą się z cząsteczkami

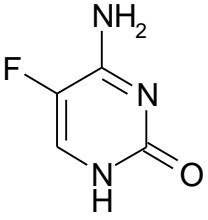


ergosterolu w błonie komórkowej, skutkując tworzeniem por w błonie, a przez to wzrostem jej przepuszczalności. Leki najnowszej grupy, tzw. echinokandyny, wśród nich kaspofungina, hamują biosyntezę głównego składnika ściany komórkowej  $\beta$ -glukanu. Dodatkowo wyróżnić można antymetabolity, takie jak 5-fluorocytozyna, które hamują syntezę RNA i białek oraz inhibitory syntazy chityny (Rodrigues et al., 2014). Te ostatnie jednak, nie są stosowane w leczeniu. Wzory strukturalne najważniejszych leków przeciwgrzybowych przedstawione są w Tabeli 1. 1.

**Tabela 1. 1.** Wzory strukturalne wybranych leków przeciwgrzybowych

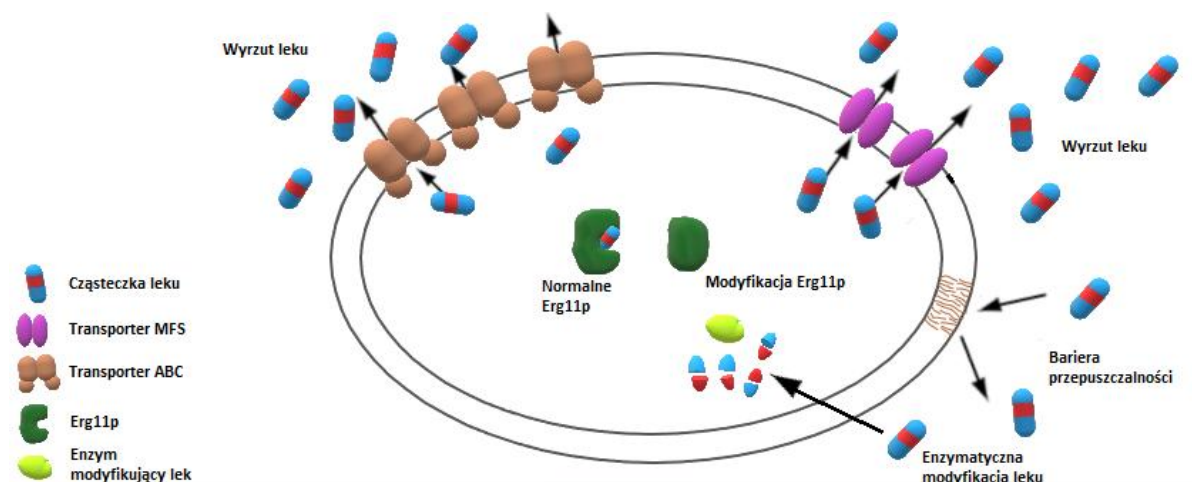
Lek przeciwgrzybowy	Struktura
Flukonazol	
Itrakonazol	
Posakonazol	

Lek przeciwgrzybowy	Struktura
Ketokonazol	 <p>The structure of Ketokonazol features a central 1,3-dioxolane ring. One carbon of this ring is bonded to a 2,4-dichlorophenyl group. Another carbon is bonded to a 1,2,4-triazole ring. The third carbon is bonded to a 4-(1-(4-(acetamido)phenyl)piperidin-4-yl)oxy group.</p>
Mikonazol	 <p>The structure of Mikonazol consists of a central 1,3-dioxane ring. One carbon is bonded to a 2,4-dichlorophenyl group. Another carbon is bonded to a 1,2,4-triazole ring. The third carbon is bonded to a 2,4-dichlorophenyl group.</p>
Worykonazol	 <p>The structure of Worykonazol features a central 1,3,4-oxadiazole ring. One carbon is bonded to a 2,4-difluorophenyl group. Another carbon is bonded to a 2-fluoropyrimidin-5-yl group. The third carbon is bonded to a hydroxyl group.</p>
Amfoterycyna B	 <p>The structure of Amfoterycyna B is a complex polyene macrolide. It features a long, branched polyene chain with multiple double bonds. The chain is substituted with several hydroxyl groups and a 2-amino-2-deoxyribose sugar moiety. The sugar moiety is attached to the polyene chain via an oxygen atom.</p>

Lek przeciwgrzybowy	Struktura
5-fluorocytozyna	

### 1.1.1. Mechanizmy oporności na chemoteraputyki przeciwgrzybowe z grupy azoli

Mechanizmy oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe klasyfikowane są jako pierwotne lub nabyte i powiązane są ze swoistymi bądź nabytymi cechami patogenów (Sardi et al., 2013). Jednym z ważnych mechanizmów przystosowania do warunków środowiska takich jak odpowiedź gospodarza bądź działanie chemoterapeutyku przeciwgrzybowego jest zmienność (plastyczność) genomowa. Przykładowo, gatunek *C. glabrata* utracił w swoim genomie geny odpowiedzialne za asymilację galaktozy i sacharozy, a także biosyntezę tymidyny, pirydoksyny i kwasu nikotynowego (Kaur et al., 2005; Sardi et al., 2013). W przypadku oporności drożdżaków z rodzaju *Candida* na azole, kluczową rolę odgrywają: nadekspresja genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie ergosterolu oraz mutacje w obrębie tych genów skutkujące zmianami sekwencji aminokwasowej oraz nadekspresja genów kodujących transportery lekowe oraz mutacje w obrębie czynników transkrypcyjnych regulujących transkrypcję tych genów. Wybrane mechanizmy oporności przedstawione są na Rys. 1. 1.



Rys. 1. 1. Mechanizmy oporności drożdżaków z rodzaju *Candida* na azole

#### 1.1.1.1. Zwiększona ekspresja genów ERG

Zwiększona ekspresja genów zaangażowanych w biosyntezę ergosterolu, spośród których najważniejsze są *ERG1*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG9*, a w szczególności *ERG11* jest jednym z najważniejszych mechanizmów oporności na azole. Produkt genu *ERG11*, enzym



demetylaza lanosterolowa, czyli główny cel molekularny azoli, odpowiedzialny jest za konwersję lanosterolu do 4,4-dimetylocholesta-8, 14, 24-trienolu. Uznaje się, że ma on centralne znaczenie przy wzroście produkcji ergosterolu w odpowiedzi na działanie związków azolowych na drożdżaki *Candida*, a szczególnie *C. glabrata*, który cechuje się naturalną opornością na tę grupę związków (Akins, 2005; Henry et al., 2000). Potencjalne mechanizmy oporności tłumaczone są wysoką nadekspresją genu *ERG11* lub małym powinowactwem cząsteczek leku do demetylasy 14  $\alpha$  – lanosterolu.

Nadekspresja genu *ERG11* uznawana jest za potencjalny mechanizm oporności, ponieważ przyczynia się ona do wzrostu ilości ergosterolu w błonie komórkowej, co utrudnia dyfuzję leku do wnętrza komórki. Hipotezę taką potwierdzają przykładowo wyniki uzyskane przez zespół badawczy Marichala, który stwierdził ośmiokrotny wzrost poziomu mRNA genu *ERG11* izolatu *C. glabrata* opornego na flukonazol, uzyskanego od pacjenta leczonego flukonazolem w dawce 400 mg dziennie w stosunku do izolatu wrażliwego (Timmerman et al., 1997). Jednak część doniesień literaturowych zdaje się zaprzeczać temu, że wzrost ekspresji genu *ERG11* koreluje z jednoczesną opornością na flukonazol. Przykładowo Sanguinetti określił, że poziom ekspresji genu *ERG11* w populacji 29 izolatów w tym 20 opornych, był na poziomie wrażliwego szczepu referencyjnego (Sanguinetti et al., 2005). Podobną zależność zaobserwowali również Xu i wsp. (Xu et al., 2015).

Czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ekspresję genu *ERG11*, a także innych genów zaangażowanych w biosyntezę ergosterolu jest Upc2p należący do rodziny cynkowych czynników transkrypcyjnych. Nadekspresja genów kodujących białko Upc2p prowadzi do zmniejszenia wrażliwości na flukonazol, natomiast jego brak bądź uszkodzenie skutkuje zmniejszoną akumulacją egzogennych steroli w komórce. Przy niskim poziomie ergosterolu komórki stają się bardzo wrażliwe na leki z grupy azoli. Niski poziom ergosterolu jest poza tym, przy braku mutacji, pozytywnym regulatorem transkrypcji. Mutacja w obrębie genu kodującego Upc2p może doprowadzić do konstytutywnej aktywacji transkrypcji i ciągłej produkcji ergosterolu. Dunkel i in. stwierdzili, że mutacja tylko jednego nukleotydu w obrębie genu kodującego Upc2p, prowadząca do substytucji G484D, powoduje konstytutywny wzrost ekspresji genu *ERG11*, co skutkuje zwiększoną opornością na inhibitory biosyntezy ergosterolu takie jak flukonazol (Dunkel et al., 2008). Identyfikowane są także inne mutacje w obrębie sekwencji aminokwasowej Upc2p. W badaniach Heilmanna i wsp. substytucja alaniny na treoninę w pozycji 643 również skutkowałą wzrostem ekspresji genu *ERG11*. To z kolei prowadziło do trwałej aktywacji syntezy ergosterolu i pojawieniem się oporności na flukonazol w szczepach początkowo wrażliwych na jego działanie. Izolat kliniczny tracił wrażliwość na flukonazol, lecz w mniejszym stopniu niż w wypadku substytucji G484D, co świadczy o tym, że mutacja ta ma mniejsze znaczenie przy nabywaniu oporności (Heilmann et al., 2010).

#### 1.1.1.2. Mutacje w genie *ERG11*

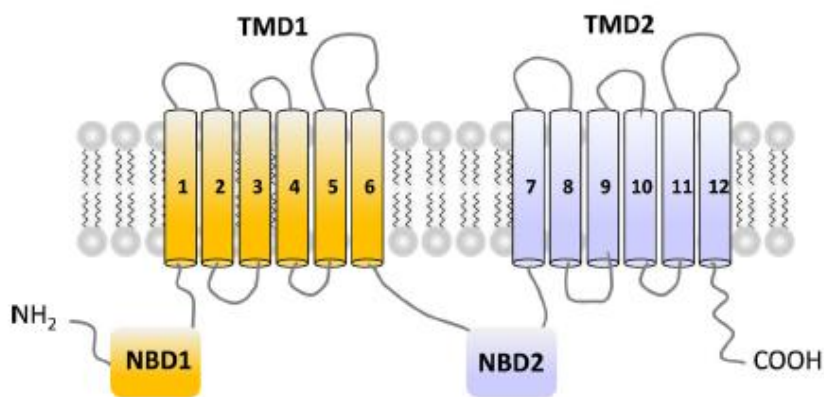
Mutacje powstałe podczas ekspozycji patogenu na działanie leku mogą być przyczyną oporności nabytej (Calcagno et al., 2003; Stead et al., 2010). Mutacje punktowe w sekwencji

genu *ERG11* mogą przyczyniać się do zmian w powinowactwie azoli do ich celu molekularnego, a więc do enzymu CYP51A1 (Sanglard et al., 1998). W literaturze opisywano już ponad 140 różnych mutacji u klinicznych izolatów *C. albicans*, które skutkują substytucjami w obrębie sekwencji aminokwasowej tego białka. Ten znaczący polimorfizm genetyczny świadczy o tym, że demetylaza 14 $\alpha$ -lanosterolu jest wyjątkowo podatna na różne zmiany. Interesujące jest to, że większość z opisywanych mutacji zgrupowana jest w trzech regionach tzw. *hot spot*. W sekwencji aminokwasowej są to pozycje od 105 do 165 (fragment białka formujący kanał, przez który substraty i inhibitory docierają do centrum aktywnego), 266 do 287 oraz 405 do 488 (fragmenty białka odpowiedzialne za wiązanie grupy prostetycznej – hemu z atomem żelaza, który jest bezpośrednim celem molekularnym azoli). Nie każda mutacja w równym stopniu przyczynia się jednak do nabywania oporności. Ustalono, iż substytucjami, które najczęściej występują w białku Erg11p szczepów opornych są: K143R, S405F, G464S, R467K oraz I471T. Inne zmiany takie jak E266D, V488I prawdopodobnie nie mają wpływu na powstawanie oporności, gdyż stwierdzono ich obecność zarówno w szczepach opornych jak i wrażliwych. Zidentyfikowano także, że zmianami mogącymi przyczyniać się do zyskiwania oporności są: T315A, Y118A, Y118F i Y118T, jednak ich obecności nie potwierdzono w izolatach klinicznych. Mutacje nie muszą w równym stopniu przyczyniać się do oporności na wszystkie azole. Część może skutkować brakiem wrażliwości na jeden chemoterapeutyk przeciwgrzybiczy, inne mogą wywoływać tzw. oporność krzyżową. Mutacja R467K u *C. albicans* skutkuje zmianami w obrębie centrum aktywnego enzymu, a przez to opornością na flukonazol, nie wywołuje jednak oporności na itrakonazol czy worykonazol. Substytucja Y132H wpływa na interakcje hemowej grupy w centrum aktywnym enzymu z flukonazolem, a przez to na zmniejszone jego powinowactwo. Mutacje Y137H oraz G464S mogą skutkować spadkiem wrażliwości na worykonazol, flukonazol i itrakonazol jednocześnie. Mutacje przyczyniające się do oporności mogą być pojedyncze jak A129G lub mogą się pojawiać po kilka w obrębie jednego genu np. R467K jednocześnie z G464S. Współistnienie dwóch mutacji może być przyczyną znacznego obniżenia wrażliwości szczepu. Zależność między mutacjami punktowymi, a opornością powiązana jest z miejscem wystąpienia zmiany. Kluczowe znaczenie wydają się mieć mutacje warunkujące substytucje w centrum aktywnym, natomiast mutacje niezwiązane z opornością odnajdywane są w szczepach wrażliwych jak i niewrażliwych zarówno w rejonach *hot spot* jak i poza rejonem miejsca aktywnego (Feng et al., 2010; Morio et al., 2010).

#### 1.1.1.3. Nadekspresja genów kodujących pompy wielolekowe

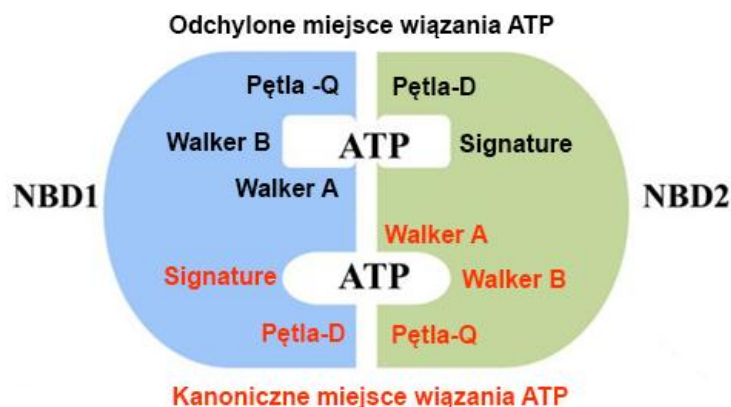
Innym ważnym mechanizmem oporności na azole jest nadekspresja genów kodujących transportery typu ABC (ATP Binding Cassette) (Rodrigues et al., 2014). Mechanizm oporności, który opiera się o nadprodukcję pomp wielolekowych powiązany jest z brakiem możliwości akumulowania chemoterapeutyków przeciwgrzybowych w komórce drożdżaka. Początkowo tłumaczony był on zmniejszonym napływem leku do komórki ze względu na niski poziom ergosterolu w błonie bądź zmniejszonym stosunkiem zawartości fosfatydylocholino do fosfatydyloetanolaminy. Jednakże zdecydowana większość odkryć wskazuje na to, że

podstawowym mechanizmem oporności jest zwiększony poziom usuwania z komórki leków z wykorzystaniem mechanizmów transportu aktywnego. Oporność jest często tłumaczona zwiększoną ekspresją genów kodujących pompy wielolekowe. Są to przede wszystkim białka z rodziny Cdr, które należą do transporterów typu ABC, oraz białko Mdr1p, o szerokim spektrum substratowym. Transportery typu ABC działają jako pompy molekularne, które w sposób aktywny transportują leki poza komórkę. Źródłem energii dla transporterów jest hydroliza wiązań fosforanowych w ATP. Uzyskana energia wykorzystywana jest do transportu substratów przez błonę wbrew gradientowi stężeń. Charakterystyczną cechą transporterów ABC jest ich polispecyficzność, co oznacza, że są zdolne do transportu strukturalnie niepowiązanych ksenobiotyków w tym leków. Ma to szczególne znaczenie w chemoterapii, gdyż nabyta oporność dla jednego leku, skutkuje nabywaniem jej także dla innych z danej grupy. Białka ABC zbudowane są z dwóch domen transmembranowych (TMDs *ang. transmembrane-spanning domain*) i dwóch domen wiążących nukleotydy po stronie cytoplazmatycznej (NBDs *ang. nucleotide-binding domains*) (Rys. 1. 2). Najlepiej poznaną pompą wielolekową należącą do rodziny ABC jest produkt genu *CDR1*. Jest to integralne białko błonowe o długości 1501 aminokwasów i o masie molekularnej 169,9 kDa. Kanał kodowany przez gen *CDR1* składa się z dwóch homologicznych części, a każda z nich z N-terminalnej domeny hydrofilowej i C-terminalnej domeny hydrofobowej. Część hydrofobowa zbudowana jest z sześciu  $\alpha$ -helis i odpowiedzialna jest za kotwiczenie pompy w błonie (Shukla et al., 2003).



**Rys. 1. 2.** Topologia transportera Cdr1p należącego do rodziny ABC [18]

Domena hydrofilowa składa się z elementów zdolnych do wiązania cząsteczek ATP. Dwa składowe miejsca wiążące ATP: kanoniczne miejsce wiązania ATP (oznaczone na pomarańczowo na rysunku 1.3.) i odchylone miejsce wiązania ATP (*ang. deviant ATP site*) (oznaczone kolorem czarnym), utworzone są poprzez połączenie obydwu domen NBD. Kanoniczne miejsce ATP składa się z motywów Walker A i B oraz pętli Q pochodzących z NBD2 oraz sekwencji aminokwasowej SGG (signature) i pętli D pochodzących z NBD1, podczas gdy odchylone miejsce wiązania ATP składa się z motywów Walkera A i B oraz pętli Q z NBD1 i sekwencji NVE (signature) i pętli D pochodzących z NBD2 (Prasad et al., 2015a).



**Rys. 1. 3.** Budowa domen NBD wchodzących w skład białka Cdr1p

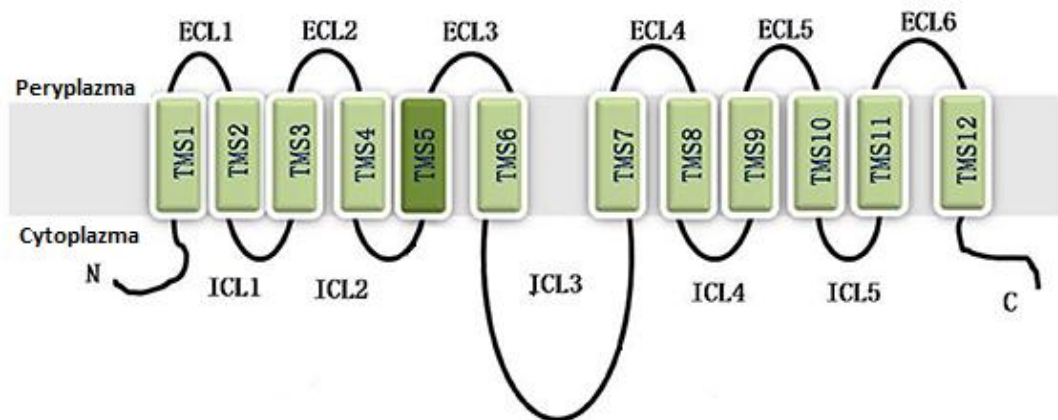
W typowym cyklu wypływu leku, chemoterapeutyk wiąże się do pierwszej domeny TMD. Wiązanie to powoduje zmiany konformacyjne, przez które każda z domen NBD zbliża się do drugiej, tworząc miejsca wiązania ATP. Związanie się dwóch cząsteczek ATP umożliwia przejście białka do drugiego stanu konformacyjnego, z otwartego wewnątrz komórki do otwartego na zewnątrz. W nowopowstałej konformacji obydwie domeny NBD zostają połączone z cząsteczkami ATP, a zewnętrzna część domeny TMD zostaje otwarta do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie następuje uwolnienie leku, przez jego zmienione powinowactwo do białka. Hydroliza ATP umożliwia powrót do konformacji wyjściowej (Martinez et. al., 2014).

Do tej pory zidentyfikowano 28 genów kodujących transportery typu ABC u *C. albicans*, lecz tylko w przypadku *CDR1* oraz *CDR2* jednoznacznie wykazano powiązanie z narastaniem oporności na flukonazol. Istnieją jednak przesłanki, że dodatkowe geny znajdujące się na chromosomach 3 i 4 mogą być powiązane z opornością na flukonazol u *C. albicans*. Monosomia czwartego chromosomu pojawiająca się po siedmiu dniach inkubacji w obecności flukonazolu bądź trisomia chromosomu trzeciego przy inkubacji 35-40-dniowej może także przyczyniać się do pojawiania się komórek opornych. Wielokrotne pasażowanie drożdżaków z rodzaju *Candida* na pożywkach nie zawierających flukonazolu, itrakonazolu bądź ketokonazolu prowadzi do zmniejszenia poziomu mRNA genów *CDR1* i *CDR2*, a przez to do utraty oporności będącej wynikiem czynnego usuwania leków z komórki przez transportery błonowe (Marr et al., 1998). Nadekspresja genów *CDR1* i *CDR2* powiązana jest z występowaniem oporności krzyżowej, czyli tolerancji na lek w wyniku ekspozycji na inny podobnie działający.

Badania dotyczące mechanizmów oporności odnoszą się zazwyczaj do gatunku *C. albicans*, jednak w ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost oporności wśród innych gatunków. *C. glabrata*, mikroorganizm haploidalny, odznacza się naturalnie wysoką opornością na azole, która dodatkowo może być pogłębiona przez długotrwałą ekspozycję na azole zdecydowanie częściej i gwałtowniej niż u diploidalnego *C. albicans*. Oporność może być zarówno cechą recesywną jak i dominującą (Lupetti et al., 2002). *C. glabrata* charakteryzuje się

dużą spontanicznością w zyskiwaniu oporności przy ekspozycji na flukonazol w warunkach *in vitro*. Sanglard i wsp. oszacowali, że częstość spontanicznego nabywania oporności waha się u *C. glabrata* w granicach od 2 do  $4 \times 10^{-4}$ , podczas gdy u innych haploidalnych grzybów wynosi  $10^{-7} - 10^{-8}$  (Sanglard et al., 1998). Sanguinetti i in. określili za pomocą techniki real time PCR, że wśród izolatów klinicznych *C. glabrata* opornych obserwowany jest od 12 do 264 razy wyższy poziom ekspresji genów *CDR1* w stosunku do izolatu wrażliwego. Nadekspresja genów *CDR2* była nieco niższa niż *CDR1* (relatywny wzrost w skali logarytmicznej wynosił 3,8 – 34,7) (Sanguinetti et al., 2005). Mutanty *C. glabrata*, u których doprowadzono do delecji genów *CDR1* oraz *CDR2*, odznaczały się zdecydowanie większą podatnością na leki z grupy azoli. Badania Sanglarda i wsp. wykazały, że nadekspresja genu *CDR1* ma większą rolę w nabywaniu oporności niż genu *CDR2* (Sanglard et al., 2001).

Białka określane jako MFS są jedną z dwóch największych nadrodzin transporterów obecnych w błonach komórkowych bakterii oraz archeonów, a także komórek eukariotycznych. Przedstawicielem tej rodziny dla gatunku *C. albicans* jest antyporter Mdr1p. W skład sekwencji aminokwasowej tego białka wchodzi 564 reszty aminokwasowe. Transporter zbudowany jest z dwóch homologicznych domen transbłonowych TMD, z których każda zawiera sześć transmembranowych helis TMH (*ang. transmembrane helices*). Helisy połączone są wzajemnie przez sześć pętli zewnątrzkomórkowych ECL (*ang. extracellular loops*) i pięć pętli wewnątrzkomórkowych ICL (*ang. intracellular loops*) (Mandal et al., 2012). Dwie domeny homologiczne TMD połączone są za pomocą pętli ICL3 (Rys. 1. 4). W odróżnieniu do pomp typu ABC energia do transportu cząsteczek leku przez błonę nie pochodzi z hydrolizy wiązań w ATP lecz z gradientu protonów w poprzek błony.



**Rys. 1. 4.** Topologia transportera Mdr1p należącego do rodziny białek MFS

Podwyższona ekspresja genu *MDR1* może skutkować pojawianiem się oporności na leki z grupy azoli. Potwierdzać to mogą wyniki uzyskane przez Morschhausera i wsp., którzy określili, że zniszczenie obydwu alleli genu *MDR1* w szczepie *C. albicans* o obniżonej wrażliwości na flukonazol pozwala na zniesienie oporności (Morschhäuser et al., 2002). Ponadto określili oni także, że za regulację ekspresji tego genu odpowiedzialny jest czynnik transkrypcyjny Mrr1p, kodowany przez gen *MRR1* (*ang. multidrug resistance regulator 1*). Podobnie jak w przypadku czynników transkrypcyjnych regulujących transkrypcję genów *CDR1*



i *CDR2*, mutacja w obrębie *Mrr1p* prowadzi do konstytutywnej ekspresji genów *MDR1* (Morschhäuser et al., 2007a). Jednak wyniki uzyskane przez niektóre grupy badawcze wskazują, że mechanizm ten może mieć mniejsze znaczenie niż synteza pomp typu ABC (White et al., 2002).

#### 1.1.1.4. Mechanizmy oporności dominujące u drożdżaków z rodzaju *Candida*

Oporność drożdżaków z rodzaju *Candida* można podzielić na pierwotną albo nabytą. Wysoką naturalną oporność na flukonazol stwierdzono dla gatunku *C. krusei* (nawet 78% szczepów opornych, natomiast gatunek *C. glabrata* wykazuje zmniejszoną, zależną od dawki wrażliwość w porównaniu z innymi gatunkami *Candida* i ma charakter globalny (Pfaller et al., 2010). Gatunki takie jak *C. albicans*, *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis* bardzo rzadko wykazują oporność wewnętrzną.

Dla drożdżaków z rodzaju *Candida* wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy oporności, które mogą występować w obrębie jednego szczepu jednocześnie. Pierwszy mechanizm powiązany jest z indukcją syntezy pomp wielolekowych, które przyczyniają się do obniżenia ilości cząsteczek leku, które docierają do celu molekularnego czyli demetylasy 14- $\alpha$ -lanosterolu. Nadprodukcję pomp typu ABC zaobserwowano dla gatunków *C. albicans*, *C. glabrata* oraz *C. krusei*, natomiast nadprodukcja transporterów z rodziny MFS pojawia się dla gatunków *C. albicans*, *C. parapsilosis* oraz *C. dubliniensis*. Drugi główny mechanizm oporności to zmiany w obrębie demetylasy-14 $\alpha$ -lanosterolu bądź nadregulacja genu kodującego ten enzym - *ERG11*. Niektóre zmiany w sekwencji aminokwasowej białka mogą prowadzić do zmniejszonego powinowactwa substratu do enzymu bądź całkowicie uniemożliwić jego związanie. Ten typ wrodzonej oporności zidentyfikowano w przypadku gatunku *C. krusei*. W przypadku gatunku *C. albicans* mutacje w obrębie białka *Erg11p* również są często identyfikowane jednak rzadko ich występowanie koreluje z opornością. Podobnie nadekspresja genu *ERG11* ma raczej drugorzędowe znaczenie. Trzeci mechanizm oporności na azole polega na wykorzystaniu przez komórkę alternatywnego szlaku syntezy steroli w błonie. Ekspozycja komórki na azole prowadzi do zmniejszonej ilości ergosterolu w błonie oraz akumulacji toksycznego produktu 14- $\alpha$ -metylo-3,6-diolu. Mutacje w genie *ERG3* zapobiegają wytwarzaniu tego produktu, a powstające sterole są w stanie uformować normalnie funkcjonującą błonę. Ten typ mechanizmu oporności występuje u gatunków *C. albicans* oraz *C. tropicalis* (Sanguinetti, et al., 2015; Whaley et al., 2017).

#### 1.1.2. Specyficzne mechanizmy oporności komórek *Candida* spp. w strukturze biofilmu

Do tej pory potwierdzono skuteczność leczenia infekcji powiązanych z biofilmem za pomocą echinokandyn oraz lipidowej postaci amfoterycyny B zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Badania potwierdzają jednocześnie niską aktywność azoli, analogów pirymidyny, allylamin oraz klasycznej (nieliposomalnej) postaci amfoterycyny B (Mathé et al., 2013). Część badaczy potwierdza efektywność terapii kombinowanych i tak przykładowo Fiori i wsp. stwierdzili skuteczność flukonazolu z deoksycykliną (Fiori et al., 2012), Zhou i wsp.

amfoterycyny B z aspiryną (Zhou et al., 2012), Bink i wsp. kaspofunginy z diklofenakiem (Bink et al., 2012), a Shinde i in. stwierdzili uwrażliwienie biofilmu na różne leki przez cyklosporynę a (Shinde et al., 2012). Przez lata wiele grup badawczych próbowało wyjaśnić mechanizmy leżące u podstaw wysokiej oporności lekowej komórek w biofilmie. Niektóre z przyczyn oporności są wspólne z komórkami w postaci planktonicznej np. nadregulacja pomp wyrzutu leków, inne z kolei dotyczą jedynie biofilmu np. obecność macierzy zewnątrzkomórkowej. Poniżej przedstawione są najważniejsze mechanizmy warunkujące oporność biofilmu.

#### 1.1.2.1. Obniżone tempo wzrostu

Uważa się, że komórki rosnące wolno są bardziej odporne. Tempo wzrostu komórek żyjących w biofilmie jest znacznie niższe. Istnienie macierzy pozakomórkowej w znaczny sposób utrudnia dostęp składników odżywczych w głąb struktury. Przykładowo badacze z grupy Gilberta stwierdzili, że przy coraz większym tempie wzrostu, komórki *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* i *S. epidermidis* zarówno w formie planktonicznej jak i w biofilmie są coraz bardziej wrażliwe na tobramycynę i ciprofloxacynę (Duguid et al., 1992a; Duguid et al., 1992b; Evans et al., 1991). Natomiast zespół Desai i in. udowodnili, że oporność narasta w fazie logarytmicznej i jest największa w fazie stacjonarnej (Desai et al., 1998).

#### 1.1.2.2. Zmieniona ekspresja genów

Nadekspresja niektórych genów jest generalnie uznawana za przyczynę oporności komórek w formie planktonicznej. Dlatego przyjęło się, że może ona stanowić także przyczynę oporności komórek żyjących w biofilmie. W tej kwestii badania dotyczą najczęściej ekspresji genów zaangażowanych w produkcję składników ściany i błony komórkowej, a także ścieżkę biosyntezy ergosterolu. Knot i współpracownicy określili obniżoną ekspresję genu *ERG1* w blastosporach opornych na amfoterycynę i nadregulację *ERG25*, *SKN1* i *KRE1* (Knot et al., 2006). Borecka-Melkusova i współpracownicy stwierdzili niskie poziomy ekspresji *ERG1*, *ERG7*, *ERG11*, *ERG25* po ekspozycji biofilmu na działanie flukonazolu (Borecká-Melkusová et al., 2009). Nails i wsp. określili znacznie podwyższoną ekspresję genów *ERG1*, *ERG3*, *ERG11*, *ERG25* w dojrzałym biofilmie po dodaniu flukonazolu oraz nadregulację genów *SKN1*, *KRE*, *ERG1* po traktowaniu biofilmu amfoterycyną B (Nails et al., 2010). Yu i in. stwierdzili podwyższoną wrażliwość na flukonazol, gdy biofilm był hodowany w obecności farnezołu, prekursora ergosterolu. Stwierdzili oni, że ekspresja genów *ERG1*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG11* i *ERG25* jest obniżona w biofilmie suplementowanym farnezolem, potwierdzając tym, że podwyższona ekspresja tych genów może być przyczyną oporności biofilmu (Yu et al., 2012). Zmiany ekspresji mogą dotyczyć także genu *FKS1* zaangażowanego w syntezę w  $\beta$ -1,3-glukanu. Nadekspresja tego genu prowadziła do podwyższonej oporności komórek w biofilmie na flukonazol. Pomimo, że  $\beta$ -1,3-glukan nie jest jego celem molekularnym, stwierdzono, że polimer ten w strukturze biofilmu wiąże cząsteczki flukonazolu, zapobiegając jego dalszej penetracji. Dodatkowo podwyższona ekspresja genu *FKS1* warunkowała oporność na

anidulafunginę i amfoterycynę B (Nett et al., 2010). Vedyappan i in. badając wpływ związków na cały genom komórek żyjących w biofilmie stwierdzili, że pod wpływem amfoterycyny B zmiana poziomów ekspresji ulega 160 genów, a pod wpływem kaspofunginy nawet kilkaset (Vedyappan et al., 2010). Wyniki uzyskane przez różne zespoły nie są jednoznaczne i w dużej mierze zależą od warunków prowadzenia doświadczenia.

#### 1.1.2.3. Nadekspresja genów kodujących pompy wielolekowe

Podwyższona ekspresja genów kodujących pompy wielolekowe u szczepów *C. albicans* opornych na flukonazol była potwierdzona przez wiele zespołów badawczych na świecie w tym także przez nasz zespół (Mishra et al., 2007; Morschhäuser et al., 2007b; Sanglard et al., 1998; Szweda et al., 2015; You et al., 2017). Dotyczy to przede wszystkim transporterów typu ABC kodowanych przez geny *CDR*, oraz rodziny transporterów MFS kodowanych przez geny *MDR*. Podwyższoną ekspresję genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* oraz *FLU1* u komórek w biofilmie w porównaniu do planktonicznych stwierdzili m.in. Mateus i in. (2004), Mukherjee i in. (2009) oraz Ramage i in., (2002) w warunkach *in vitro* oraz Andes i wsp. w warunkach *in vivo* (Andes et al., 2004). Największą nadekspresję stwierdzono po 24 h formowania biofilmu (Mukherjee et al., 2003; Ramage et al., 2002). Obserwacje tych zespołów wskazują jednak, że nadregulacja pomp nie odgrywa kluczowej roli w oporności, ponieważ ekspresja tych genów maleje z czasem, a oporność w starzejącym się biofilmie rośnie. Badania z zastosowaniem mutantów nieposiadających genów kodujących pompy wykazały, że komórki w dalszym ciągu wykazują oporność, co potwierdza tylko, że nadekspresja pomp nie jest główną przyczyną wzrastającej oporności komórek żyjących w biofilmie.

#### 1.1.2.4. Komórki przetrwalne

Komórki przetrwalne (*ang. persister cells*) to grupa komórek zdolna do przeżycia nawet po zastosowaniu bardzo wysokiego stężenia leku. Uważa się, że niezdolność do eradykacji biofilmu z zastosowaniem leków jest konsekwencją stanu uśpienia, w którym znajdują się komórki przetrwałe, natomiast lek wymaga aktywnej formy celu molekularnego do poprawnego działania. Obecność komórek przetrwalnych w biofilmach bakteryjnych zauważono już 1944 roku, natomiast w odniesieniu do *Candida* została po raz pierwszy opisana w 2006 r. przez zespół LaFleur. Zaobserwowali oni, że większość komórek w populacji biofilmu może być zabita stosunkowo niskim stężeniem amfoterycyny B, natomiast 1% ciągle zostaje nienaruszone (LaFleur et al., 2006). Blokowanie przeżywalności komórek przetrwalnych może być jednym z celów przyczyniającym się do podniesienia efektywności terapii infekcji powiązanych z biofilmem. Jednak nie wszystkie szczepy *Candida* są zdolne do wytwarzania komórek przetrwalnych, a pomimo tego struktura ich biofilmu nadal odznacza się dużą opornością (Al-Dhaheeri & Douglas, 2010).

### 1.1.2.5. Macierz zewnątrzkomórkowa

Komórki *C. albicans* formujące biofilm osadzone są w macierzy zewnątrzkomórkowej złożonej z różnego rodzaju biopolimerów. Jej funkcją jest ochrona wielokomórkowej struktury mikroorganizmów przed szkodliwym wpływem środowiska zewnętrznego. W skład macierzy wchodzi różnego rodzaju grupy związków takie jak polisacharydy, białka, lipidy i kwasy nukleinowe, których zawartość zależy od warunków wzrostu (medium, temperatura, pH). Białka stanowią około 55% suchej masy macierzy, co stanowi większy udział niż kiedyś zakładano. Są to przede wszystkim glikoproteiny, białka sygnałowe, enzymy glikolityczne. Zarnowski i wsp. wyróżnili w macierzy 565 białek reprezentujących 458 różnych funkcji. Wskazał on 16 szlaków metabolicznych takich jak metabolizm węglowodanów, aminokwasów i degradacji biofilmu umożliwiające dyspersję. Węglowodany stanowią w przybliżeniu 25% suchej masy macierzy. Wśród monosacharydów wyróżnia się przede wszystkim arabinozę, mannozę, glukozę i ksylozę. Stosując analizę NMR określono, że najczęstszymi polisacharydami są  $\alpha$ -1,2 i  $\alpha$ -1,6 rozgałęzione mannany połączone z liniowymi  $\beta$ -1,6-glukanami stanowiąc około 13% wszystkich węglowodanów w pozornym kompleksie mannan-glukan (MGCx), wskazując na fizykochemiczną interakcję między resztami glukanu i mannanu. W przeciwieństwie do tego co uważano do niedawna,  $\beta$ -1,3-glukan stanowi tylko niewielki udział w strukturze macierzy. Lipidy stanowią około 15% suchej masy z czego ponad 99% to glicerolipidy. Pozostałą część stanowią sfingolipidy. Jedynym obecnym w macierzy steroidem jest ergosterol (Zarnowski et al., 2014). Podstawowymi funkcjami macierzy jest nadawanie stabilności mechanicznej oraz kontrola dyspersji komórek. Może ona także działać jako system trawienny zapewniający źródło składników odżywczych. Stanowi ochronę przed systemem odpornościowym gospodarza oraz lekami (Pierce et al., 2017). Zespół Douglasa wykazał korelację pomiędzy ilością macierzy, a opornością na amfoterycynę B (Al-Fattani et al., 2006; Baillie & Douglas, 2000). Zespół Andesa wskazał na rolę  $\beta$ -1,3-glukanu w oporności na flukonazol poprzez związanie leku i zapobieganiu jego penetracji w głąb struktury (Nett et al., 2007). Vedyappan i in. wykazali podobny efekt w odniesieniu do amfoterycyny B (Vedyappan et al., 2010). Co ciekawe zespół Nett stwierdził, że ściana komórkowa komórek w biofilmie jest 2 razy grubsza niż w formie planktonicznej, a zawartość  $\beta$ -1,3-glukanu jest do 10 razy wyższa. Wpływa to znacząco na wiązanie flukonazolu i obniżenie wrażliwości komórek na ten lek. Dodatkowo Nett i wsp. wykazali, że flukonazol w stężeniu 1000  $\mu$ g/ml podany wraz z zymolazą (enzym trawiący glukany) w stężeniu 1,25 jednostek/ml znacząco uwrażliwia biofilm na flukonazol (Nett et al., 2007). Znaczącą rolę w oporności biofilmu wydaje się zatem odgrywać nadregulacja genu *FLS1* kodującego syntazę  $\beta$ -1,3-glukanu. Badania, w których zastosowano mutanty o obniżonej o 30% zawartości  $\beta$ -1,3 glukanu, wykazały obniżenie o 80% przeżywalności komórek w biofilmie po 48 h traktowania flukonazolem w stężeniu 250  $\mu$ g/ml (Mathé & Van Dijck, 2013). Martins i in. wskazali na rolę zewnątrzkomórkowego DNA na nabywanie oporności. Wykazali, że dodatek DNazy uwrażliwia biofilm na niektóre związki przeciwgrzybicze, lecz mechanizm tego zjawiska nie jest poznany (Martins et al., 2012).

#### 1.1.2.6. Odpowiedź na stres

Adhezja oraz wzrost komórek *Candida* w biofilmie obejmują aktywację kilku odpowiedzi stresowych, które przyczyniają się do zwiększonej oporności na leki. Pierwsze badania w tym zakresie dotyczyły roli kinaz białkowych serynowo-treoninowych określanych wspólnym mianem MAPK (*ang. mitogen-activated protein kinase*), które odgrywają rolę w regulacji odpowiedzi na sygnały zewnętrzne dochodzące do komórki. Dla gatunku *C. albicans* specyficzną kinazą jest Mkc1p (*ang. MAP kinase from C.albicans*) kodowana przez gen *MKC1*. Komórki *C. albicans* z mutacjami w obrębie genu *MKC1* okazały się niezdolne do tworzenia grzybni, rozwoju biofilmu i związanej z biofilmem oporności na flukonazol. W późniejszych badaniach określono wpływ dodatkowych szlaków regulujących stres komórkowy na oporność biofilmu (Mathé & Van Dijck, 2013).

Uppuluri i wsp. zidentyfikowali rolę kalcyneuryny, (białko enzymatyczne o aktywności fosfatazy białkowej serynowo-treoninowej) dla homeostazy, morfogenezy i zjadliwości *Candida*. Inhibitory tego białka znacznie uwrażliwiają biofilm na flukonazol. Innym sposobem odpowiedzi na stres, który wpływa na oporność biofilmu tworzonego przez *Candida*, jest synteza HSP90, białka szoku cieplnego odpowiedzialnego za stabilizację różnych białek gospodarza. W warunkach planktonicznych, HSP90 powiązane jest zarówno z kalcyneuryną jak i Mck1p. Zakłócenie syntezy białka HSP90 powoduje również osłabienie produkcji glukanu wchodzącego w skład macierzy otaczającej biofilm, sugerując, że HSP90 może działać jako regulator szlaku sekwestracji tej macierzy (Robbins et al., 2011; Taff et al., 2013; Uppuluri et al., 2008).

#### 1.1.2.7. Unikanie odpowiedzi immunologicznej

Obecność patogenów w organizmie i na ciele jest wykrywana przez receptory PRR (*ang. pattern recognition receptors*) obecne w różnych komórkach o układu immunologicznego infektowanego organizmu. Receptory rozpoznają „wzór patogenu” (*ang. PAMPs pathogen-associated molecular patterns*), który jest obecny na ścianie komórkowej patogenu lub przez niego wydzielany. Związanie ligandu przez receptor PRR zapoczątkowuje kaskadę, w wyniku której rozpoczyna się wydzielanie odpowiednich cytokin, chemokin oraz związków przeciwdrobnoustrojowych, a patogen zostaje unieczynniony przez fagocyty (Seider et al., 2010). Detekcji ulegają zazwyczaj obecne w ścianie komórkowej polimery  $\beta$ -1,3-glukanu. Drożdże *C. albicans* wykształciły kilka mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Pierwszy z nich to maskowanie elementów ściany komórkowej. Następnym to wydzielanie proteaz aspartylowych, które trawią elementy układu immunologicznego gospodarza. Kolejnym to zmiana fenotypu na nieprzezroczysty (*ang. opaque*) bez komórek grzybni, które także mogłyby ulec detekcji przez gospodarza. Komórki drożdży produkują także pewne białka powierzchniowe (Pra1p i Gpd2p), dzięki którym przypominają komórki gospodarza i unikają odpowiedzi immunologicznej. W odniesieniu do komórek w biofilmie zaobserwowano, że komórki układu immunologicznego PBMCs (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, *ang. peripheral blood mononuclear cells*) nie fagocytują komórek w strukturze biofilmu, a ponadto z niewyjaśnionych przyczyn sprzyjają formowaniu grubszej struktury.

Podobnie zachowuje się inny element układu odpornościowego - prozapalna cytokina IL-17A. Biofilm jest w stanie zmienić profil cytokin wydzielanych przez PBMCs. Dodatkowo zaobserwowano, że elementy układu odpornościowego są w stanie dotrzeć tylko do powierzchniowej warstwy biofilmu (Mathé & Van Dijck, 2013). Obniżony potencjał fagocytów do walki z komórkami w biofilmie w porównaniu do komórek w formie planktonicznej zaobserwował także Khardori (2010).

Dotychczasowe badania jednoznacznie wskazują, że oporność biofilmu jest zagadnieniem bardzo złożonym. Może wynikać z jednoczesnego działania, nawet kilku mechanizmów molekularnych, co przyczynia się do niskiej skuteczności stosowanych dotychczas leków. Jednoczesne przełamanie wszystkich tych czynników z wykorzystaniem jednej substancji wydaje się mało prawdopodobne. W związku z tym ciekawą ideą wydaje się stosowanie strategii, w których na biofilm oddziałuje się kilkoma lekami wykazującymi odrębne mechanizmami działania jednocześnie bądź leku w połączeniu z niektórymi produktami naturalnymi, co było jednym z wątków badań prowadzonych w ramach powyższej pracy.

## **1.2. Alternatywne do istniejących chemoterapeutyków przeciwgrzybowych nie-antybiotyczne związki pochodzenia naturalnego**

Schorzenia wywołane drożdżakami z rodzaju *Candida* w praktyce klinicznej najczęściej są leczone lekami z grupy azoli, głównie flukonazolem nazywanym często lekiem z wyboru, ze względu na niewielką toksyczność dla organizmu gospodarza. Rzadziej stosowane są leki zaliczane do grupy echinokandyn czy też makrolidy polienowe. Jednak w ciągu ostatnich lat w literaturze pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących niskiej skuteczności azoli ze względu na zjawisko nabywania oporności po długotrwałej terapii z ich zastosowaniem. Oporność na pozostałe leki (echinokandyny, 5-fluorocytozynę i amfoterycynę B) pojawiała się sporadycznie, jednak są to związki chemiczne o wysokiej toksyczności lub oporność na nie może się stosunkowo szybko rozwinąć podczas terapii, dlatego też rzadko znajdują zastosowanie w praktyce klinicznej (Szweda et al., 2015).

Problem niedostatku skutecznych, a zarazem bezpiecznych leków, wskazuje na konieczność poszukiwania nowych związków, na które mikroorganizmy nie wykształciły oporności, a jednocześnie wykazujące wysoką aktywność przeciwgrzybową. Natura stanowi nieocenione źródło produktów bądź związków, które wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Olejki eteryczne bogate są w całą gamę związków lotnych takich jak terpeny i terpenoidy (wśród nich aldehydy, ketony, alkohole, estry) które stanowią o ich właściwościach biologicznych. Aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują także ekstrakty (wodne, etanolowe i inne) roślinne. Przykładowo wysoką aktywność ekstraktu z czosnku, którego składnikiem aktywnym jest allicyna, stwierdzono wobec drobnoustrojów z rodzaju *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providentia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Vibrio* i *Staphylococcus* (Sivam, 2001). Produkty pochodzenia pszczelego wytwarzane są przez pszczoły z pyłków kwiatów, które następnie są przetwarzane przez enzymy zawarte w ich

śliniankach. Ekstrakty propolisów pszczelich są bogatymi mieszaninami związków aktywnych, w których aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują polifenole. W miodach substancją aktywną jest nadtlenek wodoru, który powstaje w wyniku reakcji utleniania glukozy przez enzymy zawarte w ślinie pszczoł (głównie oksydaza glukozowa) (Bizerra et al., 2012). Aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują również niektóre kwasy i biopolimery, w tym chitozan uzyskiwany z muszli krewetek i innych skorupiaków morskich. Bardzo dużą grupę związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej stanowią peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP ang. *Antimicrobial peptides*). Są to relatywnie krótkie peptydy (12 -100 aminokwasów), które stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami, dlatego też izolowane są z większości organizmów, zarówno z roślin, owadów, grzybów i zwierząt. Bakterie również produkują peptydy obronne, tzw. bakteriocyny, które hamują wzrost innych spokrewnionych gatunków bakterii. Bakterie (zwłaszcza promieniowce) oraz pleśnie są również producentami antybiotyków o charakterze niepeptydowym. Aktywność wobec drobnoustrojów wykazują niektóre alkaloidy, choć część z nich jest toksyczna dla człowieka. Wybrane produkty o aktywności przeciwdrobnoustrojowej przedstawione są w Tabeli 1. 2 (Bahar & Ren, 2013).

**Tabela 1. 2.** Wybrane produkty pochodzenia naturalnego wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową

Produkty	Przykłady	Spektrum aktywności
Olejki eteryczne z roślin	olejek cynamonowy, lawendowy, bazyliowy, tymiankowy, rozmarynowy	bakterie G+, bakterie G-, grzyby
Ekstrakty roślinne	ekstrakty z czosnku, cebuli, szałwi, oregano, goździków	bakterie G+, bakterie G-,
Produkty pochodzenia pszczelego	miody, propolis, pierzga, pyłek pszczele	bakterie G+, bakterie G-, grzyby
Kwasy organiczne	kwasy sorbinowy, propionowy, cytrynowy	drożdże, pleśnie, niektóre bakterie (Matsuda et al., 1994)
Antybiotyki niepeptydowe	penicylina, tetracyklina, streptomycyna, erytromycyna	bakterie G+, bakterie G-, <i>Mycobacterium</i>
Polimery naturalne	chitozan	głównie bakterie G+
Alkaloidy	pirydoakrydyny, chinoliny, izochinoliny, pochodne indolu (Cushnie et al., 2014)	bakterie G+, bakterie G-, <i>Mycobacterium</i>
Peptydy przeciwdrobnoustrojowe:		
pochodzenia bakteryjnego	gramicydyna, tyrocydyna, nizyna, natamycyna	bakterie G+, bakterie G-, grzyby (głównie ściana komórkowa), niektóre wirusy (kapsyd), pasożyty, spory <i>Clostridium botulinum</i> odporne na temperaturę (aktywność nizyny)
pochodzenia grzybowego		
pochodzenia owadziego	cekropia A, sachrotoksyna, ceratonia, stomoksyna (Wang & Lai, 2010)	
pochodzenia roślinnego	$\alpha$ -purotionina z pszenicy, Rs-AFP2 z rzodkiewki, Ib-AMP1 z niecierpka (Nawrot & Goździcka-Józefiak, 2007)	
pochodzenia odzwierzęcego	laktoferyna z mleka, defensyna z królika, lizozym	

### 1.2.1. Charakterystyka olejków eterycznych: właściwości, aktywność przeciwdrobnoustrojowa oraz mechanizmy działania

Niemalże każda część rośliny; kwiaty, liście, nasiona, owoce, łodygi, kora i korzenie mogą być źródłem pozyskiwania olejków eterycznych (EO). Olejki są lotnymi, oleistymi najczęściej bezbarwnymi bądź jasnożółtymi cieczami o intensywnym zapachu zależnym od zawartości głównego komponentu. Są słabo rozpuszczalne w wodzie, natomiast rozpuszczają się bardzo dobrze w tłuszczach, chloroformie, alkoholach czy eterach (Nazzaro et al., 2013).

Najpowszechniejszą metodą izolacji olejków z rośliny jest destylacja z użyciem pary wodnej, która pozwala na uzyskanie czystego preparatu, jednak część składników wrażliwych na wysoką temperaturę może ulec rozkładowi. W opracowaniach można znaleźć informacje dotyczące wykorzystania do izolacji olejków metod takich jak ekstrakcja w warunkach nadkrytycznych, ekstrakcja ultradźwiękowa i mikrofalowa, ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, mikroekstrakcja do fazy ciekłej oraz dyspersja matrycy na fazie stałej (MSPD, *ang. matrix solid-phase dispersion*) (Charles & Simon, 1990; Dawidowicz & Rado, 2010).

Rośliny produkują składniki olejków jako metabolity wtórne, które służą im jako ochrona przed atakiem patogenów; bakterii, grzybów, wirusów, a nawet drobnych roślinożerców, gdyż mogą nadawać gorzki smak roślinie. Pierwszy opisany eksperyment potwierdzający przeciwbakteryjne właściwości olejków eterycznych został przeprowadzony przez de la Croix w 1881 roku (Boyle, 1955). W literaturze szeroko opisywana jest aktywność przeciwbakteryjna olejków eterycznych oraz możliwości ich stosowania w rolnictwie, a także w przemyśle spożywczym do konserwowania żywności. Przykładowo Lillehoj i in. stwierdzili wzrost odporności brojlerów na choroby bakteryjne po karmieniu ich paszą z dodatkiem oleożywicy z papryki *Capsinum* oraz aldehydu cynamonowego (Lillehoj et al., 2011). Alali i wsp. natomiast wykazali, że także mieszanka tymolu, karwakrolu, eukalyptolu oraz olejku cytrynowego zapobiega kolonizacji i rozsiewaniu bakterii z rodzaju *Salmonella* u brojlerów (Alali et al., 2013).

Wiele opracowań naukowych skupia się na wyznaczeniu aktywności przeciwbakteryjnej olejków eterycznych, znacząco mniej badaczy podejmuje się kolejnego kroku, który miałby wyjaśnić mechanizm działania poszczególnych komponentów mieszaniny. W opracowaniach dotyczących mechanizmu działania olejków jako ich najczęstszy cel molekularny wymienia się ścianę oraz błonę komórkową. Aktywność przeciwbakteryjna olejków jest silnie związana z ich hydrofilowością/hydrofobowością. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich składa się głównie z peptydoglikanu wraz z związanymi cząsteczkami, takimi jak białka lub kwasy tejchojowe. Z drugiej strony, bakterie Gram-ujemne posiadają zewnętrzną błonę komórkową zawierającą hydrofilowe lipopolisacharydy (LPS), które tworzą barierę wobec związków hydrofobowych zawartych w olejkach. Bakterie Gram-ujemne są zatem mniej podatne na działanie EO niż bakterie Gram-dodatnie. Natomiast hydrofobowe składniki EO mogą przenikać do peryplazmy bakterii Gram-ujemnych poprzez białka zwane porynami, znajdujące się w błonie zewnętrznej (O'Bryan et al., 2015). Olejki eteryczne bądź ich składniki, które oddziałują ze ścianą bądź błoną komórkową to przede wszystkim karwakrol, olejek cynamonowy, aldehyd cynamonowy, cymen, eugenol, farnesol, nerolidol, olejek rozmarynowy, z drzewa herbacianego,



z oregano, waniliowy oraz tymol (Bouhdid et al., 2010; Gill & Holley, 2004; Helander et al., 1998; Inoue et al., 2004; O'Bryan et al., 2015; Ultee et al., 2002). Inny mechanizm działania olejków polega na zaburzaniu zdolności komórki do regulowania przepływu potasu przez błonę, co prowadzi do wycieku tych jonów z komórki, a następnie utraty jej żywotności. Wzrost przepuszczalności błony komórkowej wywołany przez składniki olejków eterycznych odnotowano przy zastosowaniu karwakrolu, waniliny, tymolu, olejku z drzewa herbacianego, z oregano, alkoholi terpenowych takich jak farnesol, nerolidol i plaunotol (Bouhdid et al., 2010; Cox et al., 2001; Fitzgerald et al., 2004; Inoue et al., 2004; Togashi et al., 2008; Ultee et al., 2002). Uwalnianie innych składników komórkowych również jest przedmiotem badań dotyczących mechanizmów aktywności EO. Nguefack i in. stosując cytometrię przepływową wykazali permeabilizację błony i wynikające z tego obniżenie przeżywalności komórek *Listeria innocua* pod wpływem olejków eterycznych izolowanych z palczatki cytrynowej, bazylii, bazylii eugenolowej, macierzanki i imbiru lekarskiego. (Nguefack et al., 2004). Bouhdid i wsp. wykazali natomiast wpływ olejku cynamonowego na zmniejszenie potencjału błonowego bakterii *P. areuginosa* i *S. aureus*, wskazujące na uszkodzenie błony cytoplazmatycznej (Bouhdid et al., 2010). Ultee i inni badali wpływ karwakrolu oraz cymenu na potencjał błonowy komórek *B. cereus* i wykazali, że ważne znaczenie ma obecność w strukturze karwakrolu grupy hydroksylowej. Ponadto, działanie karwakrolu powodowało bardzo silny spadek zawartości ATP w komórkach (Ultee et al., 2002). Obniżenie zawartości ATP w komórkach stwierdzono także w wyniku działania olejków pomarańczowego i bergamotowego na komórki *Enterococcus* spp. (Fisher & Phillips, 2009). Eugenol hamuje biosyntezę ATP, natomiast aldehyd cynamonowy zarówno hamuje biosyntezę jak i obniża wewnątrzkomórkową zawartość ATP (Gill & Holley, 2004). Niektóre olejki zakłócają możliwość utrzymania odpowiedniego transbłonowego gradientu pH, co jest niezbędne do wytworzenia odpowiedniej siły protonomotorycznej w poprzek błony, to z kolei uniemożliwia syntezę ATP w mitochondriach oraz błonach komórek prokariotycznych. Niektóre EO zakłócają zdolność komórek bakteryjnych do prowadzenia reakcji utleniania-redukcji, a ponieważ oddychanie jest integralną częścią metabolizmu tlenowego, z pewnością stanowi także cel molekularny dla części olejków eterycznych (Bakkali et al., 2008). Inny mechanizm aktywności EO dotyczy wpływu na tzw. zjawisko Quorum Sensing. Komunikacja międzykomórkowa (Quorum Sensing, QS) wśród mikroorganizmów odbywa się za pomocą małych cząsteczek sygnałowych wytwarzanych przez drobnoustroje. Wykorzystywana jest do oceny środowiska zewnętrznego oraz wewnętrznego stanu fizjologicznego. QS jest zaangażowane w produkcję biofilmu, „pełzanie komórek”, odporność na stres i zjadliwość. Ponadto QS umożliwia patogenom zminimalizowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza, opóźniając produkcję czynników wirulencji, ułatwia namnożenie się oraz ustanowienie infekcji. W przypadku części olejków udowodniono ich właściwości określane jako anty-quorum sensing. Najsilniejszy wpływ na zjawisko QS stwierdzono w przypadku olejków: różanego, geraniowego, lawendowego oraz rozmarynowego (Szabó et al., 2010; Yap et al., 2014).

Niektóre olejki wykazują także wysokie aktywności w stosunku do patogenów grzybiczych. Pozzatti i in. wykazali przeciugrzybową aktywność olejku tymiankowego, imbirowego, cynamonowego i z oregano wobec różnych gatunków drożdżaków z rodzaju *Candida* (Pina-Vaz et al., 2004; Pozzatti et al., 2008). Mustafa i wsp. wyznaczyli potencjał olejku goździkowego w stosunku do *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, i *C. glabrata* (Mustafa et al., 2016). Bannour i in. wykazali aktywność olejku pozyskiwanego z tunezyjskiej rośliny *Calligonum azel* (Bannour et al., 2016). Mechanizmy aktywności EO wobec komórek grzybowych są po części wspólne z bakteryjnymi. Niektóre składniki EO powodują depolaryzację błony komórkowej obniżając potencjał transbłonowy, wpływając jednocześnie na pracę pomp błonowych transportujących jony wapnia oraz kanałów jonowych. Zmniejszony gradient pH uniemożliwia pracę syntazy ATP zmniejszając wewnątrzkomórkową zawartość ATP (Bakkali et al., 2008). Chen i wsp. stwierdzili, że olej z nasion kopru powoduje dysfunkcję mitochondriów *C. albicans*. Wykazali oni, że olejek powodował uszkodzenie błony oraz zmniejszenie ilości ergosterolu w błonie co zwiększa jej przepuszczalność i w konsekwencji prowadzi do wycieku zawartości cytoplazmy. Wpływ olejku z drzewa herbacianego na uszkodzenia błony drożdży wykazał zespół badawczy Cox (Cox et al., 2001). Zespół badawczy Wang wykazał na podstawie zdjęć wykonanych za pomocą skaningowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej, że olejek cynamonowy oraz z pogostemonu (roślina wodna) powodują uszkodzenia ściany oraz błony komórkowej, organelli wewnętrznych oraz wyciek cytoplazmy z komórek *C. albicans* (Wang et al., 2012). Miron i in. wykazali, że składniki olejków eterycznych (geraniol, nerol, cytral) wykazują powinowactwo do ergosterolu, przez co destabilizują błonę komórkową (Miron et al., 2014). Dotychczas relatywnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów oddziaływania składników olejków na komórki grzybów w przeciwieństwie do komórek bakteryjnych. Uzasadnia to celowość podjętej w niniejszej pracy doktorskiej tematyki mechanizmów aktywności olejków eterycznych wobec drożdży z rodzaju *Candida*.

### 1.2.2. Charakterystyka najaktywniejszych składników olejków eterycznych

Skład chemiczny olejków jest na ogół bardzo złożony, a efekt przeciwdrobnoustrojowy jest zwykle wynikiem działania kilku substancji. Jednocześnie, bez wątplenia olejki, które wg doniesień literaturowych wykazują najwyższą aktywność, takie jak: cynamonowy, tymiankowy, cytrynowy, lawendowy, kolendrowy, z drzewa herbacianego, rozmarynowy, eukaliptusowy itd. zawierają kluczowe składniki, które w głównej mierze odpowiadają za ich wysoką skuteczność. Spośród aromatycznych składników, dla których odnotowuje się najwyższe aktywności przeciwdrobnoustrojowe, wymienić należy: aldehyd cynamonowy, tymol, karwakrol, eugenol oraz cytral.

#### 1.2.2.1. Tymol

Tymol (2-izopropyl-5-metylofenol) jest monoterpenoidem występującym głównie w olejku tymiankowym ekstrahowanym z rośliny macierzanka tymianek (*Thymus vulgaris*), a także z innych gatunków roślin. Jest związkem o specyficznym zapachu, używanym jako

przyprawa do przygotowywania potraw ze względu na charakterystyczny smak. Znane są także jego właściwości antyseptyczne. Z tego względu, znajduje zastosowanie jako biocyd w rolnictwie. W połączeniu z niektórymi antybiotykami np. penicyliną wykazuje wzmocnioną aktywność wobec bakterii. Ponadto, tymol opisywano jako środek o właściwościach przeciwgrzybowych (Ahmad et al., 2010), roztoczobójczych (Araújo et al., 2015), przeciwcukrzykowych (Saravanan & Pari, 2015), przeciwzapalnych, przeciwalergicznych (Zhou et al., 2014), przeciwutleniających (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015), przeciwleiszmaniowych (leiszmanioza to grupa chorób pasożytniczych, wywołanych przez wiciowce z rodzaju *Leishmania*) (De Morais et al., 2014) i przeciwnowotworowych (Ferreira et al., 2016). Mechanizm molekularny działania nie jest dokładnie poznany, choć pewne dowody sugerują, że jego właściwości biobójcze są związane z naruszeniem struktury błon komórkowych (Trombetta et al., 2005). W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* na modelu błony uformowanej z dipalmitoilofosfatydylocholinoi (DPPC) tymol inkorporuje w błonę, zmniejsza elastyczność powierzchni oraz zmienia morfologię monowarstwy lipidowej (Ferreira et al., 2016). Według de Castro i in., mechanizm aktywności tymolu wobec *C. albicans* nie wynika z oddziaływania na biosyntezę ściany komórkowej, ponieważ wartość MIC w obecności sorbitolu stabilizującego ciśnienie osmotyczne pozostaje niezmienną w stosunku do wartości parametru MIC z zastosowaniem samego tymolu. Autorzy ci odnotowali natomiast, że wartość MIC w obecności egzogennego źródła ergosterolu wzrasta ośmiokrotnie, co świadczy o tym, że tymol wiąże ergosterol w błonie, co zwiększa przepuszczalność jonów i ostatecznie prowadzi do śmierci komórki (de Castro et al., 2015). Taki sam mechanizm aktywności wykazali Nóbrega i wsp. dla karwakrolu (5-izopropyl-2-metylofenol) będącego izomerem konstytucyjnym tymolu (Nóbrega et al., 2016).

#### 1.2.2.2. Aldehyd *trans*-cynamonowy

Aldehyd *trans*-cynamonowy (3-fenyl-2-propenal) jest głównym składnikiem olejku cynamonowego ekstrahowanego z kory lub liści cynamonowca z rodziny roślin wawrzynowatych (Prasad et al., 2009). Roślina ta jest szeroko rozpowszechniona na terenie Chin, Indii, Sri Lanki, Seszeli i Malezji (Jantan et al., 2008). Znajduje zastosowanie jako dodatek do żywności ze względu na charakterystyczny smak i zapach. Intensywnie rozpatrywane są jej właściwości przeciwdrobnoustrojowe wynikające z wysokiej zawartości głównego składnika, aldehydu *trans*-cynamonowego, sięgającej w przypadku ekstrakcji olejku z kory 97,7% (głównym składnikiem olejku przy izolacji z liści i żywicy jest eugenol w stężeniach 87,3% i 87,2% odpowiednio) (Singh et al., 2007). Mechanizm selektywnej toksyczności aldehydu cynamonowego jest znany i wynika z inhibicji zarówno syntazy  $\beta$ -1,3-glukanu jak i syntazy chityny, czyli enzymów syntetyzujących  $\beta$ -glukany oraz chitynę, główne składniki strukturalne ściany komórkowej grzybów. Z uwagi na fakt, że toksyczność tego związku wiąże się z oddziaływaniem na ścianę komórkową, nieobecną w komórkach ludzi i zwierząt, rozpatrywany jest jako potencjalny kandydat do zastosowań w farmacji i rolnictwie (Bang et al., 2000).



### 1.2.2.3. Eugenol

Eugenol (4-allyloxy-2-methoxyphenol) pozyskiwany jest z goździków, cynamonu, bazylii oraz gałki muszkatołowej. Stanowi główny składnik olejku goździkowego nadając mu specyficzny, charakterystyczny zapach. Jest on oleistą cieczą, bladożółtego koloru nierozpuszczalną w wodzie, lecz rozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych. Znajduje zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym oraz jako dodatek smakowy. Wykorzystywany jest do produkcji atraktantów owadów, środków przeciwbólowych i antyseptycznych. Jest również stosowany przy produkcji stabilizatorów i przeciwutleniaczy do tworzyw sztucznych i gum. W połączeniu z tlenkiem cynku jest używany jako wypełnienie dentystyczne (Markowitz et al., 1992). Wykazuje właściwości przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze. Ahmad i in. przeprowadzili badania aktywności przeciwgrzybiczej eugenolu oraz jego metylowej pochodnej na grupie drożdżaków wrażliwych i opornych na flukonazol. Obydwa związki wykazywały niższe stężenie hamujące wzrost w porównaniu do flukonazolu. W zależności od stężenia, hamowały syntezę ergosterolu, a przy zastosowaniu stężenia odpowiadającego wartości MIC związki te w sposób całkowity blokowały jego syntezę zarówno w szczepach opornych jak i wrażliwych na flukonazol (Ahmad et al., 2010).

### 1.2.2.4. Cytral

Cytral (3,7-dimetyl-2-6-oktadienal) jest mieszaniną dwóch izomerów geometrycznych geranialu (*trans*-cytral, cytral A) oraz neralu (*cis*-cytral, cytral B), które są alifatycznymi  $\alpha,\beta$ -nienasyconymi monoterpenuidowymi aldehydami, występującymi w wielu owocach cytrusowych ziołach lub przyprawach. Geranial charakteryzuje silnie cytrynowy zapach, natomiast neral - nieco słabsza lecz słodsza woń. Ze względu na swój specyficzny aromat cytrynowy, cytral stał się powszechnie stosowanym surowcem w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, perfumeryjnym i kosmetycznym. Jednocześnie cytral cechuje bardzo dobra aktywność przeciwgrzybicza. Niedawno udowodniono jego zdolność do zaburzania integralności błony komórkowej *Geotrichum citriaurantium* (Zhou et al., 2014). Cytral dramatycznie hamuje wzrost grzybni *Penicillium italicum* poprzez mechanizm uszkodzenia błony komórkowej, utraty jej integralności i przepuszczalności. De Bona i in. wykazali silną aktywność tego związku wobec *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, oraz w szczególności *C. albicans* (De Bona et al., 2008). Zastosowanie cytralu pozwoliło także na zahamowanie zmiany morfologicznej *C. albicans* z formy drożdżowej do formy mycelialnej, która odgrywa ważną rolę w patogenezie oraz ustanowieniu infekcji (Leite et al., 2014). Jest to o tyle istotne, że komórki zmutowanych szczepów *C. albicans* niezdolnych do formowania strzępek są na ogół niezdolne w mysich modelach eksperymentalnych kandydozy błon śluzowych (Lo et al., 1997; Rocha et al., 2001).

## 1.3. Charakterystyka ekstraktów propolisów: właściwości, aktywność przeciwdrobnoustrojowa oraz mechanizmy działania

Zainteresowanie budzą również inne produkty naturalne wykazujące bardzo dobre właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Wspomnieć należy tu o tzw. propolisach pochodzenia

pszczeliego. Propolis (czasem określany także mianem pszczeli "klej") to ogólna nazwa dla żywicznej substancji zbieranej przez pszczoły z różnych źródeł roślinnych. Słowo propolis pochodzi od greckiego pro-, „na rzecz” lub „w obronie” oraz polis-, „miasto”, czyli „obrona miasta” (lub ula) (Ghisalberti, 1979). Propolis jest silnie klejącą, żywiczną substancją zbieraną, przetwarzaną i używaną przez pszczoły do uszczelniania otworów w ulach i plastrach, wygładzania ścian wewnętrznych i zabezpieczania wejścia do ula przed intruzami. Dokładny skład surowego propolisu zależy od źródła jego pozyskiwania. Na ogół składa się on w 50% z żywicy, w 30% z wosku roślinnego i pszczeliego, w 10% z olejków eterycznych, w 5% z pyłków oraz w 5% z różnych innych substancji, w tym zanieczyszczeń organicznych (Burdock, 1998).

Ekstraktom zawierającym propolis przypisywane są właściwości antyseptyczne, przeciwgrzybicze, bakteriostatyczne, ściągające, rozkurczowe, przeciwzapalne, znieczulające oraz przeciwutleniające. Dlatego wykaz preparatów, w których znajdują one zastosowanie, jest bardzo szeroki. Są użyteczne w leczeniu ran, regeneracji tkanek, leczeniu oparzeń, świerzbiczkii ogniskowej, owrzodzenia podudzi, łuszczycy, opryszczki narządów płciowych i odbytu, świądu i różnego rodzaju dermatoz. Zostały wprowadzone do obrotu jako substancje pomocnicze w leczeniu reumatyzmu oraz w stomatologii do miejscowego znieczulania. Bywają stosowane w preparatach past do zębów i płynów do płukania ust, w leczeniu zapalenia dziąseł, zapalenia warg i jamy ustnej. Znalazły zastosowanie w produktach farmaceutycznych i kosmetycznych, takich jak kremy do twarzy, maści i balsamy (Burdock, 1998; Dobrowolski et al., 1991; Marcucci, 1995). Aktywność produktów zawierających propolis potwierdzono zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Przykładowo, de Castro i in. potwierdzili aktywność maści zawierających propolis w zwalczaniu kandydoz pochwy w modelach mysich. Maści te, zawierające propolis w stężeniu 2 lub 3%, wykazywały po dziesięciu dniach leczenia większą skuteczność niż tradycyjna maść z klotrimazolem (10 mg/g) (de Castro et al., 2013).

Skład chemiczny ekstraktów etanolowych propolisów (EEP) może być równie bogaty jak olejków eterycznych. Istnieją duże różnice w składzie chemicznym propolisu wytwarzanego przez pszczoły w określonych strefach geograficznych Europy i świata. Dla przykładu, inne grupy związków chemicznych występowały w propolisie polskim, a inne w propolisie pochodzącym z rejonu Morza Śródziemnego, Azji i Ameryki Południowej. Główne grupy związków występujące w EEP to przede wszystkim flawonoidy, kwasy i estry aromatyczne, terpeny i seskwiterpeny, steroidy, biopierwiastki i enzymy. Najczęściej występującymi flawonoidami w propolisie są: chryzyna, tektochryzyna, pinostrobin, apigenina i chalkon pinostrobinowy, rzadziej występują: galangina, kemferol, genkwanina oraz pinobanksyna. Zawartość związków flawonoidowych występujących w EEP mieści się w granicach 2,7-10,8%. Wśród estrów kwasów fenolowych szczególne właściwości przeciwbakteryjne wykazują estry etylowe kwasu cytrynowego i kawowego oraz estry fenylometylowe kwasu benzoowego (Kubina et al., 2009). Związki flawonoidowe oraz kwasy i estry aromatyczne najczęściej występujące w EEP przedstawione są w tabeli 1.3. (Kędzia, 2009).



**Tabela 1. 3.** Związki flawonoidowe oraz kwasy i estry aromatyczne najczęściej występujące w ekstraktach etanolowych propolisów pszczelich (Kędzia, 2009)

<b>Związki flawonoidowe</b>	<b>Kwasy i estry aromatyczne</b>
<b><u>Flawony</u></b>	<b><u>Kwasy aromatyczne</u></b>
Tektochryzyna	Kwas cynamonowy
Chryzyna	Kwas izoferulowy
Apigenina	Kwas kawowy
4', 5,7,-Trihydroksy-3,3'-dimetoksyflawon	Kwas benzoesowy
Genkwanina	Kwas salicylowy
3',4',5,7-Tetrahydroksy-3-metoksyflawon	Kwas ferulowy
Piloina	Kwas chlorogenowy
Eukaliptyna	Kwas 3,4-dimetoksycynamonowy
3,5-Dihydroksy-4',7-dimetoksyflawon	Kwas 3,4-dimetoksybenzoesowy
<b><u>Flawonole</u></b>	Kwas 2-amino-3-metoksybenzoesowy
3-Metyloeter kwercetyny	
Galangina	<b><u>Estry aromatyczne</u></b>
Kemferol	Ester etylowy kwasu cynamonowego
<b><u>Flawonony</u></b>	Ester etylowy kwasu benzoesowego
Pinostrobin	Ester fenylometylowy kwasu salicylowego
4',7-Dimetyloeter naryngeniny	Ester fenylometylowy kwasu benzoesowego
5-Hydroksy-4',-dimetoksyflawon	
Pinoembryna	
<b><u>Chalkony</u></b>	
Chalkon pinostrobinowy	

Z ekstraktu etanolowego propolisu za pomocą destylacji z parą wodną wyodrębniono olejek eteryczny w skład którego wchodziły w największej ilości 2 terpeny i 8 seskwiterpenów. Wśród terpenów dominowały: geraniol i nerol, natomiast w grupie seskwiterpenów dominowały: farnesol, kariofilen,  $\beta$ -bisabolen i  $\beta$ -eudesmol. W mniejszych ilościach stwierdzono występowanie: gwajolu,  $\beta$ -burbonenu, patchulenu i sechulenu (Maciejewicz et al., 1983). Ponadto, w propolisie wyodrębniono frakcję steroidową, w której zidentyfikowano stigmasterol, cholinasterol, fukosterol i dihydrofukosterol. Oznaczano również liczne pierwiastki; magnez, sód, potas, srebro, żelazo, miedź, krzem, cynk, chrom, mangan i selen witaminy: prowitamina A, witamina B1, B2, B5, B6, C, D, E oraz enzymy, przede wszystkim amylazy i esterazy (Kędzia, 2009; Kędzia & Holderna-Kędzia, 2005).

Pionierem badań klinicznych nad aktywnością oraz zastosowaniem ekstraktów propolisu w leczeniu trudno gojących się ran przewlekłych był profesor Stan Scheller (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach). Szczególne zasługi w tym temacie przypisuje się również profesorowi Bogdanowi Kędzi (Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii). Obaj badacze określili szczególną aktywność ekstraktu propolisu wobec bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) oraz szczepów maczugowców i prątków gruźlicy.

W ekstraktach z propolisu krajowego i europejskiego działanie antybiotyczne, zarówno wobec bakterii jak i grzybów, wykazują dwie grupy związków: flawonoidy i estry kwasów fenolowych. Do najsilniej działających substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym

można zaliczyć pinocembrynę, galanginę, pinostrobinę, apigeninę, myricetynę, luteolinę, ester etylowy kwasu kawowego i ester fenetylowy kwasu kawowego. Wysoką aktywnością antybiotyczną odznaczał się również kwas galusowy.

Badania Mertznera i współpracowników wykazały, że najsilniejszym działaniem wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* odznaczała się pinocembryna, nieco słabszym – ester etylowy kwasu kawowego, ester benzylowy kwasu *p*-kumarowego i galangina. Ponadto stwierdzono, że wyizolowane związki wykazywały od 5 do 20 razy silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu do ekstraktu etanolowego z propolisu. Kędzia i wsp. prowadzili także badania nad aktywnością wobec *S. aureus* z zastosowaniem ekstraktu eterowego. Najsilniejsze działanie z wyizolowanych z niego związków wykazywały pinostrobinina oraz apigenina jednak aktywność antybiotyczna oznaczonych związków była od 4 do 20 razy niższa od aktywności samego ekstraktu eterowego (Kędzia & Hołderna-Kędzia, 2013).

Wiadomo, iż każda grupa, a nawet poszczególne flawonoidy oddziałują w odmienny sposób z komórkami drobnoustrojów. Udowodniono na przykład, że kwercetyna posiada zdolność bakteriobójczą dzięki hamowaniu gyrazy DNA bakterii. Odmienny wpływ na komórki bakteryjne wykazuje np. sophoraflawon G. Flawonoid ten hamuje wzrost drobnoustrojów poprzez zaburzenie funkcji błony komórkowej (Cushnie & Lamb, 2005). Kolejnym przykładem może być likochalkon A, mający działanie bakteriobójcze na skutek integracji w przemiany energetyczne drobnoustrojów. Jednym z flawonoidów zasługujących na szczególną uwagę jest galangina. Jej międzynarodowa nazwa chemiczna to 3,5,7-trihydroksyflawon. Cushine i wsp. podają, że galangina powoduje agregację komórek gronkowców, powodując tym samym zaburzenia w ich rozwoju. Flawonoid ten ma również hamować replikację wirusów i bakterii Gram-dodatnich (Cushine et al., 2007; Kędzia & Hołderna-Kędzia, 2013; Kubina et al., 2009). Natomiast Bryan i in. wskazali również na inne mechanizmy działania propolisu. W swoich badaniach zastosowali ekstrakt etanolowy propolisu rosyjskiego, którym traktowali komórki *E. coli* oraz *S. aureus*. Obserwacje z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wykazały silne zniszczenia ściany komórkowej oraz błony komórkowej, co z kolei prowadzi do lizy oraz śmierci komórki (Bryan et al., 2016). Borges i in. wykazali, że celem molekularnym kwasów fenolowych takich jak kwas galusowy czy ferulowy jest błona komórkowa bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Powodują one zmiany hydrofobowości i ładunku powierzchniowego komórki prowadząc do wycieku zawartości cytoplazmy (Borges et al., 2013). Podobny efekt działania w stosunku do bony komórkowej *C. albicans* zaproponowano dla pochodnych kwasu kawowego (Sung & Lee, 2010). Bryan i wsp., stwierdzili natomiast, że propolis przeciwdziała tworzeniu biofilmu, dzięki któremu mikroorganizmy zyskują oporność zarówno na odpowiedź immunologiczną gospodarza jak i leki stosowane w przypadku infekcji (Bryan et al., 2016)



#### **1.4. Aktywność nie-antybiotykowych produktów pochodzenia naturalnego w zwalczaniu biofilmu**

Liczne doniesienia o oporności biofilmu na leki sprawiają, że związków aktywnych poszukuje się także wśród produktów pochodzenia naturalnego. Nieocenione źródło związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej stanowią rośliny, które w medycynie naturalnej są stosowane od tysięcy lat. Przykładowo Stantiuc i in. stwierdzili aktywność ekstraktów roślin takich jak arnika górską (*Arnica Montana*), bylica piołun (*Artemisia absinthium*) i pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*) wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i drożdży w formie planktonicznej, oraz wobec *S. aureus* i *C. albicans* w formie biofilmu (Stantiuc et al., 2011). Część badaczy podejmuje tematykę aktywności ekstraktów propolisów pszczelich, których źródło także stanowią różne gatunki roślin, jednak dotychczas doniesienia na temat aktywności propolisu wobec biofilmu tworzonego przez *Candida* nie są zbyt liczne. Jeden z zespołów sprawdzał aktywność brazylijskiego propolisu wobec 29 izolatów klinicznych pozyskanych od pacjentek chorujących na kandydozę pochwy. Wartości MIC ekstraktów etanolowych propolisów mieściły się w zakresie od 68 do 547 µg/ml całkowitej zawartości fenoli (TPC *ang. total phenolic content*). Stężenie 547 µg/ml powodowało śmierć 76% komórek w biofilmie (Capoci et al., 2015). Tobaldini-Valerio i in. badali wpływ propolisu brazylijskiego na formowanie biofilmu oraz eradykację biofilmu już wcześniej wytworzonego. Wykazali, że ekstrakt propolisu w stężeniu 450 -700 µg/ml całkowitej zawartości fenoli hamuje tworzenie biofilmu utworzonego przez *C. albicans*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* w 90%, a stężenie 1400 µg/ml w 99,9%. Dodatkowo ekstrakty były zdolne do niszczenia struktury biofilmu uprzednio uformowanego (potwierdzono za pomocą zdjęć z SEM) (Tobaldini-Valerio et al., 2016). Zespół de Castro określił, że EEP w stężeniach 0,25-1,25% redukuje aktywność metaboliczną biofilmu o 40-45% (De Castro et al., 2013). Innym przykładem związków o aktywności przeciwbiofilmowej są olejki eteryczne. Przykładowo Almeida i wsp. stwierdzili, że olejki cytrynowy i cytrynela w stężeniach odpowiednio 65 i 250 µg/ml hamują tworzenie biofilmu, ale nie są skuteczne do eradykacji biofilmu 48-godzinny (Almeida et al., 2016). Freires i in. wykazali aktywność olejku pozyskanego z kolendry siewnej (*Coriandrum sativum*) wobec biofilmu wytwarzanego przez *C. albicans* (na podstawie zdjęć z SEM) (Freires et al., 2014). Wyniki badań Pires i wsp. potwierdzają efektywność olejku cytrynowego wobec biofilmu formowanego przez *Candida orthopsilosis* i *C. parapsilosis*. Wyznaczone stężenia redukujące wzrost (MBRC *ang. minimum biofilm reduction concentration*) wynosiły odpowiednio 1000 i 2000 µg/ml, natomiast stężenie hamujące tworzenie biofilmu wynosiło 250 µg/ml (Pires et al., 2011). Aktywność wobec biofilmu formowanego przez *C. albicans* została oznaczona także dla olejku z bazylii amerykańskiej (*Ocimum americanum*) (Thaweboon & Thaweboon, 2009). Pires i in. wykazali aktywność kwasu usninowego (metabolit wtórny porostów) do zwalczania biofilmu tworzonego przez *C. parapsilosis* i *C. orthoparapsilosis* (Pires et al., 2012). Inni badacze stwierdzili również aktywność wobec biofilmu formowanego przez *C. albicans* ekstraktów pozyskanych z roślin *Caesalpinia ferrea*, *Cassia spectabilis*, *Croton cajucara* oraz czosnku (Alviano et al., 2005; Sampaio et al., 2009; Sangetha et al., 2009; Shuford et al., 2005).



### **1.5. Oporność drobnoustrojów na nie-antybiotyczne produkty pochodzenia naturalnego**

Większość obecnie produkowanych antybiotyków została wygenerowana właśnie z produktów pochodzenia naturalnego (metabolity wtórne pleśni i promieniowców). Jednak w leczeniu stosuje się je w formie oczyszczonej i w efekcie zwalczanie patogenów prowadzone jest z wykorzystaniem jednej substancji działającej na określony, często białkowy cel molekularny. Takie podejście skutkuje szybkim nabywaniem oporności – pojawiają się mutanty produkujące większe ilości celu molekularnego bądź też cel molekularny jest modyfikowany – niewrażliwy na działanie leku. Taki mechanizm działania wykazują chemoterapeutyki przeciwgrzybowe: antybiotyki (polieny i echinokandyny) jak i syntetyczne antymykotyki (azole i 5-fluorocytosyna), to z kolei skutkuje szybkim rozwojem oporności – z wyjątkiem amfoterycyny B, dla której celem molekularnym jest błona komórkowa. Podejście zaproponowane w tej pracy dotyczy możliwości stosowania produktów naturalnych jako całości - mieszaniny substancji. Takie podejście wiąże się z mniejszym prawdopodobieństwem selekcji mutantów opornych. Mieszanka substancji jaką jest propolis czy olejki działa jednocześnie na wiele celów molekularnych, a jednoczesna modyfikacja przez komórkę wszystkich jest mało prawdopodobna. Dlatego też znacznie trudniej jest wyizolować szczep, który wykazywałby oporność na tak złożone mieszaniny. Z drugiej strony duża zmienność składu chemicznego i co za tym idzie duże różnice aktywności nawet olejków pozyskiwanych z tych samych źródeł botanicznych jest znaczącym utrudnieniem. Przede wszystkim wiąże się to z małym prawdopodobieństwem zastosowania ich w terapii infekcji układowych, ponieważ każdy produkt farmaceutyczny musi mieć ściśle określony skład. Jednak w przypadku infekcji grzybiczych duży odsetek schorzeń to infekcje zlokalizowane na powierzchniowej skórze, błony śluzowej, jamy ustnej czy dróg rodnych, a w takich przypadkach realne byłoby zastosowanie w terapii właśnie produktów pochodzenia naturalnego. Oprócz samego faktu skutecznej terapii tego typu infekcji z wykorzystaniem produktów naturalnych, kolejną korzyścią byłoby ograniczenie stosowania klasycznych chemoterapeutyków, co z kolei zmniejszyłoby ryzyko selekcji mutantów opornych na ich działanie. Podobny efekt można by uzyskać w przypadku wykazania synergistycznego działania produktów naturalnych i antymykotyków. Jeden z aspektów tej pracy dotyczy właśnie możliwości nabierania oporności na PPN. Przegląd literaturowy tej kwestii nie dostarcza wielu informacji. W bazie NCBI znajduje się jedna publikacja, w której opisane zostały badania możliwości nabierania oporności na propolis. Jest to praca zespołu badawczego Pippi, w której przedstawili wyniki badań dotyczące czerwonego propolisu brazylijskiego. W eksperymencie opisanym w tej publikacji, komórki *Candida* były wielokrotnie pasażowane we wzrastającym stężeniu ekstraktu propolisu oraz dla porównania flukonazolu. Pod koniec eksperymentu zostały oznaczone wartości MIC dla obydwu związków i porównane do wartości MIC początkowych. Okazało się, że wartość ta dla flukonazolu znacznie wzrosła, a dla propolisu pozostała niezmienną (Pippi et al., 2015). W literaturze brak dotychczas informacji na temat wpływu ekstraktów propolisu na poziomy ekspresji genów wywołujących oporność w tym geny kodujące pompy wielolekowe oraz na możliwość indukowania mutacji

w genomie. Możliwość zyskiwania oporności przez *Helicobacter pylori* na olejek z trawy cytrynowej badał zespół Ohno. Badania polegały na wielokrotnym pasażowaniu kolonii na podłożach z dodatkiem subletalnego stężenia olejku i porównaniu wartości MIC przed i po eksperymencie. W przeciwieństwie do efektu obserwowanego dla działania antybiotyku klatromycyny, bakterie te nie były w stanie uzyskać oporności na olejek (Ohno et al., 2003). Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest fakt, że patogenom trudno jest rozwinąć oporność na tak złożoną mieszaninę, w której związki mogą wykazywać odmienne mechanizmy działania (Daferera et al., 2003).

## 2. MATERIAŁY I METODY

### 2.1. Drobnoustroje będące przedmiotem badań

W badaniach wykorzystano kolekcję szczepów drożdżaków z gatunków *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei*, które otrzymano z czterech szpitali: Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (44 szczepy *C. albicans* i 17 *C. glabrata*, 10 *C. krusei*), Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (54 *C. glabrata*), Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (104 *C. albicans* i 10 *C. glabrata*) oraz ze szpitala Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (10 *C. glabrata*). Szczepy izolowane były od pacjentów z różnych miejsc fizjologicznych; gardła, płuc, oskrzelowo-płucnych, płynu z jamy otrzewnej, stomii, gastrostomii, kału, odbytu, moczu, krwi, pochwy, kanału szyjki macicy, ran oraz z cewników naczyniowych. Ponadto, w badaniach stosowano szczepy wzorcowe: *C. albicans* ATCC 10231 wyizolowany w latach sześćdziesiątych od pacjenta we wczesnym stadium infekcji, *C. albicans* SC5314 izolat kliniczny wyizolowany od pacjenta w latach siedemdziesiątych, obecnie najczęściej stosowany szczep wzorcowy *C. albicans* we wszystkich laboratoriach na świecie, *C. glabrata* DSM 11226 (Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), *C. albicans* Gu4 oraz B3 (wrażliwe na flukonazol, izolowane od pacjenta przed terapią flukonazolem) oraz odpowiadające im izolaty odporne na flukonazol izolowane od tego samego pacjenta po terapii flukonazolem Gu5 i B4, z czego pierwszy charakteryzuje się stale podniesionym poziomem ekspresji genów *CDR1* i *CDR2* a drugi *MDR1*. Szczepy B3, B4, Gu4, Gu5 otrzymano od Profesora Morschhäusera z Uniwersytetu w Würzburgu (Franz et al., 1998; Franz et al., 1999). Identyfikację gatunkową wszystkich szczepów potwierdzono za pomocą posiewów na podłożu chromogennym ChromAgar, poprzez reakcję PCR ze starterami specyficznymi gatunkowo oraz za pomocą komercyjnie dostępnych testów API *Candida* (BioMérieux, Francja).

### 2.2. Sprzęt i materiały laboratoryjne

Aparatura:

- cytometr przepływowy FACScan, *Becton Dickinson*,
- cytometr przepływowy Guava easyCyte, *Merck*,
- komora laminarna, *ThermoFisher*,
- mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60 U-DICT z kamerą DP50, *Olympus*,
- mikroskop konfokalny Olympus IX81, *Olympus*,
- termocykler LightCycler 480, *Roche*,
- termocykler 7500 Fast Real Time PCR System, *Applied Biosystems*,
- homogenizator FastPrep 120, *Savant*,
- pH-metr, *Elmetron*,
- pipety automatyczne, *Eppendorf*,
- spektrofotometr, *ThermoSpectronic*,
- waga analityczna, *Zakłady Mechaniki Precyzyjnej Gdańsk*,

- waga laboratoryjna, *Radwag*,
- wirówka, *Sigma, Eppendorf*.

Materiały jednorazowego użytku:

- mikropłytki z tworzywa sztucznego, sterylne, 96-studzienkowe oraz 24-studzienkowe, *Medlab*,
- płytki Petriego, sterylne, *Medlab*,
- krążki bibułkowe, jałowe, czyste, *Oxoid*,
- filtry membranowe do sterylizacji, PES, 0,2  $\mu\text{m}$ , *Cronus*,
- jednorazowe butle do sterylizacji podłoży płynnych z filtrem, *Greener Bio One*,
- cewniki wykonane z silikonu lub PVC, *Zarys*.

### 2.3. Stosowane podłoża

Do hodowli drożdży wykorzystano następujące podłoża stałe i płynne:

#### Stock medium

Medium stosowane do wykonywania i przechowywania konserw z komórek drożdży w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- |                           |      |
|---------------------------|------|
| • ekstrakt drożdżowy      | 1g,  |
| • pepton bakteriologiczny | 2 g. |

Składniki rozpuszczono w 50 ml wody destylowanej, dodano 27 ml glicerolu 92%. Dopełniono do objętości 100 ml. Medium jałowiono ( $121^{\circ}\text{C}$ , 30 min).

#### Podłoże YPD gotowe (A&A Biotechnoogy):

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| • pepton             | 20 g,                 |
| • ekstrakt drożdżowy | 10 g,                 |
| • glukoza            | 20 g,                 |
| • agar               | 20 g,                 |
| • chloramfenikol     | 34 $\mu\text{g/ml}$ . |

70 g gotowej pożywki rozpuszczono w 930 ml wody destylowanej i sterylizowano w autoklawie ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1,5 atm., 30 min). Po ochłodzeniu do temperatury około  $60^{\circ}\text{C}$  do podłoża dodano chloramfenikol do końcowego stężenia 34  $\mu\text{g/ml}$ , rozlewano je na płytki Petriego i pozostawiono do wystygnięcia.

#### Podłoże YPD

- |   |       |
|---|-------|
| • granulowany ekstrakt drożdżowy (Merck), | 10 g, |
| • pepton bakteriologiczny (Oxoid),        | 20 g, |
| • agar bakteriologiczny (Difco),          | 15 g. |

Wszystkie składniki rozpuszczono w 900 ml wody dejonizowanej, dopełniono wodą do 950 ml. Podłoże jałowiono ( $121^{\circ}\text{C}$ , 30 min), po czym dodano 50 ml jałowego 40% roztworu glukozy.

### **Podłoże płynne Sabouraud (Oxoid):**

- dekstroza 20 g,
- hydrolizat kazeinowy trzustki 5 g,
- pepton trawienny z tkanek zwierzęcych 5 g.

30 g gotowej pożywki rozpuszczono w 970 ml wody destylowanej i sterylizowano w autoklawie (121°C, 1,5 atm., 30 min).

### **LowFlow Medium**

Jest to medium, w którym można prowadzić hodowle, a następnie wykonywać obserwacje z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Medium nie zawiera w składzie kwasu foliowego i ryboflawiny, dzięki czemu nie jest obserwowana fluorescencja tła.

- YNB bez aminokwasów, kwasu foliowego i ryboflawiny (Formedium, UK) 6,9 g,
- siarczan amonu (Sigma) 5 g,
- mieszanina aminokwasów (MP Biomedicals, USA) 0,79 g.

Składniki rozpuszczono w 900 ml wody Milli-Q. Ustalono pH 5,5 za pomocą 4 M NaOH i dopełniono do objętości 950 ml. Podłoże jałowiono (121°C, 30 min) po czym dodano 50 ml sterylnego, 40% roztworu glukozy.

### **RPMI 1640 medium:**

- RPMI 1640 (Sigma) 10,4 g,
- glukoza bezwodna (Sigma) 18 g,
- MOPS (Sigma) 35 g.

Wszystkie składniki rozpuszczono w 900 ml wody destylowanej. Ustalono pH 7,0 za pomocą 4 M roztworu NaOH i dopełniono objętość do 1000 ml. Medium sterylizowano przez niepirogenny filtr o średnicy porów 0,2 µm.

### **Podłoże ChromAgar (Biocorp):**

- glukoza 20 g,
- pepton 10 g,
- chloramfenikol 0,5 g,
- mieszanina chromogenna 0,4 g,
- agar 15 g.

45,9 g gotowego podłoża rozpuszczono w 1000 ml jałowej wody destylowanej, ogrzano w łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia składników. Po schłodzeniu podłoże wylewano na płytki Petriego i pozostawiono do zestalenia.

#### **2.4. Komercyjnie dostępne zestawy reakcyjne:**

- zestaw do określania lekowrażliwości „Sensititre YeastOne YO10” (TREK Diagnostics Systems). Numer referencyjny YO10,
- zestaw do izolacji DNA z drożdży „Genomic Mini AX Yeast” (A&A Biotechnology). Numer katalogowy 058-60,
- mieszaniny składników do reakcji PCR – „PCR MixPlus”, „PCR MixPlus HGC” oraz „StartWarm HS-PCR Mix” (A&A Biotechnology). W skład powyższych mieszanin reakcyjnych PCR wchodziły: Taq DNA polimeraza 0,1 U/ $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, mieszanina deoksynukleotydów (dATP,dGTP,dCTP, dTTP) 0,5 mM każdego, czerwony barwnik, bufor obciążający, dodatkowo w składzie drugiej mieszaniny PCR MixPlus HGC znajdowały się czynniki podwyższające specyficzność reakcji PCR,
- zestawy do izolacji RNA z drożdży : „Total RNA mini Plus” numer katalogowy 036-100, „Total RNA mini Plus Concentrator” numer katalogowy 036-100C lub „Total RNA” numer katalogowy 031-100,
- zestaw do izolacji RNA „ISOLATE II RNA Mini Kit” (Bioline). Numer katalogowy BIO-52072,
- zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji „TranScriba” (A&A Biotechnology). Numer katalogowy 4000-100. W skład zestawu wchodziły:
  - TranScriba Odwrotna Transkryptaza (20 U/ $\mu$ l),
  - inhibitor RNAz (40 U),
  - 5 × stężony bufor reakcyjny,
  - mieszanina dNTPów (10 mM),
  - starter oligo(dT)<sub>18</sub> (100  $\mu$ M),
  - woda wolna od RNAz i DNAz.
- zestaw do reakcji real time PCR „2xHS-PCR Master Mix Probe” (A&A Biotechnology) Numer katalogowy 2017-200P. W skład zestawu wchodziły:
  - woda jałowa wolna od nukleaz,
  - real time 2xHS-PCR Master Mix Probe (Taq DNA polimeraza 0,1 U/ $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub> 10 mM, dNTPs (dATP,dGTP,dCTP, dTTP) 0,5 mM każdego, bufor reakcyjny 2x stężony),
- zestaw do reakcji real time PCR „SensiFAST Probe No - ROX Kit” (Bioline). Numer katalogowy BIO-86005. W skład zestawu wchodziły:
  - woda jałowa wolna od nukleaz,
  - mieszanina SensiFAST Probe No-ROX mix (2x stężona) zawierająca polimerazę aktywowaną termicznie, jony magnezu, mieszaninę deoksynukleotydów, stabilizatory oraz wzmacniacze reakcji,

- zestawy do oczyszczania genu po amplifikacji „Clean Up” (A&A Biotechnoogy) numer katalogowy 0211-50 oraz „Clean Up AX” (A&A Biotechnoogy) numer katalogowy 026-50,
- zestaw do odwrotnej transkrypcji iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad, USA). Numer katalogowy 170-8891,
- zestaw do reakcji real time PCR GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA). Numer katalogowy A6002.

## 2.5. **Odczynniki stosowane do elektroforezy DNA w żelach agarozowych**

- roztwór bromku etydyny 1 µg/ml,
- agarozą,
- bufor 1 × TAE (10 mM Tris pH 8,3, 90 mM kwas borowy, 1 mM EDTA),
- markery:
  - Marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder 0,5 µg/µl Fermentas 100-1000pz.
  - Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder 0,5 µg/µl Fermentas 250-10000 pz.

## 2.6. **Roztwory**

### 10 x PBS:

- |                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| • NaCl                             | 80 g,   |
| • KCl                              | 2 g,    |
| • Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 14,4 g, |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,4 g.  |

Wszystkie sole rozpuszczono w wodzie dejonizowanej dopełniając objętość do 1000 ml. Następnie roztwór jałowiono (121<sup>0</sup>C, 1,5 atm, 30 min).

### 40% roztwór glukozy:

- |                               |             |
|-------------------------------|-------------|
| • glukoza × 2H <sub>2</sub> O | 480 g,      |
| • Woda Milli-Q                | do 1000 ml. |

Glukozę rozpuszczono w wodzie dejonizowanej dopełniając objętość do 1000 ml i jałowiono (121<sup>0</sup>C, 1,5 atm, 30 min).

### Roztwór PCI do izolacji DNA:

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| • fenol              | 25 ml, |
| • chloroform         | 24 ml, |
| • alkohol izoamylowy | 1 ml.  |

Wszystkie rozpuszczalniki zmieszano. Na wierzch naniesiono roztwór wodny Tris w celu zapobiegania utleniania fenolu (dwie rozdzielone warstwy) i przechowywano w lodówce. Do izolacji DNA stosowano dolną warstwę.

## 1 M roztwór octanu litu do transformacji

10,2 g octanu litu rozpuszczono w wodzie do objętości końcowej 100 ml. Ustalono pH 7,5. Roztwór jałowiono (121°C, 1,5 atm, 30 min).

## 50% roztwór PEG do transformacji

50 g PEG o masie molekularnej 3350 (Sigma) rozpuszczono w wodzie destylowanej dopełniając do objętości 100 ml. Roztwór jałowiono (121°C, 1,5 atm, 30 min).

## 2.7. Inne stosowane związki i odczynniki

- barwniki fluorescencyjne:
  - Calcofluor White (CFW), *Sigma*,
  - Jodek propidyny (PI), *Sigma*,
  - Dioctan fluoresceiny (FDA), *Sigma*,
  - DiBAC<sub>4</sub> (kwas bis- (1,3-dibutylobarbiturowy) trimetino oksonol), *Sigma*,
- odczynnik TRIzol do izolacji RNA, *Invitrogen*,
- polimeraza DNA Ex Taq, *TaKaRa, Clontech Laboratories*,
- polimeraza Q5 oraz bufor, *New England BioLabs*,
- flukonazol, *Sigma*,
- worykonazol, *Sigma*,
- amfoterycyna B, *Sigma*,
- MTT (bromek 3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo) -2,5-difenylotetrazoliowy), *Sigma*,
- XTT ((2,3-bis- (2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo) -2H-tetrazolo-5-karboksyanilid), *Sigma*,
- menadion, *Sigma*,
- 7-AAD (7-aminoaktynomycyna D), *Sigma*,
- Sybr Safe, *Thermo Fisher Scientific*,
- bufor stayRNA, *A&A Biotechnology*.

## 2.8. Olejki eteryczne

W badaniach przetestowano 38 olejków eterycznych z linii „Dr Beta” dystrybuowanych w Polsce przez firmę Pollena Aroma. Były to olejki: z drzewa różanego (*Aniba rosaeodora*), lawendowy (*Lavandula angustifolia*), mandarynkowy (*Citrus nobilis*), bergamotowy (*Citrus aurantium Bergami*), rozmarynowy (*Rosmarinus officinalis*), petigrain (*Citrus aurantium Amara*), jałowcowy (*Juniperus communis*), sosnowy (*Pinus silvestris*), eukaliptusowy (*Eucalyptus globulus*), jodłowy (*Abies Cibirica*), manuka (*Leptospermum scoparium*), kminkowy (*Carum carvi*), mięty pieprzowej (*Mentha piperita*), hyzopowy (*Hyssopus officinalis*), tymiankowy (*Thymus vulgaris*), ylangowy (*Cananga odorata*), cytrynowy (*Citrus limonum*), imbirowy (*Zingiber officinale*), kopru włoskiego (*Foeniculum vulgare*), rumianku rzymskiego (*Anthemis nobilis*), limetkowy (*Citrus aurantifolia*), pomarańczowy (*Citrus aurantium dulcis*), geraniowy (*Pelargonium graveolens*), cedrowy (*Juniperus virginiana*), szalwi muszkatołowej (*Salvia sclarea*), majerankowy (*Origanum majorana*), kardamonowy (*Elettaria cardamomum*), cynamonowy z kory (*Cinnamomum aromaticum*), drzewa herbacianego (*Melaleuca alternifolia*),



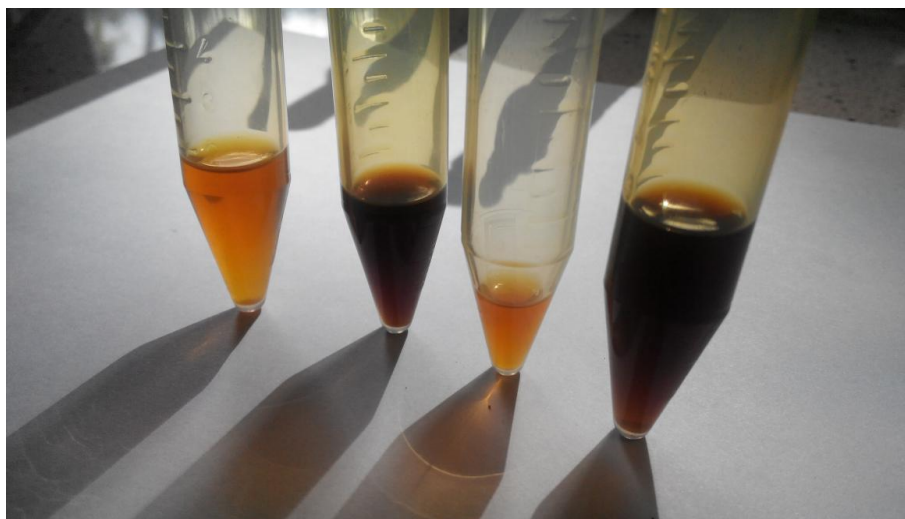
kolendrowy (*Coriandrum sativum*), sandałowy (*Santalum album*), bazyliowy (*Ocimum basilicum*), anyżowy (*Illicium verum*), grejfrutowy (*Citrus grandis*), cytronelowy (*Cymbopogon nardu*), paczulowy (*Pogostemon cablin*), goździkowy z pąków (*Eugenia caryophyllus*) oraz cyprysowy (*Cupressus sempervirens*). Producent zapewnia, iż są to 100% naturalne olejki bez dodatków, ekstrahowane za pomocą destylacji z parą wodną.

### **2.9. Propolisys pszczele i otrzymywanie ich ekstraktów etanolowych (EEP)**

W trakcie realizacji projektu, dzięki uprzejmości pszczelarzy posiadających pasieki na terenie Pomorza (m.in. miejscowości Rumia, Reda, Wejherowo, Gdańsk, Straszyn, Zblewo i inne), zgromadzono 50 prób surowego propolisu. Najczęściej do badań stosuje się ekstrakt etanolowy propolisu (Fot. 2.2), który otrzymuje się na drodze ekstrakcji surowego propolisu (Fot. 2.1) za pomocą 75% etanolu. Suchy surowiec poddawano ekstrakcji etanolem w stosunku 3:1 (v/w) w ciągu 5 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie ekstrakt odwirowano (5 000 RPM, 20 min), a następnie supernatant filtrowano za pomocą filtrów o średnicy porów 0,2 µm. Do badań aktywności oraz mechanizmów działania posłużył uzyskany ekstrakt etanolowy. Dodatkowego wyjaśnienia wymaga natomiast dobór ekstraktów do kolejnych eksperymentów. W pierwszej kolejności do badań stosowano najaktywniejsze propolisys. Jednak ze względu na to, że są to produkty o wysoce niepowtarzalnym składzie, niemożliwe było „dorobienie” drugiego takiego ekstraktu, gdy pierwotny został zużyty. W takich przypadkach do dalszych badań stosowano kolejne propolisys z listy o porównywalnej bądź nieznacznie niższej aktywności.



**Fot. 2.1.** Wygląd surowego propolisu pszczelego



**Fot. 2.2.** Wygląd ekstraktów etanolowych propolisów (EEP). Warto zwrócić uwagę na różne zabarwienie ekstraktów pochodzących z różnych miejsc

### **2.10. Badania aktywności leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybiczych**

Do określenia wrażliwości drobnoustrojów na leki przeciwgrzybowe zastosowano dwie metody: komercyjnie dostępne testy Sensititre YeastOne (TREK Diagnostics Systems) oraz metodę rekomendowaną przez CLSI wg normy M27-A3.

#### **2.10.1. Ocena lekowrażliwości z zastosowaniem testu Sensititre**

Wyznaczenie wartości MIC możliwe było dzięki komercyjnie dostępnym testom SYO (Sensititre YeastOne) zawierającym liofilizaty 9 najpopularniejszych chemoterapeutyków o aktywności przeciwgrzybowej, które po rozpuszczeniu w rekomendowanej objętości podłoża skutkują uzyskaniem stężeń w zakresach: anidulafungina (0,015-8 µg/ml), mikafungina (0,008-8 µg/ml), kaspofungina (0,008-8 µg/ml), 5-fluorocytozyna (0,06-64 µg/ml), posakonazol (0,008-8 µg/ml), worykonazol (0,008-8 µg/ml), itrakonazol (0,015-16 µg/ml), flukonazol (0,012-256 µg/ml) oraz amfoterycyna B (0,12-8 µg/ml). Testy wykonano w 96-dołkowych płytkach zawierających w rzędach kolejne antymykotyki oraz niebieski barwnik Almar Blue zmieniający zabarwienie na różowe pod wpływem reakcji redoks zachodzącej w żywych komórkach. Liczbę komórek ustalano na poziomie  $1,5 - 2 \times 10^3$  w podłożu RPMI i inokulowano studzienki płytki 96-dołkowej 100 µl uzyskanej zawiesiny. Płytki pokrywano folią uszczelniającą i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Wartość MIC została oznaczona jako stężenie w pierwszej studzienke, której nie obserwowano wzrostu (czyli pierwsza niebieska po serii różowych).

#### **2.10.2. Ocena wrażliwości na flukonazol z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeniowej rekomendowanej przez CLSI**

Badania aktywności zostały przeprowadzone metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń na podstawie zaleceń CLSI z normy M27-A3 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard–Third Edition) (Rex et al., 2008). Badania prowadzono w sterylnych 96-dołkowych mikroplytkach z zastosowaniem podłoża RPMI-1640.

Po całonocnej hodowli (16-18 h) na podłożu stałym YPD komórki badanych szczepów zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Po ustaleniu gęstości optycznej  $OD_{660}$  na poziomie około 0,1 (co odpowiada  $10^6$  komórek w 1 ml zawiesiny), inokulum rozcieńczano 50-krotnie, aby uzyskać gęstość komórek wynoszącą  $2 \times 10^4$  komórek w 1 ml zawiesiny. W płytkach mikrotitracyjnych ustalano gradient flukonazolu w zakresie stężeń 256 – 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Przedostatnia kolumna stanowiła kontrolę czystości medium hodowlanego, a ostatnia kontrolę wzrostu mikroorganizmu. Następnie do wszystkich studzienek na płytce pomijając przedostatnią kolumnę наносono po 100  $\mu\text{l}$  inokulum o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek w 1 ml zawiesiny. Płytkę przykrywano wieczkiem i inkubowano 24 h w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Po inkubacji dokonywano pomiaru absorbancji przy długości światła 531 nm za pomocą czytnika płytek Victor<sup>3</sup> (Perkin Elmer, USA). Jako wartość MIC oznaczano stężenie związku powodujące obniżenie OD o 50% ( $\text{MIC}_{50}$ ) lub o 90% ( $\text{MIC}_{90}$ ) w porównaniu do kontroli wzrostu.

## **2.11. Badania mechanizmów oporności na najczęściej stosowane leki przeciwgrzybicze**

### **2.11.1. Badanie poziomu ekspresji genów**

W badaniach porównywana była ekspresja genów *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* oraz *MDR1*. Genem referencyjnym w przypadku gatunku *C. glabrata* był *URA3* kodujący dekarboksylazę orotydyno-5'-fosforanu, natomiast dla *C. albicans* gen *ACT1* kodujący aktynę. Badanie poziomu ekspresji genów wymagało następujących etapów; izolacja RNA, odwrotna transkrypcja oraz reakcja real time PCR.

#### **2.11.1.1. Procedura izolacji RNA z drożdżaków *Candida***

Z nocnej hodowli płytkowej na podłożu Sabouraud agar utworzono zawiesiny komórkowe w objętości 4 ml w płynnym podłożu Sabouraud o gęstości optycznej 0,1 przy długości światła 660 nm. Następnie hodowle wytrząsano (180 RPM,  $30^{\circ}\text{C}$ ) do osiągnięcia  $OD_{660}=0,6$  (około 5 h). Hodowle odwirowano (12 000 RPM, 2 min). Osad zawieszono w 0,5 ml buforu StayRNA (A&A Biotechnology) i przechowywano w lodówce do dalszej izolacji. Kolejnego dnia próbki odwirowano (11 000 RPM, 2 min), a osad zawieszono w 0,5 ml buforu TE (Tris/HCl-EDTA o  $\text{pH}=8,0$ ). Zawiesinę w buforze TE przeniesiono do probówek 1,5 ml zawierających kulki cyrkonowe i wytrząsano z maksymalną mocą w homogenizatorze FastPrep. Zawiesinę z kulek pobierano do nowych jałowych probówek 2 ml i kontynuowano izolację zgodnie z instrukcjami producenta z zastosowaniem jednego z zestawów do izolacji RNA firmy A&A Biotechnology zawierających w składzie fenozol i izopropanol. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

Czystość wyizolowanego RNA sprawdzana była przy pomocy reakcji PCR (skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w tabeli 2.1 a profil temperaturowo-czasowy w tabeli 2.2.). Ponieważ na żelu agarozowym widoczne były produkty reakcji, oznaczało to, że RNA zanieczyszczone było przez DNA i konieczne było oczyszczanie próbek enzymem DNazą (A&A Biotechnology). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w tabeli 2.3.

**Tabela 2. 1.** Skład mieszaniny reakcyjnej do określania czystości RNA

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
Bufor reakcyjny MixPlus	10
Starter <i>CDR1</i> forward	1
Starter <i>CDR1</i> reverse	1
Woda wolna od nukleaz	6
Matryca RNA	2

**Tabela 2. 2.** Profil temperaturowo-czasowy reakcji zastosowanej do określania czystości RNA

Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Czas [s]
94	300
94	20
63	15
72	20
72	420

**Tabela 2. 3.** Skład mieszaniny reakcyjnej do oczyszczania RNA z DNA

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
RNA	59
DNaza o stężeniu 10 U/ $\mu$ l	4
Bufor do DNazy 10-krotnie stężony	7

Próbki inkubowano w temperaturze 37 $^{\circ}$ C przez 1 godzinę. Enzym inaktywowano przez ogrzewanie w temperaturze 75 $^{\circ}$ C przez 10 min. Następnie próbki zmieszano z chlorowodorkiem guanidyny 6M i izopropanolem w stosunku 1:1:1 i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Całość naniesiono na minikolumny do izolacji RNA z zestawu do izolacji firmy A&A Biotechnology i ponownie przeprowadzano izolację (począwszy od etapu dodatku fenozolu).

W alternatywnej metodzie izolacji stosowano zestaw do izolacji RNA Isolate II RNA Mini Kit (Bioline). W metodzie tej stosuje się tiocyjanian guanidyny (łącznie z homogenizacją) do lizy komórek oraz kolumnienki krzemionkowo-membranowe do oczyszczania RNA. Izolację przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Początkowa gęstość komórkowa oraz objętość była taka sama jak w przypadku izolacji z zestawem A&A Biotechnology.

#### 2.11.1.2. Odwrotna transkrypcja

Stężenia wyizolowanych, oczyszczonych prób RNA mierzono z pomocą urządzenia NanoDrop 1000 lub NanoDrop 2000. Umożliwiło to każdorazowo pobranie takiej samej ilości RNA, potrzebnej do wykonania reakcji odwrotnej transkrypcji za pomocą zestawu TranScriba (A&A Biotechnology). Do jałowych probówek umieszczonych w lodzie dodano 2,5  $\mu$ l startera oligo (dT)<sub>18</sub>, maksymalną możliwą ilość RNA (zestaw do izolacji RNA Bioline cechował się dużą wydajnością dlatego dla gatunku *C. albicans* możliwe było odmierzenie 2200 ng RNA, a w przypadku izolacji RNA z *C. glabrata* zestawem A&A Biotechnology możliwe było pobranie 460 ng RNA) oraz wody do objętości 22,5  $\mu$ l. Próby inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65 $^{\circ}$ C, aby zdenaturować struktury drugorzędowe RNA. Następnie mieszaniny zwirowano i schłodzono w lodzie, po czym dodano po 10  $\mu$ l buforu reakcyjnego, 5  $\mu$ l mieszaniny

deoksynukleotydów oraz 10 µl odwrotnej transkryptazy TranScriba. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 60 minut w temperaturze 41<sup>0</sup>C, a następnie 5 minut w temperaturze 70<sup>0</sup>C, aby zakończyć reakcję poprzez denaturację enzymu. Końcowa objętość cDNA wynosiła 50 µl. Następnie próby zostały rozcieńczone 4-krotnie.

### 2.11.1.3. Reakcja real time PCR

Aby ustalić odpowiednie warunki reakcji dla gatunku *C. glabrata* w początkowym etapie wykonywano krzywe standardowe dla każdego genu. W tym celu sporządzono mieszaninę wszystkich matryc cDNA, następnie jej 2, 4, 8, 16 krotne rozcieńczenia i przeprowadzano reakcje zmieniając warunki profilu temperaturowo-czasowego bądź ilość dodawanych starterów. Reakcja została przeprowadzona w objętości 20 µl, skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 10 µl mieszaniny real time 2xHS-PCR Master Mix Probe, po 1 µl każdego z pary starterów (10 µM) (wykaz starterów i sond przedstawiony jest w tabeli 2.4.), 0,5 µl roztworu sond molekularnych (10 µM), 1 µl matrycy cDNA, woda wolna od RNaz do objętości końcowej 20 µl. Dla każdego rozcieńczenia reakcja została przeprowadzona trzykrotnie. Jeżeli współczynnik kierunkowy uzyskanej krzywej standardowej wynosi w przybliżeniu -3,32 oznacza to, że wydajność reakcji wynosi 100% (Tyburski et al., 2008), czyli w każdym cyklu następuje podwojenie ilości produktu. Wyznaczone optymalne warunki reakcji amplifikacji dla genów z gatunku *C. glabrata* przedstawione są w tabeli 2.5.

**Tabela 2. 4.** Wykaz starterów i sond użytych do reakcji real time PCR dla gatunku *C. glabrata*

Nr dostępu w GenBank	Oznaczenie startera/sondy	Sekwencja 5'-3'	Lokalizacja w genomie (5'-3')
<i>CDR1</i> (AF109723)	<i>Cgcdr1f</i>	TAGCACATCAACTACACGAACGT	4500–4522
	<i>Cgcdr1r</i>	AGAGTGAACATTAAGGATGCCATG	4624-4647
	<i>Cgcdr1 pr</i>	6FAM-TGCTGCTGCTTCTGCCACCTGGTT-TAMRA	4621–4644
<i>CDR2</i> (AF251023)	<i>Cgcdr2f</i>	GTGCTTTATGAAGGCTACCAGATT	164–187
	<i>Cgcdr2r</i>	TCTTAGGACAGAAGTAACCCATCT	251-274
	<i>cdr2 pr</i>	6FAM-TACCTTTGCGTGCTGGGCGTCACC-TAMRA	
<i>ERG11</i> (L40389)	<i>Cgerg11f</i>	ATTGGTGCTTTGATGGGTGGTC	928–949
	<i>Cgerg11r</i>	TCTTCTTGACATCTGGTCTTTCA	996-1019
	<i>Cgerg11 pr</i>	6FAM-ACTTCCGCTGCTACCTCCGCTTGG-TAMRA	
<i>URA3</i> (L13661)	<i>Cgura3f</i>	GAAAACCAATCTTTGTGCTTCTCT	168–191
	<i>Cgura3r</i>	CATGAGTCTTAAGCAAGCAAATGT	268-291
	<i>Cgura3 pr</i>	6FAM -ACGTCACCACCAGCGAATTGT-TAMRA	194-217

**Tabela 2. 5.** Profil temperaturowo-czasowy reakcji real time PCR dla gatunku *C. glabrata*

Proces	Temperatura [°C]	Czas [s]	Gen	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	300	wszystkie	1
Denaturacja	95	15	wszystkie	50
Przyłączanie starterów	55	15	<i>URA3</i>	
	59		<i>ERG11</i>	
	59		<i>CDR1</i>	
	62		<i>CDR2</i>	
Wydłużanie	72	15	wszystkie	

Po ustaleniu odpowiednich warunków każda reakcja została przeprowadzona 2-krotnie za pomocą termocyklera LightCycler Nano 2.0. Wyniki analizowano w programie Excel oraz GraphPad Prism 5.0 przy użyciu metody Livaka (podwójnej delty).

Optymalne warunki reakcji dla genów w przypadku gatunku *C. albicans* ustalano w sposób opisany powyżej. Do przyrządzenia mieszaniny reakcyjnej wykorzystano odczynniki firmy Bioline. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 10 µl mixu SensiFAST Probe, po 2 µl każdego z pary starterów (10 µM) (wykaz starterów i sond dla gatunku *C. albicans* przedstawiony jest w tabeli 2.6), 0,5 µl sondy molekularnej (10 µM), 0,5 µl wody i 5 µl matrycy cDNA. Przy wykonywaniu reakcji dla gatunku *C. albicans* ustalono, że mniejsze błędy pipetowania zostaną popołnione, gdy dodamy większą objętość bardziej rozcieńczonej matrycy (w przypadku *C. glabrata* dodawano 1 µl matrycy, a w później wykonywanych reakcjach dla gatunku *C. albicans* 5 µl). Profil temperaturowo-czasowy przedstawiony jest w tabeli 2.7. Dla wszystkich testowanych genów (*ERG11*, *ACT1*, *MDR1*, *CDR1*, i *CDR2*) ustalono wspólną temperaturę przyłączania starterów.

**Tabela 2. 6.** Wykaz starterów użytych do reakcji real time PCR dla gatunku *C. albicans*

Nr dostępu w GenBank	Oznaczenie startera/sondy	Sekwencja 5'-3'	Lokalizacja w genomie (5'-3')
<i>CDR1</i> DQ462359.1	CaCdr1 f	CTCATGTTGCCAAACAATCC	1421-1440
	CaCdr1 r	TCGACGGATCACCTTTCATA	1521-1540
	CaCdr1 pr	[6FAM]TCGCAACACCATACCTCACTTGCA[TAM]	1484-1507
<i>CDR2</i> DQ4700011.1	CaCdr2 f	GGTATTGGCTGGTCCTAATGTGA	4080-4102
	CaCdr2 r	TGCACAAGTGACTTTTGCATTAGCT	4179-4203
	CaCdr2 pr	[6FAM]TCCC GGTTTTTGGATTTTCATGTACAGA[TAM]	4104-4131
<i>MDR1</i> Y14703.1	CaMdr1 f	TTACCTGAAACTTTTGGCAAAACA	885-901
	CaMdr1 r	ACTTGTGATTCTGTGCTTACCG	946-966
	CaMdr1 pr	[6FAM]TCGCAAGGCTAAAAGATTGAGAGCCATCA[TAM]	915-943
<i>ERG11</i> X13296.1	CaErg11 f	GTTATAAAGTGCCTGACCCTGA	1637-1658
	CaErg11 r	ATCGAAAGAAAGTTGCCGTT	1738-1757
	CaErg11 pr	[6FAM]TTTCCCAAATGATTTCTGCTGGTTCA[TAM]	1686-1711
<i>ACT1</i> XM_717232.1	CaAct1 f	TGGAAGCTGCTGGTATTGAC	761-780
	CaAct1 r	TTCAGCAATACCTGGGAACA	869-888
	CaAct1 pr	[6FAM]CAACTCCATCATGAAGTGTGACATGGA[TAM]	792-818

**Tabela 2. 7.** Profil temperaturowo-czasowy reakcji real time PCR dla gatunku *C. albicans*

Proces	Temperatura [0C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	60	1
Denaturacja	95	15	40
Przyłączanie starterów	64	15	
Wydłużanie	72	15	

Każda reakcja została wykonana w dwóch powtórzeniach przy użyciu termocyklera 7500 Fast Real Time PCR System. Do analizy danych użyto metody Livaka oraz wykorzystano programy Excel oraz GraphPad Prism 5.0.

### 2.11.2. Sekwencjonowanie genu *ERG11 C. albicans*

W celu analizy sekwencji genu *ERG11 C. albicans* (1587 pz) amplifikowano gen w dwóch fragmentach. Działanie takie było konieczne, gdyż amplifikowanie genów w całości za pomocą jednej pary starterów niemalże zawsze dawało produkty niespecyficzne (na żelu agarozowym widoczny był dodatkowy prążek o wielkości produktu bardzo zbliżonej do produktu głównego, ciężko było także wyizolować odpowiedni prążek za pomocą metody gel out). Ponadto po wielokrotnych próbach okazało się, że konieczne jest także stosowanie zestawu StartWarm HS-PCR Mix, gdyż w przypadku pozostałych stosowanych (High GC, Mix Plus (A&A Biotechnology) bądź tradycyjnie w przypadku dodawania wszystkich składników osobno także otrzymywano produkty niespecyficzne. W tabeli 2.8. przedstawione są startery zastosowane do amplifikacji genu *ERG11 C. albicans*. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji przedstawione są kolejno w 2.9 oraz 2.10.

**Tabela 2. 8.** Wykaz starterów zastosowanych do amplifikacji genu *ERG11 C. albicans*

Nazwa startera	Numer dostępu w GeneBank	Sekwencja 5'-3'	Lokalizacja w genomie (5'–3')
<i>ERG11 For Frag1</i>	X13296.1	GACAAAGAAAGGGAATTCAATCGTTATTC	52-80
<i>ERG11 Rev Frag1</i>		GTT GAC CAC CCA TAA GAA TACC	1054-1075
<i>ERG11 For Frag2</i>		GAAGAATTTTTGACCGTTCATTTGCTC	776-802
<i>ERG11 Rev Frag2</i>		CCAAC TAAGTAACAAAATGAAAACAATCAGAAC	1763-1795

**Tabela 2. 9.** Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji genu *ERG11* dla gatunku *C. albicans*

Składnik	Objętość [μl]
Mieszanina StartWarm	25
Starter <i>ERG11 For Frag 1 / Frag 2</i>	2
Starter <i>ERG11 Rev Frag 1 / Frag 2</i>	2
Woda wolna od nukleaz	19
Matryca DNA	2

**Tabela 2. 10.** Profil temperaturowo-czasowy reakcji amplifikacji genu *ERG11* dla gatunku *C. albicans*

Proces	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	300	1
Denaturacja	94	60	30
Przyłączanie starterów	59	30	
Wydłużanie starterów	72	60	
Wydłużanie końcowe	72	420	1

Produkt PCR po amplifikacji oczyszczany był za pomocą zestawu do oczyszczania produktów po reakcjach enzymatycznych „Clean up” bądź „Clean up AX” (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Do elucji użyto 30 µl buforu TE uprzednio podgrzanego do temperatury 70°C, aby zwiększyć wydajność oczyszczania. Następnie mierzono stężenie DNA w uzyskanych próbach. Powinno ono wynosić od 50 do 80 µg/ml (wymóg jednostki, w której prowadzono sekwencjonowanie), dlatego też próby o stężeniu zbyt wysokim rozcieńczano odpowiednio buforem TE. Do sekwencjonowania użyto dwóch starterów o stężeniu 5 µM; Starter *ERG11* For Frag 1 do sekwencjonowania pierwszego fragmentu genu oraz Starter *ERG11* Rev Frag 2 do sekwencjonowania drugiego fragmentu. Mieszanina do sekwencjonowania zawierała 5 µl odpowiedniego startera oraz 5 µl oczyszczonego produktu PCR odpowiedniego fragmentu we wskazanym rozcieńczeniu. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę Macrogen z Holandii.

Wyniki sekwencjonowania analizowano z użyciem programu MEGA 6.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Sekwencja uzyskana z użyciem startera forward była „gotowa do analiz” natomiast sekwencję uzyskaną ze starterem reverse należało przekształcić na odwróconą i komplementarną. Jako wzorzec do porównywania i wyszukiwania ewentualnych mutacji posłużyła sekwencja genu cytochromu p-450 o numerze dostępu w GenBanku X13296.1.

## **2.12. Badania aktywności produktów pochodzenia naturalnego**

### **2.12.1. Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost**

Aktywność przeciwgrzybową olejków eterycznych oraz ekstraktów etanolowych propolisów pszczelich wyznaczano przez określenie minimalnego stężenia związku hamującego wzrost komórek grzybiczych w 90%, czyli tzw. MIC<sub>90</sub>. Badania aktywności zostały przeprowadzone metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń na podstawie zaleceń CLSI z normy M27-A3 (Rex et al., 2008) Badania prowadzono w sterylnych 96-dółkowych płytkach z zastosowaniem podłoża RPMI-1640. Po całonocnej hodowli (16-18 h) na podłożu stałym YPD komórki badanych szczepów zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Po ustaleniu gęstości optycznej OD<sub>660</sub> na poziomie około 0,1 (co odpowiada 10<sup>6</sup> komórek w 1 ml zawiesiny), inokulum rozcieńczano 50-krotnie, aby uzyskać gęstość komórek wynoszącą 2 x 10<sup>4</sup> komórek w 1 ml zawiesiny. W płytkach mikrotitracyjnych ustalano gradient badanych związków w objętości 100 µl metodą seryjnych rozcieńczeń w taki sposób, iż w pierwszej kolumnie występowało najwyższe stężenie, a w kolejnych dwukrotnie niższe. Przedostatnia kolumna stanowiła kontrolę czystości medium hodowlanego, a ostatnia kontrolę wzrostu



mikroorganizmu. Następnie do wszystkich studzienek na płytce pomijając przedostatnią kolumnę nanoszono po 100  $\mu$ l inokulum o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek w 1 ml zawiesiny. W analogiczny sposób przygotowano kontrole, w których zamiast EEP stosowano etanol. Płytkę przykrywano wieczkiem i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Po inkubacji dokonywano odczytu wizualnego. Jako wartość MIC odczytywano stężenie związku w pierwszej studzienke, gdzie nie obserwowano wzrostu.

#### 2.12.2. Wyznaczanie minimalnego stężenia grzybobójczego

Poza określeniem wartości MIC w badaniach aktywności przeciwdrobnoustrojowej konieczne jest także wyznaczenie parametru bójczego, który w przypadku grzybów określamy jako MFC (*ang. Minimal Fungicidal Concentration*). Stężenie grzybobójcze definiowane jest jako takie, które uniemożliwia wzrost komórek grzybów, gdy są one przenoszone na medium pozbawione czynnika hamującego wzrost. W celu wyznaczenia wartości MFC zarówno w przypadku oznaczania aktywności związków alternatywnych jak i określania synergizmu, komórki z płytek 96 dołkowych przenoszono za pomocą metalowego pinnera na płytki z podłożem Sabouraud bądź YPD z dodatkiem chloramfenikolu. Płytki inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Następnie dokonywano odczytu wizualnego. Jako wartość MFC odczytywano najniższe stężenie związku ze studzienki na płytce 96-dołkowej, które uniemożliwiło wzrost komórek drożdżaka na podłożu stałym wolnym od czynnika hamującego wzrost.

#### 2.12.3. Wyznaczanie synergizmu leków przeciwgrzybiczych z produktami pochodzenia naturalnego

##### 2.12.3.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowej

Idea metody dyfuzyjno-krażkowej polega na pomiarze strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół krażka zawierającego związek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Związek dyfunduje promieniście, tworząc gradient stężeń. Największa jego koncentracja występuje przy brzegach krażka i spada wraz z odległością. Wielkość strefy zahamowania wzrostu komórek jest wprost proporcjonalna do stopnia wrażliwości mikroorganizmu na dany związek. Aby określić ewentualny efekt synergistyczny leku przeciwgrzybowego ze środkiem alternatywnym, po całonocnej hodowli (16-18 h) na podłożu stałym YPD komórki szczepu referencyjnego *C. albicans* ATCC 10231 oraz *C. glabrata* DSM 11226 zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Ustalano gęstość optyczną zawiesiny (przy długości światła 660 nm) na poziomie około 0,1 (co odpowiada  $10^6$  komórek w 1 ml zawiesiny). Wykonywano posiewy powierzchniowe na podłożu YPD lub podłożu chromogennym ChromAgar na kwadratowych płytkach o boku 12,5 cm. Na płytce umieszczano w równych odstępach trzy jałowe krażki bibułowe, na które następnie nanoszono pojedynczo lek przeciwgrzybowy i związek alternatywny oraz w kombinacji obydwu preparaty. Płytki inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Następnie dokonywano pomiaru stref zahamowania wzrostu. W metodzie alternatywnej określania synergizmu azoli i EEP zastosowano dodatek ekstraktów do agaru. W tym celu do

ochłodzonego podłoża YPD dodawano EEP w ilości umożliwiającej osiągnięcie stężenia końcowego 0,16% (v/v) i wlewano na płytki. Następnie wykonywano posiewy powierzchniowe (jak powyżej) i nakładano krążki zawierające określone zawartości leków z grupy azoli (gotowe do użytku krążki z firmy Oxoid). Dla porównania wykonano płytki bez dodatku EEP do agaru lub płytki bez krążków z lekami. Płytki inkubowano 24 h w temperaturze 37°C i obserwowano strefy zahamowania wzrostu.

#### 2.12.3.2. *Metoda checkerboard*

Efekt działania leków przeciwgrzybiczych w kombinacji z produktami pochodzenia naturalnego wyznaczano za pomocą metody checkerboard. Po całonocnej hodowli (16-18 h) na podłożu stałym YPD komórki badanych szczepów zawieszano w jałowej wodzie destylowanej. Po ustawieniu gęstości optycznej zawiesiny  $OD_{660}$  na poziomie około 0,1, inokulum rozcieńczano 50-krotnie, aby uzyskać gęstość komórek wynoszącą  $2 \times 10^4$  komórek w 1 ml zawiesiny. Na płytce mikrotitracyjnej wzdłuż osi poziomej ustalono gradient leku przeciwgrzybowego, a wzdłuż osi pionowej gradient olejku eterycznego lub ekstraktu propolisu. Gradient leku był wykonywany w objętości 50  $\mu$ l bezpośrednio na płytce za pomocą seryjnych rozcieńczeń w ten sposób, że w pierwszej kolumnie znalazło się najwyższe stężenie leku, a w dziewiątej najniższe. Malejące stężenia olejku bądź propolisu wykonywane były w osobnych probówkach w podłożu RPMI-1640, a następnie dodawane w objętości 50  $\mu$ l do studzienek w ten sposób, że w rzędzie H występowało najwyższe jego stężenie (w kolumnach od 1 do 10), a w rzędzie B najniższe. W rzędzie A (w kolumnach od 1 do 9) badano skuteczność działania samego leku bez dodatku olejku lub EEP (kolejne celki zawierały malejące stężenie samego leku), z kolei w kolumnie dziesiątej (w rzędach od H do A) badano skuteczność działania samego produktu naturalnego (w celkach tej kolumny ustalano gradient środka alternatywnego). Kolumna jedenasta stanowiła kontrolę sterylności medium hodowlanego, a kolumna dwunasta kontrolę wzrostu. Następnie do wszystkich studzienek na płytce (z wyłączeniem kolumny 11) dodawano po 100  $\mu$ l inokulum o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek w 1 ml zawiesiny. Płytkę przykrywano wieczkiem i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Po inkubacji dokonywano odczytu stopnia zmętnienia zawartości kolejnych celek za pomocą czytnika płytek przy długości światła 531 nm określając MIC samego leku, MIC samego olejku lub propolisu oraz MIC obydwu substancji w kombinacji. Następnie wyznaczano wartość parametru  $\Sigma$  FIC (Fractional Inhibitory Concentration). Do wyznaczenia tego parametru wykorzystano następujące równanie:  $\Sigma$  FIC = FIC A + FIC B, gdzie FIC A to MIC leku w kombinacji / MIC leku samego, a FIC B to MIC drugiego związku w kombinacji / MIC związku samego. Synergizm określano w przypadku, gdy  $\Sigma$  FIC był  $\leq 0,5$ , oddziaływania obojętne, gdy  $\Sigma$  FIC wynosił od  $> 0,5$  do  $< 2$ , a antagonizm gdy  $\Sigma$  FIC był  $\geq 2$  (Odds, 2003; Orhan, Bayram, Zer, & Balci, 2005).

#### 2.12.4. Aktywność PPN w eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych

Nocną hodowlę komórek w podłożu płynnym Sabouraud przepłukano dwukrotnie jałową wodą i ustalono gęstość optyczną  $OD_{660} = 0,1$  co odpowiada  $10^6$  komórkom na mililitr zawiesiny. Po 100  $\mu$ l tak przygotowanej zawiesiny przeniesiono do celek płytki 96-dołkowej zawierającej po 100  $\mu$ l podłoża RPMI dwukrotnie stężonego pozostawiając jedną kolumnę jako kontrolę czystości podłoża. Struktura biofilmu formowana była przez 24 h ( $37^{\circ}\text{C}$ ) po czym wszystkie celki zostały przepłukane trzykrotnie roztworem PBSu w celu usunięcia niezwiązanych komórek. Następnie celki zostały napełnione 200  $\mu$ l roztworów EEP wykonanych w podłożu RPMI w zakresie stężeń 0,04 - 1,25% (v/v). Po 24 h inkubacji ( $37^{\circ}\text{C}$ ) studzienki zostały dwukrotnie przepłukane roztworem PBSu, a następnie napełnione 90  $\mu$ l roztworu MTT (5 mg/ml w roztworze PBSu). Po 2 h inkubacji roztwór z celek usunięto, a powstały nierozpuszczalny w wodzie formazan rozpuszczono w 100  $\mu$ l izopropanolu. W analogiczny sposób wykonano kontrole samego etanolu. Absorbancję mierzono przy długości światła 490 nm za pomocą czytnika płytek Victor3 (Perkin Elmer, USA).

#### 2.12.5. Aktywność PPN w eradykacji biofilmu z powierzchni cewników silikonowych oraz PVC

Aktywność ekstraktów propolisu w eradykacji biofilmu z powierzchni cewników oznaczono na grupie 9 izolatów klinicznych (3 *C. albicans*, 3 *C. glabrata*, 3 *C. krusei*). Cewniki (Zarys, Polska) pocięte zostały w warunkach jałowych na fragmenty o długości 0,5 cm, wysterylizowane promieniowaniem UV i umieszczone w dołkach płytki 24-dołkowej. Każda studzienka została wypełniona 1 ml podłoża RPMI dwukrotnie stężonego oraz 1 ml zawiesiny komórkowej o gęstości  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Struktura biofilmu na cewnikach formowana była przez 24 h ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Następnie fragmenty płukane były roztworem PBSu i umieszczone w nowej płytce zawierającej w każdej studzience po 2 ml roztworów propolisów w zakresie stężeń 2,5-0,625% (v/v) przygotowanych w podłożu RPMI. Po 24 h fragmenty ponownie zostały opłukane roztworem PBSu i przeniesione do nowej płytki 24-dołkowej zawierającej w każdej celce 2 ml roztworu MTT (1 mg/ml w mleczanie Ringera) lub w drugim wariantcie doświadczenia do roztworu XTT (0,5 mg/ml w mleczanie Ringera z dodatkiem 1  $\mu$ l menadionu (10 mM w acetonie) na 10 ml roztworu XTT dodanym tuż przed wykonaniem doświadczenia). Czas inkubacji z wymienionymi roztworami wynosił 24 h po czym prowadzono obserwacje wizualne bądź wykonywano pomiar absorbancji przy długości światła 450 nm (dla próby z XTT).

#### 2.12.6. Wpływ produktów pochodzenia naturalnego na kinetykę wzrostu

Do oceny wpływu PPN na kinetykę wzrostu drożdży *Candida* zastosowano dwa eksperymenty; badania z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz tzw. „Time kill assay”.

Z całonocnej hodowli *C. albicans* ATCC 10321 lub *C. glabrata* DSM 11226 (16-18 h) na podłożu stałym YPD lub Sabouraud przygotowywano zawiesiny komórkowe w wodzie jałowej oraz ustawiano gęstość optyczną przy długości światła 660 nm na poziomie około 0,1. Następnie inokulum rozcieńczano 10-cio krotnie i traktowano wybranymi produktami w stężeniach odpowiadających ich wartościom MIC wyznaczonym uprzednio dla zawiesiny

o gęstości  $10^5$  CFU/ml. Zawiesiny intensywnie mieszano za pomocą wytrząsarki typu vortex i inkubowano w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  przez 0,5, 2, 4, 6, i 24 h. Po odpowiednich czasach inkubacji pobierano próby i wykonywano równolegle eksperymenty wg procedur opisanych poniżej. Jako kontrole służyły hodowle komórkowe nie poddane ekspozycji na działanie PPN.

#### 2.12.6.1. „Time kill assay”

Po 0,5, 2, 4, 6, 24 h inkubacji pobierano 1 ml zawiesiny, odwirowywano (5 000 RPM,  $25^{\circ}\text{C}$ , 3 min) i zawieszano w 1 ml roztworu PBSu. Następnie wykonywano seryjne dziesiętne rozcieńczenia, pobierano 100  $\mu\text{l}$  zawiesiny i wykonywano posiewy na podłożu stałym YPD z dodatkiem chloramfenikolu. Płytki inkubowano 24 h w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , a następnie zliczano kolonie (CFU – Colony Forming Units) i przeliczano ilość CFU na 1 ml zawiesiny wyjściowej. Dodatkowo dla najbardziej aktywnego olejku oraz dwóch EEP eksperyment wykonano również dla gatunku *C. glabrata* oraz w stężeniu odpowiadającym wartości MFC.

#### 2.12.6.2. Fluorescencyjna cytometria przepływowa

Po odpowiednim czasie inkubacji komórki płukano jak opisano powyżej, a następnie wybarwiano 10  $\mu\text{l}$  roztworu barwnika fluorescencyjnego FDA o stężeniu 5 mg/ml (rozpuszczonego w acetonie). Całość inkubowano w zaciemnionym miejscu przez 15 minut. Po tym czasie zawiesinę płukano trzykrotnie roztworem PBSu (5 000 RPM,  $25^{\circ}\text{C}$ , 3 min) i ponownie zawieszono w 1 ml roztworu PBSu. W żywych komórkach FDA rozkładany jest do fluoresceiny, której fluorescencja wzbudzana jest światłem o długości 494 nm, natomiast maksimum emisji występuje przy długości światła 521 nm. Pomiaru fluorescencji dokonywano za pomocą cytometru przepływowego Guava easyCyte (Merck).

### 2.13. **Badanie mechanizmów aktywności produktów pochodzenia naturalnego**

#### 2.13.1. *Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na ścianę komórkową*

##### 2.13.1.1. *Obserwacje z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego*

Wpływ olejków eterycznych na ścianę komórkową drożdży badano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Komórki odmładzano na podłożu stałym YPD. Następnie ustalano gęstość optyczną zawiesiny na poziomie około 0,1, co odpowiadało  $10^6$  CFU/ml. Inokulum rozcieńczano 50 krotnie i dodawano w objętości 3 ml na płytki 24-dołkowe z wyznaczonym gradientem olejków w podłożu RPMI (także w objętości 3 ml). Po czasie 1 i 2 h inkubacji w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  pobierano po 1 ml zawiesiny z celek z najwyższym stężeniem olejku, a po 24 i 48 h po 1 ml zawiesiny z celek o wartości stężenia odpowiadającej MIC i  $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$ . Komórki odwirowywano (5 000 RPM,  $25^{\circ}\text{C}$ , 3 min) i płukano roztworem PBSu. Do 100  $\mu\text{l}$  pozostałej zawiesiny dodawano 10  $\mu\text{l}$  roztworu barwnika fluorescencyjnego Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28) o stężeniu 1,1 mg/ml i dokładnie mieszano (stężenie końcowe barwnika wyniosło 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Tak przygotowaną zawiesinę komórek z barwnikiem inkubowano w temp. pokojowej. Po upływie 15 min dodawano 890  $\mu\text{l}$  wody destylowanej i zawiesinę odwirowano (5 000 RPM,  $25^{\circ}\text{C}$ , 3 min). Płukanie roztworem PBSu powtarzano trzykrotnie.

Preparaty mikroskopowe przygotowywano przez nanoszenie 40  $\mu$ l zawiesiny na adhezyjne szkiełka mikroskopowe. Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, przy zastosowaniu obiektywu 100  $\times$  z dodatkiem olejku immersyjnego, przy długości światła wzbudzenia  $\lambda = 365$  nm.

#### 2.13.1.2. *Próba z zastosowaniem sorbitolu, czynnika stabilizującego ciśnienie*

Gradient olejku bądź EEP przygotowano w sposób analogiczny jak w pkt. 2.12.1 (Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost) z tą różnicą, że podłoże RPMI zawierało dodatkowo w składzie sorbitol, którego stężenie końcowe na płytce wynosiło 0,8 M (bądź nie zawierało w kontroli). Płytki inkubowano od 24 do 48 h w temperaturze 37°C. Następnie oznaczano także parametr MFC wykonując „odciski” z zastosowaniem metalowego nakłuwacza na podłożach YPD pozbawionych czynnika hamującego wzrost. Płytki inkubowano 24 h w 37°C.

#### 2.13.2. *Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na błonę komórkową*

##### 2.13.2.1. *Próba wiązania ergosterolu*

W pierwszym etapie przygotowano podłoże RPMI 1640 z dodatkiem ergosterolu. Bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia ergosterol rozpuszczono w DMSO (jego stężenie końcowe nie przekraczało 10%) z dodatkiem Tween 80 (maksymalne stężenie końcowe 1%) i przefiltrowano przez filtr o średnicy porów 0,2  $\mu$ m bezpośrednio do podłoża RPMI przygotowanego z proporcjonalnie obniżoną zawartością wody. Końcowe stężenie ergosterolu w podłożu wynosiło 100  $\mu$ g/ml. Gradient EEP był przygotowany w podłożu suplementowanym bądź nie ergosterolem w zakresie stężeń 5 – 0,01%, natomiast olejków eterycznych w zakresie 2,5%-0,005% (v/v). Jako kontrolę dodatnią zastosowano amfoterycynę B, o której wiadomo, że oddziałuje na sterole obecne w błonie komórkowej. Płytki inokulowano zawiesiną komórkową, tak aby uzyskać 10<sup>4</sup> CFU/ml po czym inkubowano 24 – 48 h w temperaturze 37°C. Następnie wyznaczano wartość MFC.

##### 2.13.2.2. *Pomiar depolaryzacji błony komórkowej*

Komórki szczepu *C. albicans* SC5314 odświeżono na podłożu stałym YPD przez 24 h w temperaturze 30°C. Kolejnego dnia zaszczepiono hodowlę płynną w podłożu LowFlow Medium. Hodowlę prowadzono przez noc (240 RPM, 30°C) po czym ustalono OD<sub>600</sub> na poziomie 0,5 – 1. Zawiesinę komórek wytrząsano (240 RPM, 30°C) przez trzy godziny i dodawano EEP w stężeniach 10  $\times$  MFC, 1  $\times$  MFC oraz ½  $\times$  MFC. Jednocześnie przygotowano kontrole samych komórek bez dodatku EEP, samego medium, oraz medium z dodatkiem EEP w analogicznych stężeniach. Hodowlę prowadzono przez 1 h. Następnie komórki odwirowano (3 000 RPM, 5 min), przepłukano jeden raz jałową wodą i ustalono OD<sub>600</sub>=3,0. Bezpośrednio przed wykonaniem pomiarów fluorescencji przygotowano roztwór barwnika fluorescencyjnego DiBAC<sub>4</sub> w 100% etanolu o stężeniu 1 mg/ml (Stock) oraz jego 50-krotne rozcieńczenie w wodzie Milli-Q (20  $\mu$ g/ml, roztwór roboczy). Próby przygotowano przez dodanie 20  $\mu$ l

zawiesiny komórkowej bądź kontroli do 1000  $\mu$ l wody Milli-Q. Następnie sprawdzano czy szybkość przepływu przez dyszę cytometru jest optymalna (200 – 300 zdarzeń na sekundę) po czym 460  $\mu$ l tak przygotowanej próby przenoszono do kolejnej probówki i dodawano 40  $\mu$ l roztworu roboczego barwnika. Barwienie prowadzono przez 15 min w ciemności. Pomiar fluorescencji prowadzono z zastosowaniem cytometru FACScan (Becton Dickinson, USA). Długość fali wzbudzenia wynosiła 490 nm a emisji  $530 \pm 15$  nm.

#### 2.13.2.3. Pomiar wypływu jonów potasu

Szczep referencyjny *C. albicans* ATCC 10231 hodowano przez noc w podłożu Sabouraud (150 RPM, 30°C). Zawiesinę komórek odwirowano, osad przemyto dwukrotnie wodą Milli-Q. Ustalono  $OD_{660}=1,0$  w wodzie Milli-Q. Komórki traktowano EO lub EEP w stężeniach odpowiadających 1  $\times$  MIC, 2  $\times$  MIC i 4  $\times$  MIC (1  $\times$  MIC dla olejów wynosiły kolejno: tymiankowy 0,625%, cytrynowy 0,625%, geraniowy 1,25%, cynamonowy 0,016%, bazyliowy 0,31%, goździkowy 1,25%, EEP 8 0,625%). Jednocześnie przygotowywano kontrole EO/EEP w tych samych stężeniach lecz bez dodatku komórek. Zawiesiny intensywnie wytrząsano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Próby odwirowano (3 000 RPM, 5 minut), a supernatant przeniesiono do nowych probówek. Stężenie jonu potasu zmierzono za pomocą detektora płomieniowego BWB-1 (BWB Technologies LTD, United Kingdom).

#### 2.13.3. Badanie wpływu EEP na morfogenezę

Komórki *C. albicans* SC5314 hodowano w podłożu płynnym Sabouraud przez noc, po czym hodowle odwirowano (150 RPM, 30°C). Uzyskany osad przepłukano dwukrotnie jałową wodą po czym ustalono gęstość komórkową na poziomie  $10^6$  komórek na ml w podłożu płynnym Lee, które indukuje powstawanie formy mycelialnej. Następnie do hodowli dodano roztwory EEP w stężeniach 1  $\times$  MIC lub  $\frac{1}{2}$   $\times$  MIC i prowadzono hodowlę przez odpowiednio 2 i 24 h (150 RPM, 30°C). Równolegle przygotowano kontrole niepoddane ekspozycji na środki alternatywne. Po odpowiednim czasie zawartość form drożdżowych, pseudmycelialnych oraz mycelialnych zliczano pod mikroskopem świetlnym stosując do tego komorę Thoma.

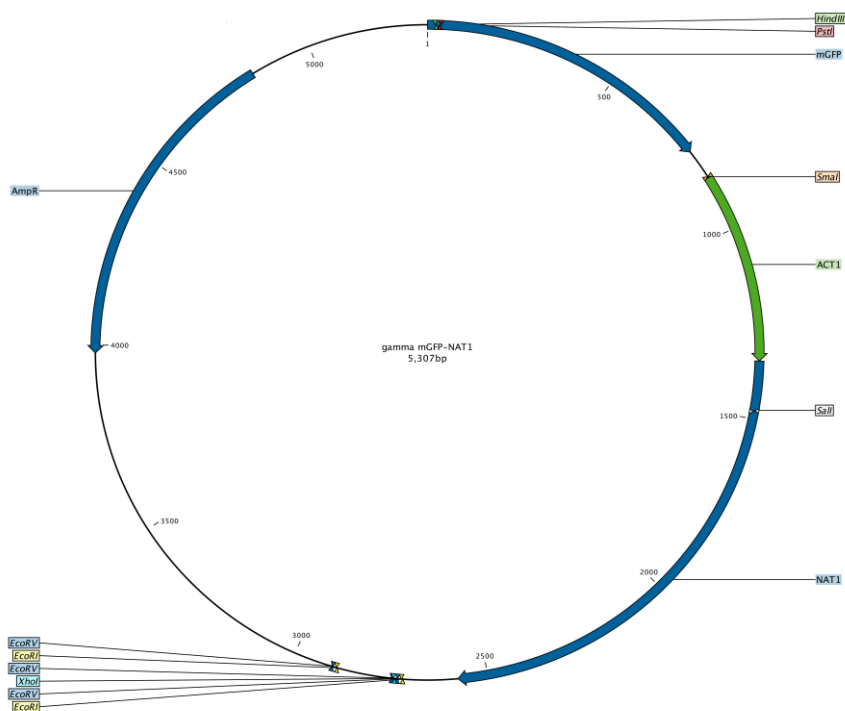
Dodatkowo przeprowadzono eksperyment na podłożu limitującym Spider agar, które również indukuje powstawanie strzępek. W skład podłoża wchodziły bulion odżywczy 1% (w/v), mannitol 1% (w/v),  $K_2HPO_4$  0,2% (w/v) i agar 1,35% (kontrola), a w próbach badanych dodatkowo EEP w stężeniach  $\frac{1}{2}$  lub  $\frac{1}{4}$   $\times$  MIC. Na płytce nakrapiano po 5  $\mu$ l zawiesiny o gęstości  $10^6$  komórek/ml oraz 100-krotne rozcieńczenia. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 7 dni. Obecność grzybni stwierdzano oraz fotografowano za pomocą mikroskopu optycznego oraz kamery cyfrowej.

#### 2.13.4. Wpływ ekstraktów etanolowych propolisów na pompy typu ABC

##### 2.13.4.1. Obserwacje z zastosowaniem szczepów znakowanych GFP

##### 2.13.4.1.1. Transformacja komórek *C. albicans*

Transformację komórek *C. albicans* plazmidem gamma mGFP-NAT1 przeprowadzono w celu uzyskania szczepu zdolnego do produkcji białek fuzyjnych - połączeń pomp Cdr1p/Cdr2p z białkiem GFP. Jest to białko, które po wzbudzeniu światłem monochromatycznym o długości 488 nm wykazuje zieloną fluorescencję (maksimum emisji przy długości 515 nm). Natężenie emitowanego światła jest wprost proporcjonalne do ilości kompleksów Cdr1p-GFP lub Cdr2p-GFP obecnych w błonie komórkowej drożdżaków. Transformację przeprowadzono z zastosowaniem starterów przedstawionych w tabeli 2.11, plazmidu mGFP-NAT1 przedstawionego na rysunku 2.1 oraz szczepu *C. albicans* SC 5314.



Rys. 2. 1. Schemat plazmidu gamma mGFP-NAT1

**Tabela 2. 11.** Sekwencje nukleotydowe starterów stosowanych do transformacji i diagnostyki

Oznaczenie	Gen	Start	Stop	Sekwencja 5'-3'
B6660	<i>CDR2</i>	4405	4497	GTTGCTTTTATTGGTATCAATATCATTCTTACTATTTTCTTTTACTGGT TGGCTAGAGTTCCAAAAGTAATAGAGAAAAGAAGATGAAAAA <b>GGT</b> <b>GCTGGCCAGGTGCT</b>
B6661	<i>CDR2</i>	4730	4643	GGTGCTACCAATGTCCCACACAAAAGACAAGCGTACAAATTCTTCCA TACTTGAATCGACTACTACTACAACAACCAATACAGATCAC <b>TCTGATA</b> <b>TCATCGATGAATTCGAG</b>
B6587 Diagnostic primer	<i>CDR2</i>			GCACCTAGAGAATTGGT
A9776 Diagnostic primer	<i>GFP</i>			TTCCAATTTGTGACC

Parę starterów oznaczonych jak B6660 oraz B6661 w tabeli 2.11 zastosowano w reakcji PCR, w której amplifikowano gen *GFP* zawarty w plazmidzie gamma mGFP-NAT1. W reakcji tej zastosowano polimerazę DNA Q5, która posiada aktywność korygującą, charakteryzuje się wysoką wydajnością reakcji, a uzyskany produkt wiernością sekwencji. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w tabeli 2.12 natomiast profil czasowo-temperaturowy w tabeli 2.13.

**Tabela 2. 12.** Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji genu *GFP* wraz z genem oporności na nourseotycynę zawartych na plazmidzie gamma mGFP-NAT1

Składnik	Objętość [μl]
Bufor 5 × stężony	10
Mieszanina dNTPów	5
DNA plazmidowe	1
Starter Forward 12,5 μM	2
Starter Reverse 12,5 μM	2
Woda Milli-Q	30
Polimeraza Q5	0,5
Objętość	50

**Tabela 2. 13.** Profil czasowo-temperaturowy reakcji amplifikacji genu *GFP* wraz z genem oporności na nourseotycynę z plazmidu gamma mGFP-NAT1

Nr kroku	Temperatura [°C]	Czas [s]	Powrót do kroku	Liczba cykli
1	92	120		1
2	92	30		5
3	42	20		5
4	72	180	2	5
5	92	30		5
6	46	20		5
7	72	180	5	5
8	92	30		20
9	50	20		20
10	72	180	8	20
11	72	10		1
12	10	&		1



Obecność produktu o długości 2700 pz w mieszaninie poreakcyjnej potwierdzono wykonując elektroforezę żelową w 1% żelu agarozowym z dodatkiem 4 µl barwnika Sybr Safe. Następnie wykonano transformację komórek *C. albicans* SC5314 stosując metodę z roztworem octanu litu. W tym celu 0,5 ml nocnej hodowli *C. albicans* w podłożu płynnym YPD (30°C, 240 RPM), przeniesiono do 50 ml świeżej pożywki YPD uzyskując OD<sub>600</sub> około 0,3. Komórki wytrząsano przez kolejne 4 h w temperaturze 30°C do uzyskania OD<sub>600</sub> w przedziale 0,6 – 1,2 w celu doprowadzenia ich do logarytmicznej fazy wzrostu. Następnie hodowlę odwirowano (3 000 RPM, 5 min), a osad zawieszono w 1 ml roztworu LiAc/TE (100 µl LiAc 1M, 100 µl 10 × TE, 800 µl wody Milli-Q). 100 µl tak sporządzonej zawiesiny przeniesiono do próbki zawierającej 80 µl produktu reakcji PCR. Kontrolę przygotowano bez dodatku produktu amplifikacji. Następnie do prób dodano po 15 µl (10 mg/ml) ssDNA (single stranded salmon sperm DNA, Sigma) wygotowanego uprzednio przez 5 min (95-99°C). Jednoniciowe DNA pozyskane z łososia nie bierze bezpośrednio udziału w samej rekombinacji. Najprawdopodobniej jego funkcja polega na wiązaniu się do składników ściany komórkowej, które wiążą obce DNA, zwiększając w ten sposób wydajność przedostawania się do wnętrza komórki plazmidowego DNA. Zawiesinę z ssDNA inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min, po czym dodano 0,7 ml roztworu PEG/LiAc/TE (800 µl 50%-PEG, 100 µl LiAc 1 M, 100 µl 10 × TE). Mieszaninę inkubowano przez noc (30°C, 300 RPM). Następnego dnia komórki poddano szokowi cieplnemu (44°C, 15 min), odwirowano (7 500 RPM, 0,5 min). Osad zawieszono w 1 ml YPD i inkubowano 3 h (300 RPM, 30°C). Ponownie odwirowano, odrzucono większą część supernatantu i wykonano posiew na podłożu YPD z dodatkiem nourseotrycyny (200 µg/ml). Po 24 - 48 h wzrostu (30°C) kolonie ponownie przesiano na podłoże z dodatkiem nourseotrycyny.

Po 24 h wzrostu z drożdży izolowano DNA metodą chloroformową. W odkręcanych 2 ml próbkach zawieszono biomasę drożdży w 200 µl wody. Dodano kuleczki szklane i 200 µl odczynnika PCI. Próby wytrząsano w urządzeniu FastPrep (homogenizator). Odwirowano (14 000 RPM, 10 min, 4°C). 100 µl supernatantu przeniesiono do próbek typu eppendorf zawierających 500 µl 100% etanolu. Następnie próby umieszczono na 1 h w temperaturze -20°C po czym ponownie odwirowano (14 000 RPM, 10 min, 4°C). Usunięto etanol a osad DNA zawieszono w 300 µl 70%-etanolu. Ponownie odwirowano (14 000 RPM, 5 min, 4°C). Dokładnie usunięto alkohol, a osad suszono przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po całkowitym wyschnięciu osad zawieszono w 50 µl wody wolnej od nukleaz.

W celu potwierdzenia poprawnej insercji amplifikowanego fragmentu w genomie *C. albicans* wykonano kolejną reakcję PCR. Starter diagnostyczny forward (oznaczenie B6587 w tabeli 2.11) jest komplementarny do fragmentu w genie *CDR2*, a reverse w genie kodującym białko GFP (oznaczenie A9776). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w tabeli 2.14, a profil czasowo-temperaturowy w tabeli 2.15.

**Tabela 2. 14.** Skład mieszaniny reakcyjnej do diagnostyki poprawności insercji genu *GFP* w genie *CDR2*

Składnik	Objętość [ $\mu$ l]
Bufor reakcyjny Ex taq 10 x stężony	2
Mieszanina dNTPów	2
Starter diagnostyczny forward 10 $\mu$ M	1
Starter diagnostyczny reverse 10 $\mu$ M	1
Woda wolna od nukleaz	11,8
Polimeraza Ex taq	0,2

**Tabela 2. 15.** Profil temperaturowo-czasowy diagnostycznej reakcji PCR

Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Czas [s]	Liczba powtórzeń
94	240	1
94	30	30
55	45	
68	50	
68	300	1
10	-	1

#### 2.13.4.1.2. Obserwacje z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego

Szczepy *C. albicans* SC. 5314 zawierające białka fuzyjne GFP-Cdr1p i GFP-Cdr2p oraz szczep kontrolny *C. albicans* SC5314 (konserwy sporządzone w Stock medium,  $-80^{\circ}$ C) wysiano na płytce z podłożem YPD i inkubowano 24 h w temperaturze  $30^{\circ}$ C. Kolejnego dnia wykonano zawiesiny szczepów w podłożu LowFlow i inkubowano przez noc ( $30^{\circ}$ C, 240 RPM). Następnego dnia rano odświeżono hodowle w nowej porcji LowFlow Medium uzyskując  $OD_{600}=0,2$ . Wykonano próby z dodatkiem ekstraktów propolisów EEP 1, EEP 4, EEP 18 a i EEP 24 w stężeniach 0,08% (v/v) dla wszystkich trzech szczepów, a także próby nietraktowane związkami naturalnymi. Hodowle prowadzono przez 4 – 5 h do uzyskania logarytmicznej fazy wzrostu ( $30^{\circ}$ C, 240 RPM). Po 1 ml hodowli przeniesiono do probówek 1,5 ml, odwirowano (10 000 RPM, 1 min). Usunięto 980  $\mu$ l supernatantu, a osad zawieszono w pozostałej objętości. 5  $\mu$ l zawiesiny nanoszono na szkiełko mikroskopowe, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym. Obserwacje prowadzono z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Olympus IX81 stosując obiektyw olejowy 60  $\times$ . Długość fali wzbudzenia wynosiła 488 nm, natomiast emisji 510 nm.

#### 2.13.4.2. Analiza ekspresji genów kodujących pompy typu ABC

##### 2.13.4.2.1. Przygotowanie komórek

Z nocnej hodowli komórek w podłożu płynnym RPMI 1640 wykonano zawiesiny o  $OD_{600}$  około 0,2 w objętości 50 ml (także RPMI). Następnie dodawano badane związki: ekstrakty etanolowe propolisów pszczelich w stężeniach równych  $\frac{1}{2} \times$  MIC, flukonazol, EEP wraz z flukonazolem. Wykonano także próby kontrolne traktowane samym etanolem oraz próby nietraktowane żadnym związkiem. Tak przygotowane zawiesiny wytrząsano przez 8 h ( $30^{\circ}$ C, 240 RPM) do uzyskania logarytmicznej fazy wzrostu ( $OD_{600}$  1-2, pożywka podczas inkubacji zmienia częściowo kolor w wyniku zmiany środowiska na bardziej kwasowe, dlatego ciężko

jednoznacznie ocenić OD) oraz stosunkowo dużej ilości biomasy do izolacji RNA. Komórki odwirowano (3 000 RPM, 5 min, 4<sup>0</sup>C). Następnie usunięto supernatant, a osad przepłukano 1 ml lodowatej wody Milli-Q. Całość przeniesiono do zakręcanych probówek 2 ml i ponownie odwirowano (14 000 RPM, 2 min, 4<sup>0</sup>C). Usunięto supernatant. Probówki z osadem zanurzone na 10 sekund w termosie z ciekłym azotem w celu natychmiastowego zatrzymania metabolizmu i przechowywano do izolacji RNA w temperaturze -80<sup>0</sup>C.

#### 2.13.4.2.2. *Izolacja RNA*

Kolejnego dnia do probówek dodano (pod wyciągiem) w temperaturze pokojowej 1 ml odczynnika TRIzol i rozpipetowano osad. Do probówek dodano kuleczki szklane (jedną objętość probówki PCR) i odczekano 3 minuty. Probówki wytrząsano 30 sekund z zastosowaniem urządzenia FastPrep. Następnie probówki odwirowano (14 000 PRM, 10 min, 4<sup>0</sup>C) i umieszczono w lodzie. Supernatant przeniesiono do nowych probówek odkręcanych, dodano 360 µl chloroformu i wytrząsano 15 sekund za pomocą urządzenia typu Vortex. Probówki pozostawiono w temperaturze pokojowej na 5 minut po czym ponownie odwirowano (14 000 PRM, 5 min, 4<sup>0</sup>C). Supernatant przeniesiono do nowych probówek typu eppendorf i dodano 350 µl izopropanolu. Próby wytrząsano 15 sekund i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut. Probówki odwirowano (14 000 PRM, 10 min, 4<sup>0</sup>C) i umieszczono w lodzie. Supernatant usunięto a osad przemyto 1 ml zimnego 70% etanolu. Całość wytrząsano 15 sekund i odwirowano (14 000 PRM, 10 min, 4<sup>0</sup>C). Usunięto dokładnie całość supernatantu, a osad suszono przez godzinę w temperaturze pokojowej pod wyciągiem. Na koniec osad zawieszono w 20 µl wody wolnej od nukleaz. W celu lepszego rozpuszczenia RNA całość inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65<sup>0</sup>C. Stężenie RNA zmierzono za pomocą urządzenia NanoDrop. Kontrolowano także stosunek absorbancji przy długość światła 260 nm do 230 nm. W większości przypadków mieścił się on w zakresie 1,8 – 2,0 (czyli optymalnym), lecz w kilku przypadkach stosunek wynosił 1,0-1,8 co świadczy o pozostałości w próbie izotiocyanianu guanidyny zawartego w odczynniku TRIzol. Niemniej jednak te próby uwzględniono także w dalszych procesach, ponieważ wg naukowców z firmy Qiagen obecność izotiocyanianu guanidyny w stężeniu do 100 mM w próbie RNA nie pogarsza wiarygodności reakcji real time PCR nawet, gdy stosuje się odczynniki wrażliwe na inhibitory (Von Ahlfen & Schlumpberger, 2010).

#### 2.13.4.2.3. *Usuwanie DNA*

Stężenie uzyskanego w poprzednim punkcie RNA powinno być wysokie (optymalnie powyżej 1000 µg/ml), aby stosunek stężenia ewentualnych zanieczyszczeń pozostałych po izolacji RNA (izotiocyanianu zawartego w odczynniku TRIzol) do stężenia RNA był możliwie niski. RNA rozcieńczono wodą wolną od nukleaz tak, aby w objętości 7,65 µl zawarty był 1 µg RNA. Przygotowano mieszaninę buforu do DNazy oraz enzymu DNazy (0,9 µl i 0,45 µl odpowiednio, zestaw do odwrotnej transkrypcji Bio Rad, USA) i dodawano po 1,35 µl do 7,65 µl

RNA. Całość inkubowano najpierw przez 20 minut w temperaturze 37<sup>0</sup>C a potem 10 minut w 65<sup>0</sup>C. RNA przechowywano w temperaturze -80<sup>0</sup>C do dalszych analiz.

#### 2.13.4.2.4. Odwrotna transkrypcja

Reakcję prowadzono z zastosowaniem odczynników z zestawu iScript cDNA Synthesis Kit (Bio Rad, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w Tabela 2. 16.

**Tabela 2. 16.** Skład mieszaniny w reakcji odwrotnej transkrypcji

Składnik	Objętość [μl]
5 × iScript reaction mix	4
Odwrotna transkryptaza iScript	1
Woda wolna od nukleaz	6
RNA po oczyszczeniu DNazą (1 μg)	9
Całkowita objętość	20

Całość inkubowano kolejno 5 minut w temperaturze 25<sup>0</sup>C, 30 minut w 42<sup>0</sup>C, 5 minut w 85<sup>0</sup>C, a następnie schłodzono w lodzie. Stężeni uzyskanego w ten sposób cDNA wynosiło około 50 ng/μl. cDNA przechowywano w -20<sup>0</sup>C do dalszych analiz.

#### 2.13.4.2.5. Reakcja qPCR

W pierwszym etapie wykonano krzywe standardowe wszystkich testowanych starterów, aby określić wydajności reakcji. Kolejne punkty krzywej obrazowały wynik uzyskany przy zastosowaniu 50 ng, 10 ng, 2 ng, 0,4 ng oraz 0,08 ng cDNA na reakcję. Gdy określono, że wydajność reakcji jest bliska 100% matrycę cDNA (50 ng/μl) rozcieńczono 125 razy w wodzie wolnej od nukleaz uzyskując stężenie 0,4 ng/μl (rozcieńczenie pozwala także znacząco obniżyć stężenie ewentualnych inhibitorów reakcji). Do reakcji qPCR stosowano 5 μl matrycy o stężeniu 0,4 ng/μl (stosowanie mniejszych objętości mogłoby zwiększyć błąd wynikający z niedokładności pipet). Przygotowano mieszaninę starterów forward i reverse (stężenie początkowe 100 μM) poprzez zmieszanie 10 μl każdego i 80 μl wody (stężenie końcowe starterów wynosiło 10 μM). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w Tabela 2. 17, natomiast profil temperaturowo-czasowy w Tabela 2. 18. W celu sprawdzenia czy w mieszaninie poreakcyjnej znajduje się tylko jeden produkt wykonywano krzywe topnienia. Analizę stabilności starterów genów referencyjnych oraz wyników ekspresji wykonywano w programie qbase+.

**Tabela 2. 17.** Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach qPCR zarówno do określania wydajności jak i analizy ekspresji genów

Składnik	Objętość [μl]
bufor Go Taq QPCR (Promega)	10
barwnik CXR	0,2
Mieszanina starterów	0,8
Woda wolna od nukleaz	4
cDNA	5
Całkowita objętość	20

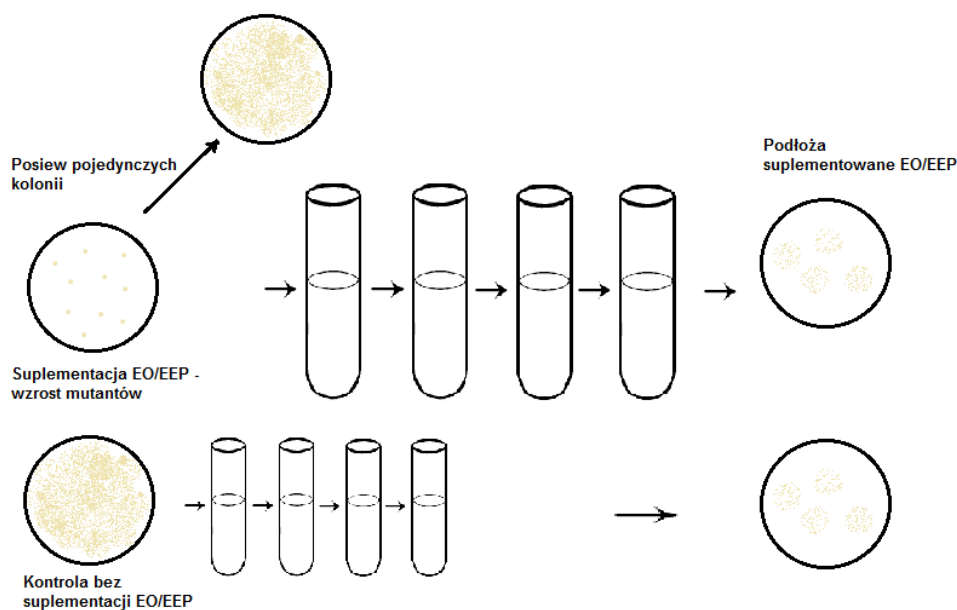
**Tabela 2. 18.** Profil temperaturowo-czasowy reakcji qPCR

Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość powtórzeń
95	120	1
95	3	40
60	30	
Krzywa topnienia [°C]		
95	15 s	
od 60 do 95	2°C/min	

#### 2.14. Wpływ związków pochodzenia naturalnego na nabywanie oporności

W celu ustalenia maksymalnego stężenia pozwalającego na wzrost szczepów drożdży w postaci nielicznych kolonii (od kilku do maksymalnie kilkuset) do niezestalonego podłoża YPD dodawano EEP bądź EO w stężeniach 2 - 4 × MIC. Podłoża intensywnie mieszano i wlewano na płytki. Ze względu na postać fizykochemiczną olejków ważne było, aby podłoże nie było zbyt gorące, co mogło powodować ulatnianie związków lotnych oraz bardzo intensywne wytrząsanie, aby doprowadzić do jak najdokładniejszej dyspersji oleju w wodzie, krótko przed zastygnięciem podłoża. Jeżeli po maksymalnie 48 h na płytkach nie obserwowano wzrostu, stężenie obniżano dwukrotnie, aż do uzyskania pożądanego efektu.

Szczepy *C. albicans* SC5314 odświeżono na podłożu stałym YPD przez noc (30°C). Następnie wykonano zawiesiny w wodzie jałowej o gęstości optycznej  $OD_{600}=0,1$ . 100 µl przesiewano na podłoża suplementowane olejkami eterycznymi bądź ekstraktami etanolowymi propolisów w najwyższym stężeniu umożliwiającym wzrost. Tak samo sporządzono kontrole na podłożu YPD niesuplementowanym EO/EEP. Płytki inkubowano 48 h (30°C). Z uzyskanych kolonii wykonywano zawiesiny w wodzie jałowej ( $OD_{600}=0,1$ ), które następnie posiewano na podłożach suplementowanych EO/EEP w stężeniu takim samym jak na płytce wyjściowej. Równolegle komórki pasażowano czterokrotnie w podłożu płynnym YPD bez suplementacji przenosząco codziennie po 50 µl zawiesiny do 5 ml czystej pożywki ( $OD_{600}$  około 0,3). Hodowle inkubowano z wytrząsaniem (240 RPM, 30°C), po czym ponownie ustalano  $OD_{600}=0,1$  i 100 µl posiewano na podłoża suplementowane EO/EEP. Płytki inkubowano 48 h w temperaturze 30°C, po czym porównywano wzrost mutantów do szczepów nie poddawanych uprzednio ekspozycji na działanie związków alternatywnych (Rys. 2. 2).



**Rys. 2. 2.** Schemat przedstawiający eksperyment dotyczący określenia wpływu związków pochodzenia naturalnego na nabywanie oporności

Eksperymenty przedstawione w punktach 2.13.2.2, 2.13.4 oraz 2.14 zostały wykonane podczas pobytu na dwumiesięcznym, zagranicznym stażu naukowym w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej, Flamandzki Instytut Biotechnologii, Wydział Nauki na Uniwersytecie Katolickim w Leuven w Belgii.

## **2.15. Ocena składu chemicznego produktów pochodzenia naturalnego**

### **2.15.1. Ocena składu chemicznego propolisów**

Ocenę składu chemicznego wybranych ekstraktów propolisów wykonano przy współpracy z dr inż. Barbarą Kusznerewicz z Katedry Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności. Separacji składników mieszaniny dokonano za pomocą chromatografu cieczowego, a do detekcji związków zastosowano detektor UV oraz masowy. Identyfikację prowadzono przez porównywanie kształtów widm UV oraz mas charakterystycznych jonów molekularnych do widm związków zgromadzonych w prywatnych bibliotekach widm Katedry.

### **2.15.2. Ocena składu chemicznego olejków eterycznych**

Olejki eteryczne są złożoną mieszaniną lotnych związków, co pozwala na zastosowanie chromatografii gazowej do oceny ich składu. Analiza składu chemicznego wybranych olejków eterycznych została wykonana przez dr inż. Tomasza Dymerskiego w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej z zastosowaniem kompleksowej dwuwymiarowej chromatografii GC×GC MS, która pozwala na dokładny rozdział składników mieszaniny nieosiągalny w konwencjonalnej chromatografii gazowej. Do zastosowano sprzęt firmy Agilent 7890.

### 3. WYNIKI

#### 3.1. Analiza wrażliwości i lekooporności szczepów klinicznych drożdżaków z rodzaju *Candida* izolowanych od pacjentów

W trakcie realizacji badań zgromadzono dużą kolekcję szczepów z rodzaju *Candida* (przede wszystkim *C. albicans* i *C. glabrata*, w mniejszym stopniu *C. krusei*) izolowanych od pacjentów z czterech polskich szpitali. Kolekcja ta stanowiła podstawę do oceny skuteczności najpowszechniejszych leków przeciwgrzybowych. W późniejszych badaniach ta sama kolekcja posłużyła do oceny stopnia wrażliwości izolatów na PPN. Wybrane izolaty odporne krzyżowo na azole zostały również zastosowane do testowania aktywności PPN w synergizmie bądź wobec biofilmu.

##### 3.1.1 Ocena podatności na działanie leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybiczych

Do oceny stopnia wrażliwości izolatów *C. albicans* oraz *C. glabrata* na dziewięć chemoterapeutyków przeciwgrzybiczych użyto komercyjnie dostępnych testów SYO. Instrukcja przedstawionego testu zawiera tzw. kliniczne wartości graniczne CBP (*ang. Clinical Interpretive Breakpoints*), czyli stężenia, przy których szczepy klasyfikuje się jako wrażliwe (S), wrażliwe zależnie od dawki (S-DD), średniowrażliwe (I) oraz odporne (R). Wartości stężeń granicznych zaproponowane w teście nie są zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi, które reguluje dokument M27-A3 „Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition” zaproponowany przez CLSI. Do analizy wyników zastosowano w tej sytuacji wartości CBP zaproponowane w powyższych zaleceniach (Tabela 3.1). Dodatkowo w dokumencie M27-A3 w stosunku do niektórych leków nie zaproponowano wartości CBP, a jedynie ECV (*ang. epidemiological cutoff values*), które można uznać za najbardziej czułą miarę pojawienia się szczepów o obniżonej wrażliwości na dany lek. ECV jest zatem wartością progową MIC, która pozwala na rozróżnienie na szczepy typu dzikiego (WT, *ang. wild type*) (bez mutacyjnych lub nabytych mechanizmów oporności) oraz inne niż WT (*ang. non-wild type*, posiadające mutacyjne lub nabyte mechanizmy oporności) (Tabela 3. 1) (CLSI, 2012; Pfaller & Diekema, 2012). W teście SYO nie jest natomiast sprecyzowane czy wyznaczana jest wartość MIC<sub>90</sub>, MIC<sub>80</sub>, MIC<sub>50</sub>. Wynik odczytuje się na podstawie zmiany zabarwienia w studziencie (kolor różowy oznacza wzrost, niebieski brak wzrostu), a wartość MIC odczytuje się jako stężenie w pierwszej studziencie zawierającej roztwór niebieskiego koloru. W przypadku leków innych niż azole jest to zawsze ostra, jednoznaczna granica, najbardziej obrazująca MIC<sub>90</sub>, natomiast w przypadku leków z grupy azoli, dla gatunku *C. albicans* obserwuje się stopniową zmianę zabarwienia z różowego na niebieskie przez kilka kolejnych studzienek (czasami przez cały zakres stężeń, co wskazuje na istnienie wzrostu resztkowego), przez co precyzja oznaczenia jest zdecydowanie obniżona. W celu wyeliminowania ryzyka błędnego klasyfikowania szczepów jako odporne, ocenę wrażliwości izolatów *C. albicans* na flukonazol przeprowadzono z wykorzystaniem metody „klasycznej” zalecanej przez CLSI. Zgodnie z zaleceniami CLSI oporność określano w oparciu o wartość parametru MIC<sub>50</sub>. Stosowanie wartości MIC<sub>90</sub> do oceny wrażliwości na azole nie jest zalecane, ze względu na wzrost resztkowy *C. albicans*, co skutkowałoby to uzyskiwaniem fałszywie wysokich wartości



stężeń i błędnym klasyfikowaniem szczepów jako oporne. Metodę CLSI zastosowano jedynie do oceny wrażliwości na flukonazol szczepów *C. albicans*, które wg testu SYO zostały wstępnie zaklasyfikowane jako oporne.

**Tabela 3. 1.** Wartości stężeń CBP oraz ECV testowania lekowrażliwości *Candida* spp. w warunkach *in vitro*

Gatunek	Lek przeciwgrzybiczy	ECV (µg/ml)		CBP (µg/ml)			
		WT	non-WT	S	SDD	I	R
<i>C. albicans</i>	Amfoterycyna B	≤ 2	> 2				
	Flucytozyna	≤ 0,5	> 0,5				
	Flukonazol	≤ 0,5	> 0,5	≤ 2	4		≥ 8
	Itrakonazol	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,12	0,25–0,5		≥ 1
	Posakonazol	≤ 0,06	> 0,06				
	Worykonazol	≤ 0,03	> 0,03	≤ 0,12		0,25–0,5	≥ 1
	Anidulafungina	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,25		0,5	≥ 1
	Kaspofungina	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,25		0,5	≥ 1
	Mikafungina	≤ 0,03	> 0,03	≤ 0,25		0,5	≥ 1
<i>C. glabrata</i>	Amfoterycyna B	≤ 2	> 2				
	Flucytozyna	≤ 0,5	> 0,5				
	Flukonazol	≤ 32	> 32		≤32		≥ 64
	Itrakonazol	≤ 2	> 2				
	Posakonazol	≤ 2	> 2				
	Worykonazol	≤ 0,5	> 0,5				
	Anidulafungina	≤ 0,25	> 0,25	≤ 0,12		0,25	≥ 0,5
	Kaspofungina	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,12		0,25	≥ 0,5
	Mikafungina	≤ 0,03	> 0,03	≤ 0,06		0,12	≥ 0,25

Ocenie wrażliwości na leki testem SYO poddane zostały 43 izolaty kliniczne *C. albicans* od pacjentów ze Szpitala „Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie oraz 104 izolaty *C. albicans* od pacjentów ze Szpitala Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. W grupie izolatów z Warszawy oporność na flukonazol (FI) stwierdzono w przypadku 29 izolatów (67,4%), z czego w 20 przypadkach wartość MIC była ≥ 256 µg/ml, a w grupie z Wrocławia oporność występowała w 19 (18,3%) przypadkach. Dodatkowo 19 izolatów z Warszawy wykazywało jednocześnie tzw. oporność krzyżową na wszystkie pozostałe testowane azole (posakonazol (Pz), worykonazol (Vor) i itraconazol (Iz)), a w przypadku izolatów z Wrocławia występowała ona w 16 (15,4%) szczepach. Wśród szczepów z Warszawy, 2 oznaczone zostały jako non-WT w stosunku do posakonazolu (jednocześnie wrażliwe na pozostałe azole), 6 izolatów zaklasyfikowano jako non-WT i oporne odpowiednio na posakonazol i itraconazol, 3 szczepy zaklasyfikowano jak S-DD w stosunku do worykonazolu, 6 jako S-DD do itraconazolu, natomiast 6 izolatów było wrażliwych na wszystkie testowane azole. W grupie izolatów z Wrocławia, 24 zaklasyfikowano jako non-WT w stosunku do posakonazolu, 23 oporne na itraconazol, 16 opornych na worykonazol. W trzech przypadkach, izolaty zostały zaklasyfikowane wyłącznie jako non-WT i oporne na posakonazol i itraconazol (z jednoczesną wrażliwością na inne azole), w dwóch przypadkach zaklasyfikowane jako non-WT i oporne na



posakonazol i flukonazol. Dwa szczepy oznaczone zostały jako non-WT w stosunku do posakonazolu oraz wrażliwe na pozostałe azole. Do grupy S-DD na itraconazol i flukonazol zakwalifikowano po jednym szczepie. W 79 przypadkach izolaty wrażliwe były na wszystkie azole. Dodatkowo, przebadana została wrażliwość w stosunku do trzech leków z grupy echinokandyn; anidulafunginę (And), kaspofunginy (Cas) i mikafunginy (Mf) oraz 5-fluorocytozyny (5-Fc) i amfoterycyny B (AmB). Wszystkie szczepy z Warszawy i Wrocławia zaklasyfikowane zostały jako WT w stosunku do amfoterycyny B. Również wszystkie izolaty z Wrocławia oraz prawie wszystkie (poza jednym) z Warszawy oznaczono jako WT w stosunku do 5-fluorocytozyny. W grupie izolatów z Warszawy nie stwierdzono oporności na którykolwiek z leków z grupy echinokandyn, natomiast wśród izolatów z Wrocławia jeden oporny był na kaspofunginę, jeden oporny na anidulafunginę i kaspofunginę jednocześnie oraz jeden oporny krzyżowo na anidulafunginę, mikafunginę oraz kaspofunginę. Dodatkowo, gdy obserwowano oporność na echinokandyny, to stężenia MIC klasyfikowały się na bardzo wysokim poziomie (> 8 µg/ml). W Tabeli 3. 2. przedstawione jest zestawienie wyników lekowrażliwości izolatów *C. albicans* ze szpitali we Wrocławiu i Warszawie.

**Tabela 3. 2.** Zestawienie wyników oceny lekowrażliwości izolatów *C. albicans*

Lek	WT	non-WT	Wrażliwe	SDD	Średnioop.	Oporne
And	0	0	145	0	0	2
Mf	0	0	146	0	0	1
Cas	0	0	144	0	0	3
5-Fc	146	1	0	0	0	0
Pz	86	61	0	0	0	0
Vor	0	0	102	0	3	42
Iz	0	0	89	7	0	51
Fl	0	0	98	1	0	48
AmB	147	0	0	0	0	0

Dla 19 izolatów oznaczonych jako oporne na flukonazol testem SYO z Warszawy oraz 19 z Wrocławia przeprowadzono procedurę oznaczania wrażliwości na flukonazol zgodnie z zaleceniami CLSI M27-A3. Ze względu na wspomniany wcześniej wzrost resztkowy izolatów w całym zakresie testowanych stężeń i możliwość uzyskiwania fałszywie pozytywnych wyników oporności na podstawie MIC<sub>90</sub>, jako wiążące wyznaczano wartości MIC<sub>50</sub>. W Tabeli 3. 3 i Tabeli 3. 4 (wyłącznie w celach porównawczych) przedstawiono, dlaczego na podstawie wartości MIC<sub>90</sub> można mylnie zaklasyfikować szczepy jako oporne na flukonazol. Na wykresach 3.1 oraz 3.2 przedstawiona została zależność gęstości optycznej hodowli w funkcji stężenia flukonazolu dla wybranych izolatów. Linia przerywaną oznaczone zostały szczepy, które wykazują wzrost resztkowy w całym zakresie stężeń. Linia ciągłą oznaczone są izolaty oporne na flukonazol wg metody rekomendowanej przez CLSI. Na wykresach widać dokładnie różnicę pomiędzy zależnością gęstości optycznej wzrostu od stężenia flukonazolu dla szczepów opornych wg metody rekomendowanej przez CLSI oraz szczepów opornych wg testu SYO. W przypadku pierwszej grupy zależność ta przybiera kształt mocno pochylonej linii, natomiast w przypadku drugiej grupy wykres zaczyna się od wysokiego OD, przy bardzo niskim stężeniu

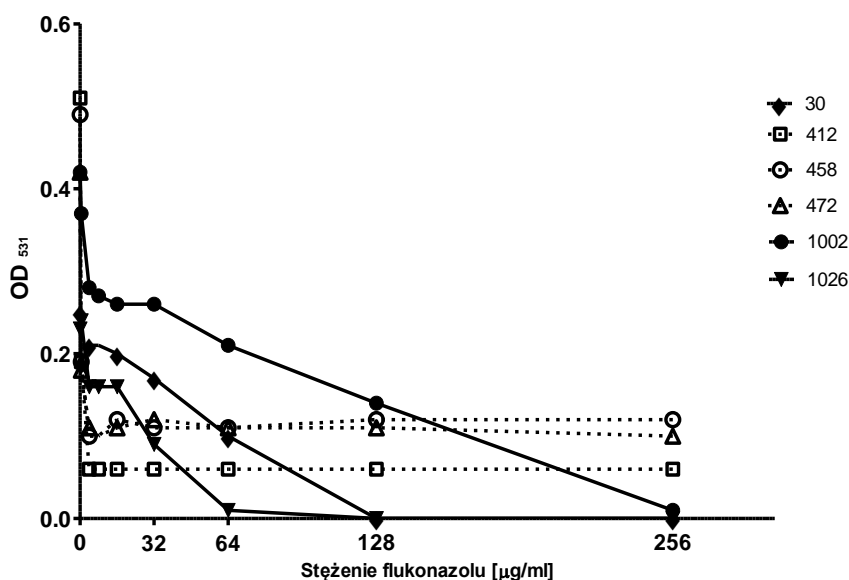
flukonazolu, gwałtownie spada, a następnie utrzymuje się na stałym poziomie (linia pozioma) w całym zakresie stężenia leku.

**Tabela 3. 3.** Wartości MIC<sub>50</sub> (uzyskane metodą mikrorozcieńczeniową rekomendowaną przez CLSI) izolatów *C. albicans* z Warszawy zaklasyfikowanych wstępnie jako najbardziej odporne na flukonazol (MIC  $\geq$  256  $\mu$ g/ml) testem SYO oraz w celach porównawczych MIC<sub>90</sub>. Izolaty prawdziwie odporne na flukonazol zacięniowane są na szaro

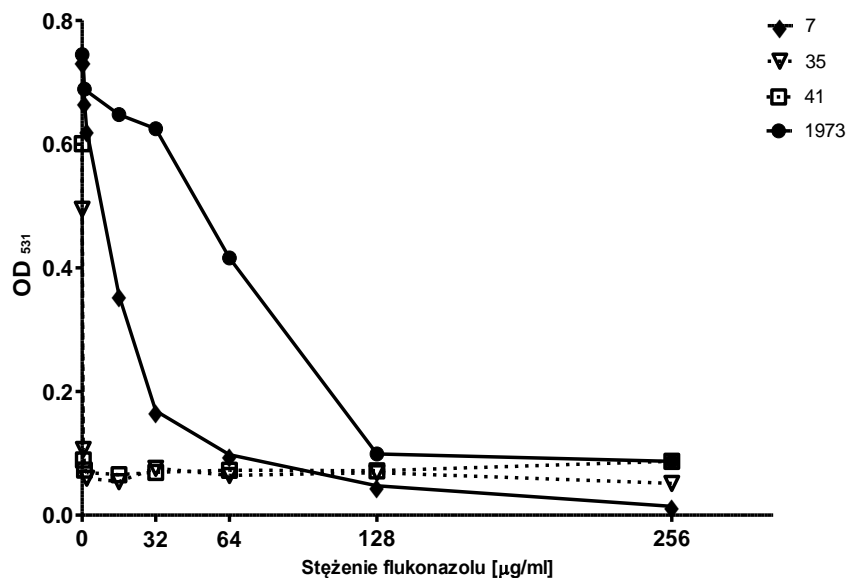
Numer izolatu	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
30	64	128
40	1	4
48	16	32
94	0,5	2
185	1	2
258	0,5	1
266	1	> 256
298	0,5	> 256
299	0,5	> 256
365	0,5	> 256
398	0,5	> 256
412	0,5	128
458	0,5	> 256
472	0,5	> 256
483	0,5	2
572	128	256
604	0,5	> 256
1002	64	256
1026	32	64

**Tabela 3. 4.** Wartości MIC<sub>50</sub> izolatów *C. albicans* z Wrocławia zaklasyfikowanych wstępnie jako odporne na flukonazol (MIC  $\geq$  256  $\mu\text{g/ml}$ ) testem SYO oraz w celach porównawczych MIC<sub>90</sub>. Izolaty prawdziwie odporne na flukonazol zacieniowane są na szaro

Oznaczenie izolatu	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
4	0,5	4
7	16	128
16	0,5	4
17	0,5	1
26	0,25	1
35	<0,5	2
41	<0,5	1
46	0,5	2
49	0,25	128
67	0,5	> 128
96	< 0,5	1
97	< 0,5	1
99	< 0,5	0,5
119	1	> 128
1433	< 0,5	0,5
1768	0,5	1
1973	64	128
1989	1	4
2181	2	8



**Wyk. 3. 1.** Wykresy zależności OD<sub>531</sub> od stężenia flukonazolu dla 6 wybranych izolatów z Warszawy z grupy zaklasyfikowanych wstępnie jako odporne na FL testem SYO. Linią ciągłą oznaczone są szczepy zaklasyfikowane jako odporne na FL na podstawie zaleceń CLSI, liniją przerywaną oznaczone są szczepy wykazujące wzrost resztkowy w całym zakresie stężeń



**Wyk. 3. 2.** Wykresy zależności  $OD_{531}$  od stężenia flukonazolu dla 4 wybranych izolatów z Wrocławia z 19 zaklasyfikowanych wstępnie jako odporne na FL testem SYO. Linią ciągłą oznaczone są szczepy zaklasyfikowane jako odporne na FL na podstawie zaleceń CLSI, linią przerywaną oznaczone są szczepy wykazujące wzrost resztkowy w całym zakresie stężeń

W przypadku analizy lekowrażliwości izolatów z gatunku *C. glabrata* nie obserwowano problemów opisywanych dla gatunku *C. albicans* tzn. nie występuje wzrost resztkowy. Dzięki temu, w teście SYO widać wyraźną granicę wzrostu, a uzyskana analiza jest jednoznaczna. W grupie 81 przebadanych izolatów *C. glabrata* (ze szpitali w Gdańsku, Warszawie i Szczecinie zgodnie z punktem 2.1) 18 wykazywało oporność na flukonazol, 63 zaklasyfikowano jako S-DD, z relatywnie wysokimi stężeniami hamującymi wzrost ( $MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$ ). 15 szczepów wykazywało oporność krzyżową na wszystkie testowane azole. Analiza lekowrażliwości na związki inne niż azole wykazała, że wszystkie przebadane szczepy były wrażliwe na amfoterycynę B. Dodatkowo 1 szczep określono jako S-DD w stosunku do mikafunginy i 9 S-DD w stosunku do kaspofunginy. W przypadku 5-fluorocytozyny 5 szczepów scharakteryzowano jako non-WT z czego wartości MIC dla 3 szczepów były bardzo wysokie ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ), co dla tego gatunku jest rzadko spotykane.

### 3.1.2 Analiza przyczyn lekooporności wyselekcjonowanych izolatów

Wyniki analizy podatności badanych izolatów klinicznych na działanie leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybicowych wskazują na występowanie zjawiska oporności na leki z grupy azoli. Należy także stwierdzić, że odsetek szczepów opornych nie jest stosunkowo duży, szczególnie w przypadku szczepów z Wrocławia. W ramach dalszej części badań podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów, które spowodowały brak wrażliwości na azole zidentyfikowanych opornych izolatów.

### 3.1.2.1. Analiza ekspresji genów odpowiadających za oporność *C. albicans*

Do najważniejszych mechanizmów oporności na leki z grupy azoli zalicza się przede wszystkim występowanie nadekspresji niektórych genów, szczególnie kodujących pompy wielolekowe Cdr1p i Cdr2p, a także genu *ERG11* uczestniczącego w szlaku biosyntezy ergosterolu. W ramach powyższej pracy przeprowadzono analizę poziomów ekspresji genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* oraz *ERG11* w dwóch grupach szczepów klinicznych: 21 izolatów *C. albicans* oraz 71 *C. glabrata*. Do wyliczeń poziomów ekspresji zastosowano metodę Livaka (podwójnej delty). W metodzie tej oblicza się różnicę wartości Ct (Ct tocykl PCR, w którym przekroczony zostaje progowy poziom fluorescencji, *ang. threshold cycle*) dla genów badanego i kontrolnego wyznaczoną na podstawie reakcji amplifikacji z wykorzystaniem tego samego cDNA (próby nieznanej czyli badanego szczepu lub kalibratora). Obliczenie przeprowadza się zarówno dla prób nieznanych jak i kalibracyjnych:

$\Delta Ct$  (próba nieznana) = Ct genu badanego – Ct genu referencyjnego,

$\Delta Ct$  (kalibrator) = Ct genu badanego – Ct genu referencyjnego.

Następnie oblicza się  $\Delta\Delta Ct$  dla każdej próby:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (próba nieznana) -  $\Delta Ct$  (kalibrator).

Dla każdego izolatu reakcja została wykonana w dwóch powtórzeniach i została wyznaczona jedna, średnia wartość parametru R z dwóch prób. Obliczanie znormalizowanej wartości względnego poziomu ekspresji badanego genu w próbie nieznanej względem kalibratora przeprowadza się według wzoru:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

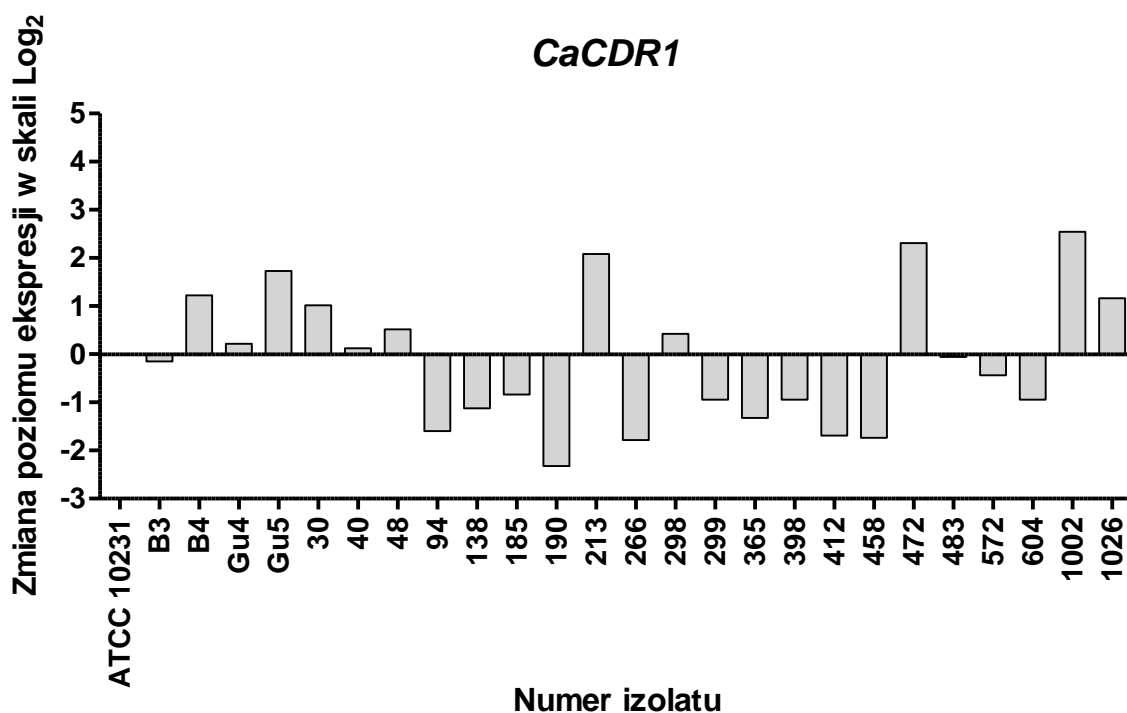
Uzyskiwane w ten sposób wyniki wyrażane są jako wielokrotność próby kalibracyjnej. Należy to interpretować jako porównanie poziomów ekspresji genu targetowego pomiędzy dwoma szczepami (badanego izolatu i kalibratora), przy założeniu, że poziom ekspresji genu referencyjnego w komórkach tych szczepów jest taki sam. Wartość parametru R równa 1 oznacza, że poziom ekspresji lub liczba kopii genu w próbie kalibracyjnej i nieznanej są jednakowe. Liczba mniejsza od jedności wskazuje na wyższy poziom ekspresji w próbie kalibracyjnej zaś większa, na wyższą ekspresję genu w próbie nieznanej w porównaniu z próbą referencyjną

W pierwszej grupie określano poziomy ekspresji genów w grupie 21 izolatów *C. albicans* zaklasyfikowanych wstępnie jako odporne na FL za pomocą testu Sensititre, z czego większość sklasyfikowano dodatkowo jako krzyżowo odporne na wszystkie testowane azole. Jako kalibrator został zastosowany szczep referencyjny wrażliwy na flukonazol *C. albicans* ATCC 10231, natomiast jako gen referencyjny zastosowano gen *ACT1* kodujący aktynę. Dodatkowo jako kontrole zastosowano szczepy B3 i Gu4 izolowane od pacjenta przed terapią oraz B4 i Gu5 po terapii azolami. Izolat B4 wykazuje trwałą nadekspresję genu *MDR1*, natomiast Gu5 nadekspresję genów *CDR1* i *CDR2*. Uzyskane dla nich wyniki potwierdzają molekularne podstawy oporności (tzn. nadekspresję wymienionych genów, Wyk 3.3, 3.4, oraz 3.6).

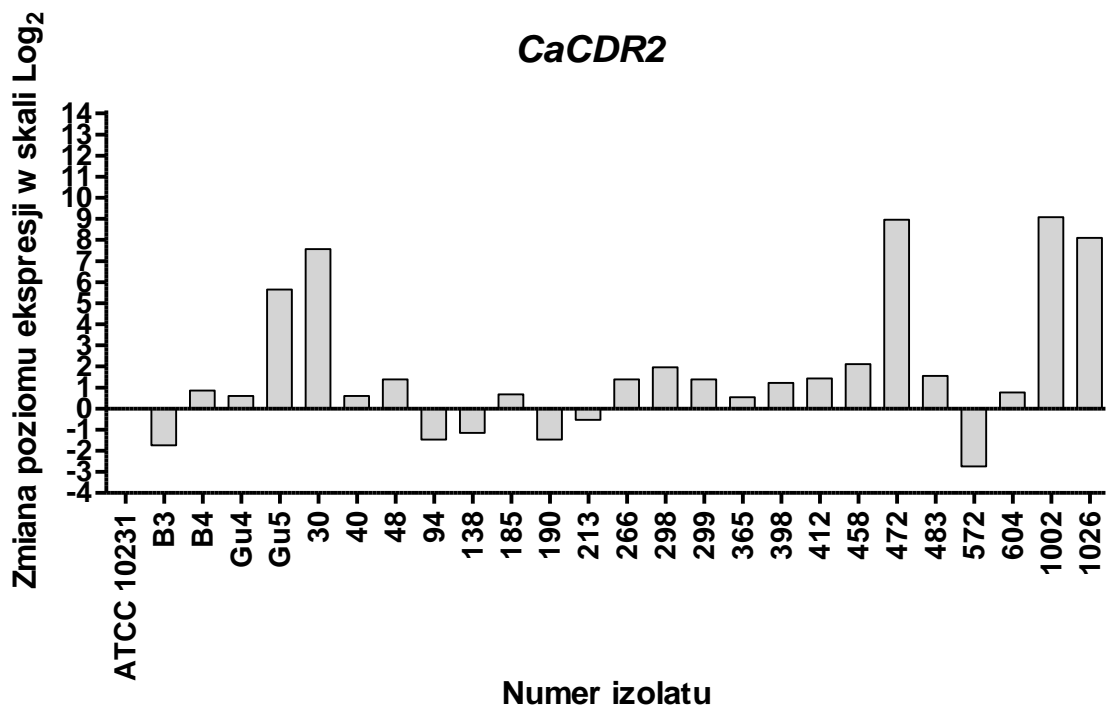
Przeprowadzona analiza nie pozwoliła stwierdzić znaczącego wzrostu ekspresji genów *MDR1* oraz *ERG11*. W przypadku genu *MDR1*, wzrost ekspresji widoczny był jedynie dla szczepu B4 (kontrola pozytywna) oraz niewielki wzrost dla szczepu 213. Dla genu *ERG11* nadekspresję stwierdzono jedynie w trzech izolatach (30, 472, 1026) z czego u dwóch (30 i 1026) oporność na flukonazol potwierdzona była dwiema metodami. Jednak w pozostałych przypadkach ekspresja *ERG11* była niższa niż u szczepu referencyjnego *C. albicans* ATCC 10231.

W przypadku 5 izolatów (oznaczenia na wykresie 30, 213, 472, 1002, 1026) z 21 testowanych oznaczono znaczący wzrost poziomu ekspresji genu *CDR1*. Dodatkowo niewielki wzrost ekspresji występował w szczepach oznaczonych jako 48 i 298. Wartość parametru R wśród izolatów 30, 213, 472, 1002, 1026 wynosiła pomiędzy 2,02 a 5,82 w porównaniu do szczepu referencyjnego (Wyk. 3.3).

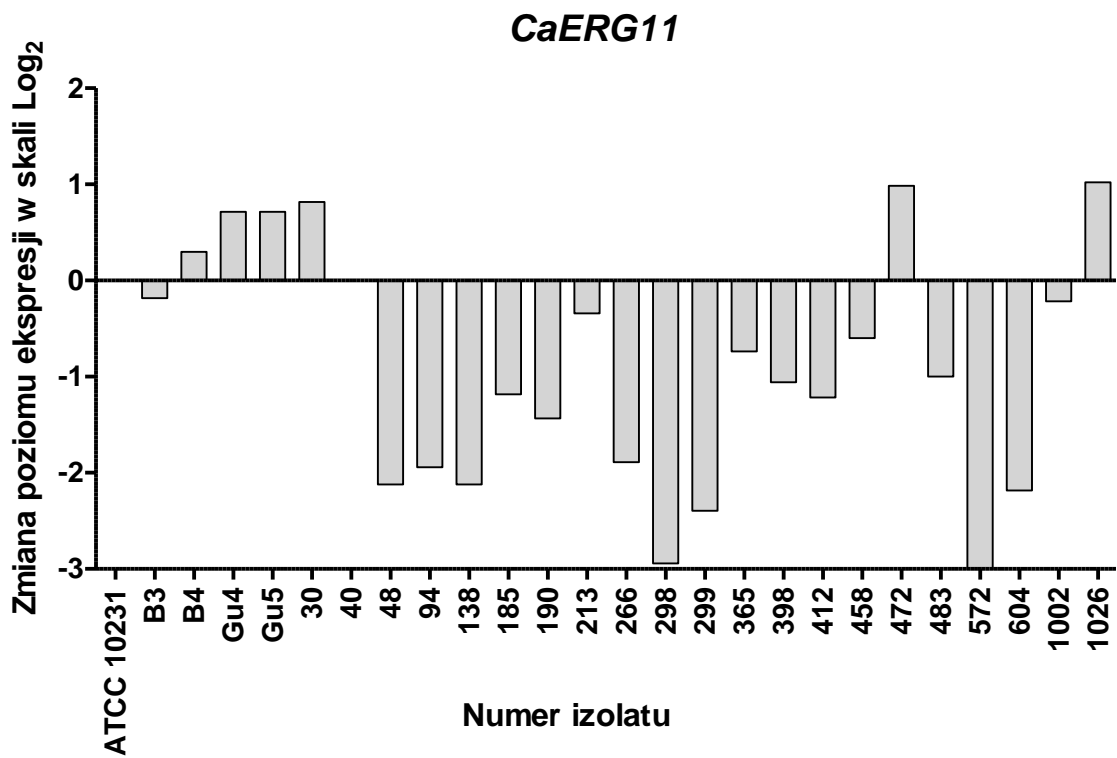
Analiza ekspresji genu *CDR2* w szczepach opornych na flukonazol ujawiła bardzo wysoki relatywny wzrost ekspresji w szczepach oznaczonych numerami 30, 472, 1002 oraz 1026. Wartość współczynnika R była nawet wyższa niż dla szczepu Gu5 używanego jako pozytywna kontrola nadekspresji i mieściła się w przedziale 190 – 540. Mniejszy poziom nadekspresji tego genu, jednak wciąż istotny, stwierdzono w przypadku dwóch izolatów 298 i 458, a wartość współczynnika R wynosił dla nich około 4 (Wyk. 3.4).



**Wyk. 3. 3.** Poziomy ekspresji genu *CDR1* dla 26 izolatów z populacji *C. albicans* (23 zaklasyfikowane jako odporne a 3 wrażliwe na flukonazol wg testu SYO) w porównaniu do kalibratora (ATCC 10231 MIC = 2 µg/ml)

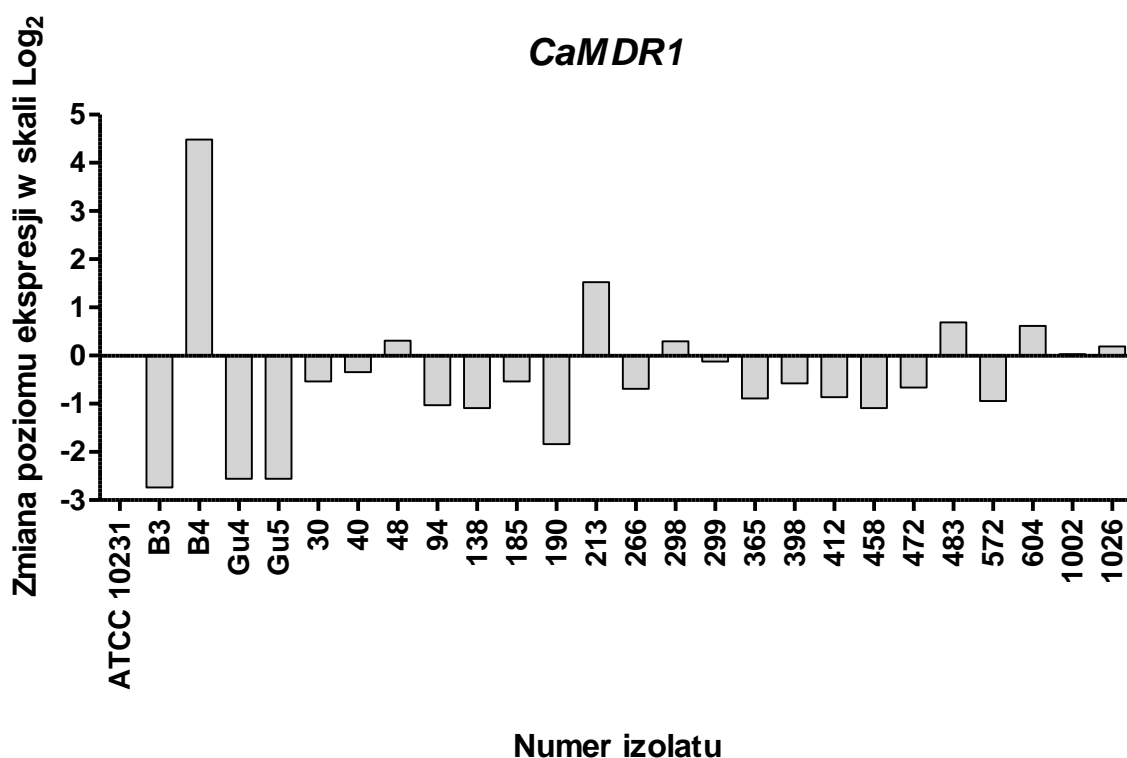


**Wyk. 3. 4.** Poziomy ekspresji genu *CDR2* dla 26 izolatów z populacji *C. albicans* (23 zaklasyfikowane jako odporne a 3 wrażliwe na flukonazol wg testu SYO) w porównaniu do kalibratora (ATCC 10231 MIC = 2 µg/ml)



**Wyk. 3. 5.** Poziomy ekspresji genu *ERG11* dla 26 izolatów z populacji *C. albicans* (23 zaklasyfikowane jako odporne a 3 wrażliwe na flukonazol wg testu SYO) w porównaniu do kalibratora (ATCC 10231 MIC = 2 µg/ml)





**Wyk. 3. 6.** Poziomy ekspresji genu *MDR1* dla 26 izolatów z populacji *C. albicans* (23 zaklasyfikowane jako odporne a 3 wrażliwe na flukonazol) w porównaniu do kalibratora (ATCC 10231 MIC = 2 µg/ml)

### 3.1.2.2. Analiza ekspresji genów odpowiadających za oporność drożdży *C. glabrata*

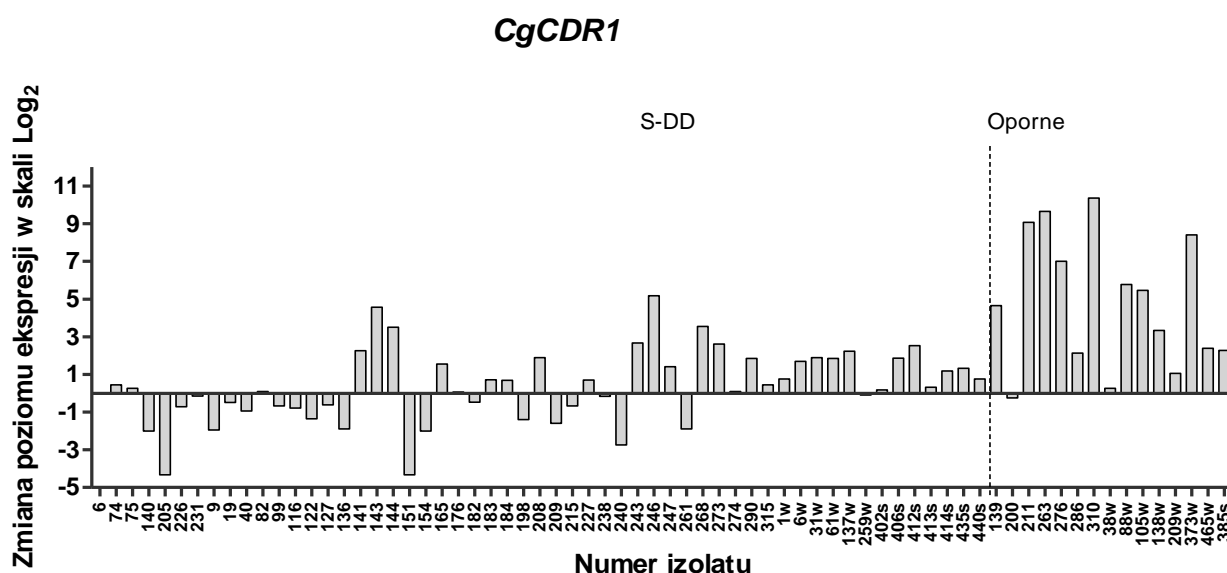
Analizie poddanych zostało również 71 izolatów klinicznych z gatunku *C. glabrata*. Szczepy zostały podzielone na dwie grupy: odporne (MIC ≥ 64 µg/ml, n=15) i wrażliwe zależnie od dawki (MIC ≤ 32 µg/ml, n=56) zgodnie z wytycznymi CLSI M27-S4. Ponadto obydwie grupy zostały poddane analizie statystycznej testem U Manna Whitneya. Wyznaczany był tzw. parametr P, którego wartość poniżej 0,05 oznacza, że obydwie populacje są znacząco różne, co potwierdza hipotezę, że w jednej z grup obserwowany jest znaczący wzrost poziomu ekspresji danego genu.

Przy analizie ekspresji genu *CDR1* 13 szczepów z 15 (86,6%) wykazywało wyraźny wzrost poziomu ekspresji (Wyk. 3. 7). Wartość parametru R wahała się w granicach od 2,07 do 1318,25 w porównaniu do szczepu wybranego jako kalibrator (izolat kliniczny wrażliwy na flukonazol na wykresach poniżej oznaczony numerem 6). W grupie izolatów oznaczonych jako wrażliwe w zależności od dawki (n=56) w stosunku do flukonazolu 16 (28,6%) wykazywało podwyższony poziom ekspresji (R od 2,27 do 36,13). Wartość parametru P w teście U Manna Whitneya wynosiła znacząco poniżej 0,0001, co oznacza, że obydwie grupy zdecydowanie różnią się poziomami ekspresji (Wyk. 3.8).

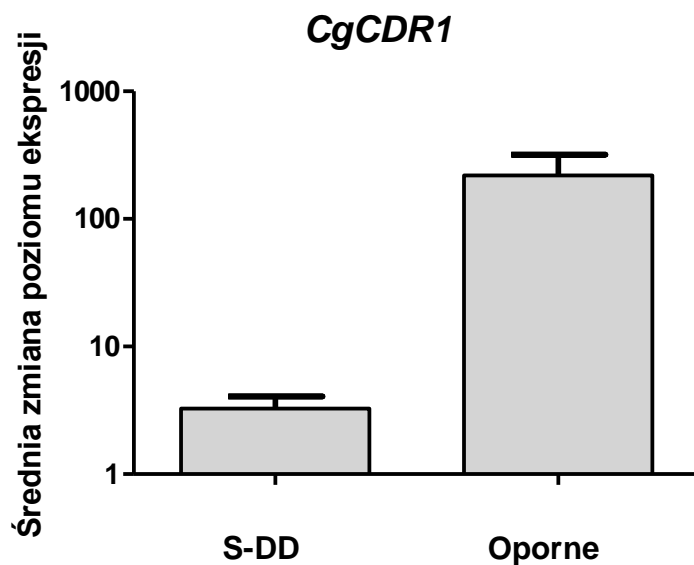
Analiza ekspresji genu *CDR2* wykazała, że nadekspresja występuje w 13 (22,8%) izolatach z grupy S-DD i w 5 (35,7%) z grupy opornych (Wyk. 3.9). Wartość parametru R, dla szczepów, gdzie widoczna jest nadekspresja, wynosiła od 2,02 do 18,81 dla szczepów S-DD oraz od 2 do 6,36 dla opornych. Można także zaobserwować, że w przypadku 28 szczepów S-

DD ekspresja jest widocznie obniżona, a wartości R w ich przypadku zaczynają się od 0,06. W porównaniu do genu *CDR1* poziomy ekspresji są znacząco niższe. Natomiast wartość parametru P w teście U Manna Whitneya wynosiła 0,0681, a więc grupy nie różnią się znacząco i nie można stwierdzić, że nadekspresja tego genu odpowiada za nabywanie oporności (Wyk.3.10.).

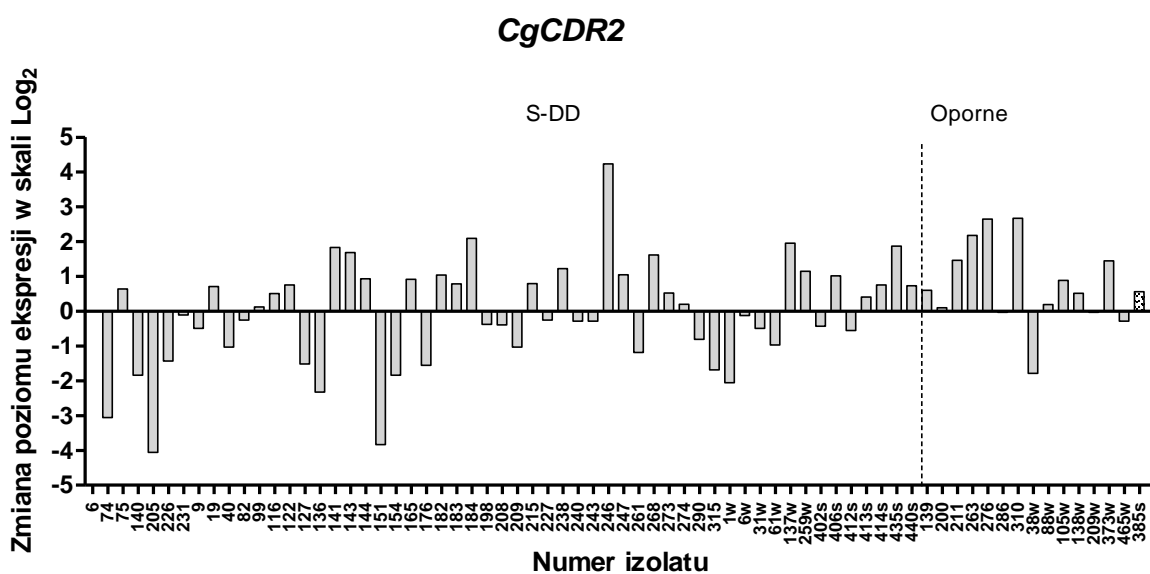
Odmienne od oczekiwanych wyniki uzyskano dla genu *ERG11*. Dwanaście (21%) szczepów z 57 oznaczonych jako S-DD wykazywało podwyższony poziom ekspresji w stosunku do kalibratora z wartością parametru R mieszczącą się w zakresie od 2,03 do 12,79. Natomiast w grupie opornych nie zaobserwowano znaczącego wzrostu ekspresji (powyżej 2) a wartość R wahała się w granicach od 0,36 do 1,85 w porównaniu do izolatu 6 Gd. Także analiza statystyczna nie wykazała, aby grupa szczepów opornych różniła się znacząco od grupy wrażliwych zależnie od dawki (Wyk. 3. 11).



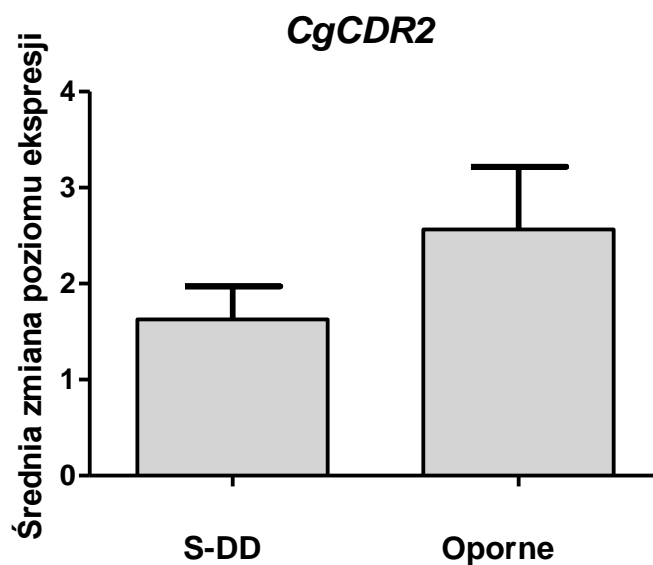
**Wyk. 3. 7.** Poziomy ekspresji genu *CDR1* dla 71 izolatów z populacji *C. glabrata* (15 zaklasyfikowane jako oporne a 56 S-DD) w porównaniu do kalibratora (6 Gd MIC = 8 µg/ml)



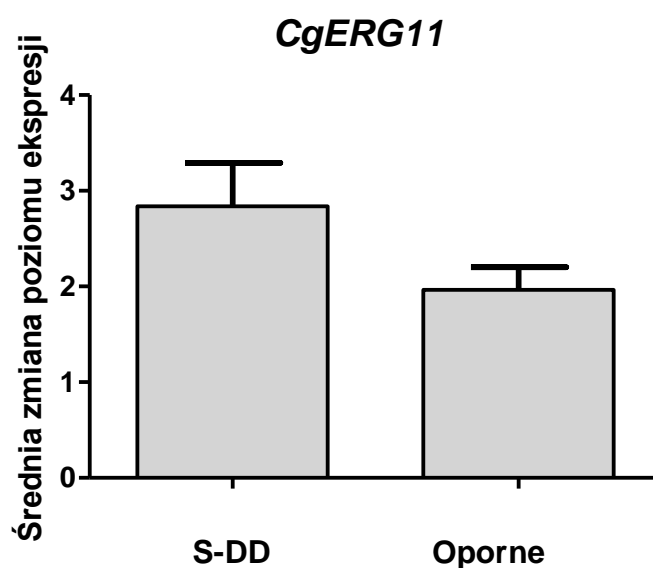
Wyk. 3. 8. Analiza statystyczna zmian poziomów ekspresji genu *CDR1* izolatów *C. glabrata*. Słupki błędów oznaczają błąd standardowy średniej (SEM)



Wyk. 3. 9. Poziomy ekspresji genu *CDR2* dla 71 izolatów z populacji *C. glabrata* (15 zaklasyfikowane jako odporne a 56 S-DD) w porównaniu do kalibratora (6 Gd MIC = 8 µg/ml)



Wyk. 3. 10. Analiza statystyczna zmian poziomów ekspresji genu *CDR2* izolatów *C. glabrata*



Wyk. 3. 11. Analiza statystyczna zmian poziomów ekspresji genu *ERG11* izolatów *C. glabrata*

### 3.1.2.3. Analiza mutacji w genie *ERG11*

Wyniki sekwencjonowania genu *ERG11* 43 izolatów *C. albicans* z Warszawy oraz 17 z Wrocławia ujawniły występowanie licznych mutacji w obrębie sekwencji nukleotydowej skutkujących zmianami w sekwencji aminokwasowej. Mutacje występowały w większości izolatów, jednak ich brak stwierdzono w 8 izolatach z Warszawy oraz 3 z Wrocławia. W grupie izolatów z Warszawy mutacje pojawiły się u 24 izolatów opornych na flukonazol i 11 wrażliwych. 22 izolaty zawierały więcej niż jedną mutację. Poszczególne mutacje pojawiały się zarówno w szczepach opornych jak i wrażliwych V112I (5 R i 1 S), E266D (18 R i 4 S), G450R (4 R i 1 S)

i V488I (9 R i 1 S). Zdecydowanie najczęściej obserwowana była mutacja w pozycji 266 skutkująca zamianą kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy, która wystąpiła 22 (51,2%) razy. Częstą mutacją była także wymiana waliny na izoleucynę w pozycji 488, która pojawiła się 10 (23,3%) razy. Uwzględniając klasyfikację oporności na podstawie metody mikrorozcieńczeniowej zalecanej przez CLSI oporność na FL występowała w 5 szczepach. Wśród nich substytucja V112I została zidentyfikowana w 4 przypadkach tak samo jak G450R.

W przebadanej grupie 19 szczepów (z czego wyniki sekwencjonowania uzyskano dla 17) ze szpitala z Wrocławia, zaklasyfikowanych jako odporne testem Sensititre, mutacja w pozycji 266 pojawiła się 9 (53%) razy, wymiana waliny na izoleucynę w pozycji 488, pojawiała się 5 (29,4%) razy, nie występowały natomiast mutacje V112I oraz G450R.

Biorąc pod uwagę wszystkie izolaty, dla których zsekwenowano gen *ERG11*, można stwierdzić, że część mutacji pojawiała się tylko w szczepach oznaczonych jako wrażliwe na flukonazol. Są to mutacje w pozycjach 116 (wymiana kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy) i 159 (wymiana waliny na izoleucynę). Mutacje występujące tylko w szczepach opornych wystąpiły dwukrotnie w pozycji 145 (wymiana feniloalaniny na leucynę) oraz jednokrotnie w pozycji 126 (również wymiana feniloalaniny na leucynę). Dwie mutacje R163K oraz K342R obecne były tylko w jednym izolacie (nr 7 z Wrocławia), który zaklasyfikowano jako jeden z opornych wg zaleceń CLSI. Pozostałe mutacje, które pojawiały się niezależnie od oznaczonej wrażliwości na flukonazol to K128T, E266D, G450R oraz V488I (Tabela 3. 5Tabela 3. 6).

Zdecydowanie najczęściej mutacje pojawiały się w rejonach tzw. „hot spot” (pozycje aminokwasowe 105-165, 266-287, 405-488 w obrębie enzymu). W obydwu grupach izolatów występowały one łącznie 70 razy. Były to kolejno substytucje: V112I, D116E, K128T, F145L, D153E, V159I, R163K, E266D, G450R, V488I. Jedna z nich R163K nie została dotychczas opisana w literaturze.

**Tabela 3. 5.** Zidentyfikowane mutacje w obrębie białka Erg11p w 43 izolatach *C. albicans* izolowanych od pacjentów ze szpitala „Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” oraz wrażliwości na 4 testowane azole (wg testu SYO)

MIC ( g/ml) oraz kategoria wrażliwości na lek (oznaczone testem SYO)										MIC50 (CLSI)		Mutacje
Lp.	Nr izolatu	FLC <sup>^</sup>		PZ		VOR <sup>^^</sup>		IZ		FLC		
1	25	1	S	> 8	non-WT	0,015	S	0,12	WT	nd		L15S; S18R; E266D; V488I
2	<b>30*</b>	128	R	0,5	non-WT	1	R	0,5	non-WT	64	R	V112I
3	34	16	R	0,05	WT	0,25	S-DD	0,5	non-WT	nd		F145L; E266D
4	40*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	1	S	-
5	48*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	16	R	F145L; E266D; G450R
6	52	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D; V488I
7	81	< 0,012	S	0,008	WT	0,008	S	0,03	WT	nd		D116E; K128T; V159I
8	82	0,25	S	> 8	non-WT	0,015	S	> 16	non-WT	nd		D116E; K128T; V159I

MIC ( g/ml) oraz kategoria wrażliwości na lek (oznaczone testem SYO)										MIC50 (CLSI)		Mutacje
Lp.	Nr izolatu	FLC <sup>^</sup>		PZ		VOR <sup>^^</sup>		IZ		FLC		
9	92	0,5	S	0,03	WT	0,03	S	0,03	WT	nd		-
10	94*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	V112I; V488I
11	97	0,5	S	0,12	non-WT	0,12	S	0,12	WT	nd		E266D
12	109	< 0,012	S	0,008	WT	0,008	S	<0,015	WT	nd		D116E; K128T; V159I
13	125	1	S	> 8	non-WT	0,03	S	> 16	non-WT	nd		-
14	138*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D
15	185*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	1	S	E266D; V488I
16	190*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D; V488I
17	191	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D
18	202	<0,012	S	0,008	WT	0,008	S	< 0,015	WT	nd		D116E; K128T; V159I
19	<b>213</b>	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		K128T
20	227	1	S	> 8	non-WT	0,03	S	> 16	non-WT	nd		T6A; E266D
21	247	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		-
22	258	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	-
23	260A	0,5	S	0,03	WT	B	S	0,06	WT	nd		-
24	260B	32	R	0,25	non-WT	0,25	S-DD	0,25	non-WT	nd		-
25	266*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	1	S	V126L; E266D
26	<b>298*</b>	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	A2T; E266D; V488I
27	299*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D
28	365*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D
29	366	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D
30	378	0,5	S	> 8	non-WT	0,015	S	> 16	non-WT	nd		K128T
31	398*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D
32	412*	> 256	R	4	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D; V488I
33	435	1	S	> 8	non-WT	0,015	S	> 16	non-WT	nd		E266D
34	<b>458*</b>	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D; V488I
35	<b>472*</b>	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D; V488I
36	483	64	R	0,12	non-WT	0,12	S	1	non-WT	0,5	S	E266D
37	572	128	R	1	non-WT	1	R	0,5	non-WT	128	R	V112I; G450R
38	574	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	nd		E266D; V488I
39	604*	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	-

MIC (g/ml) oraz kategoria wrażliwości na lek (oznaczone testem SYO)										MIC <sub>50</sub> (CLSI)		Mutacje
Lp.	Nr izolatu	FLC <sup>^</sup>		PZ		VOR <sup>^^</sup>		IZ		FLC		
40	<b><u>1002*</u></b>	128	R	0,5	non-WT	1	R	0,5	non-WT	64	R	V112I; G450R
41	1018	0,5	S	0,03	WT	0,03	S	0,06	WT	nd		V112I; G450R
42	<b><u>1026*</u></b>	64	R	0,5	non-WT	0,5	S-DD	0,5	non-WT	32	R	V112I; G450R
43	1037	0,5	S	> 8	non-WT	0,03	S	> 16	non-WT	nd		K128T

\* W przypadku szczepów oznaczonych „\*” przeprowadzona została analiza ekspresji genów *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *ERG11*. „nd” oznacza, że wartość nie została zdefiniowana, „-” oznacza brak mutacji w sekwencji aminokwasowej. Nadekspresja genu *CDR1* oznaczona jest przez pogrubienie i kursywę numeru izolatu, natomiast nadekspresja genu *CDR2* przez pogrubienie i podkreślenie.

**Tabela 3. 6.** Zidentyfikowane mutacje w obrębie białka Erg11p w 17 izolatach *C. albicans* izolowanych od pacjentów ze szpitala Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz wrażliwości na 4 testowane azole wg testu SYO

MIC (μg/ml) oraz kategoria wrażliwości na lek (oznaczone testem SYO)										MIC <sub>50</sub> (CLSI)		Mutacje
Lp.	Nr izolatu	FLC <sup>^</sup>		PZ		VOR <sup>^^</sup>		IZ		FLC		
1	4	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	K128T
2	7	16 /> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	16	R	R163K; E266D; K342R
3	16	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D; V488I
4	17	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D
5	26	16	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	E266D
6	35	> 256	R	> 8	non-WT	> 8/0,015	R	> 16	non-WT	0,25	S	-
7	41	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	E266D; V488I
8	46	0,5/> 256	R	0,015/> 8	non-WT	0,015	S	0,015/> 16	non-WT	0,5	S	-
9	49	1/> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	E266D; V488I
10	67	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	D153E
11	96	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	K128T
12	97	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	V51M
13	99	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	E266D; V488I
14	119	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	1	S	-
15	1433	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,25	S	K128T
16	1768	> 256	R	> 8	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	0,5	S	E266D
17	1973	> 256	R	4	non-WT	> 8	R	> 16	non-WT	64	R	nd
18	1989	8	R	0,25	non-WT	0,06	S	0,025	WT	1	S	E266D; V488I
19	2181	8	R	0,5	non-WT	0,12	S	0,06	WT	2	S	nd

### **3.2. Analiza aktywności przeciwgrzybowej *in vitro* produktów pochodzenia naturalnego mogących stanowić alternatywę wobec obecnie stosowanych leków przeciwgrzybowych**

Wyniki dotychczas przedstawionych badań wskazują, że problemem jest występowanie oporności na najczęściej stosowane leki w terapii infekcji przeciwgrzybiczych, czyli azole. Pozostałe leki o aktywności przeciwgrzybiczej wydają się być w dalszym ciągu bardzo skuteczne. Zaznaczyć jednak należy, że część z nich jest znacznie bardziej toksyczna, dlatego stosowane są jako leki drugiego wyboru, przy nieskuteczności leczenia infekcji azolami. Wiele zespołów badawczych dowodzi jednak, że stosowanie innych leków również przyczynia się do nabywania oporności przez mikroorganizmy (Edlind & Katiyar, 2010; Krogh-Madsen et al., 2006; Perlin, 2015), a w niektórych przypadkach występuje ona jako oporność pierwotna (Hope et al., 2004). Dlatego też, ważnym zagadnieniem jest poszukiwanie nowych związków wykazujących aktywność przeciwgrzybową, na które mikroorganizmy nie wykazywałyby oporności, które charakteryzowałyby się jednocześnie ograniczoną toksycznością dla organizmu. Przedmiotem badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie były produkty pochodzenia naturalnego, mianowicie olejki eteryczne i propolisys pszczele jako możliwa alternatywa.

#### **3.2.1. Aktywność olejków eterycznych**

W badaniach zastosowano komercyjnie dostępne olejki eteryczne, których dystrybutorem w Polsce jest firma Pollena Aroma. Producent gwarantuje, że są to czyste, 100% (bez dodatków rozpuszczalników organicznych) olejki eteryczne pozyskane ze źródeł roślinnych, dodatkowo w fazie badań wstępnych stwierdzono, że wykazują one wyższe aktywności przeciwdrobnoustrojowe niż testowane olejki innych marek, dlatego do dalszych badań stosowano tylko olejki firmy Pollena Aroma (linia dr Beta). Aktywność przeciwgrzybowa *in vitro* wyznaczana była w buforowanym do pH = 7,0 podłożu RPMI-1640 rekomendowanym przez CLSI do określania aktywności związków przeciwgrzybowych, którego skład odpowiada warunkom fizjologicznym w organizmie gospodarza. Przesiewowe oznaczenie aktywności 38 olejków eterycznych przeprowadzono na szczepach *C. albicans* B3, B4, Gu4 Gu5 oraz referencyjnym *C. albicans* ATCC 10231. W rezultacie wyselekcjonowano sześć najaktywniejszych olejków; tymiankowy, cytrynowy, geraniowy, cynamonowy z kory, bazyliowy i goździkowy z pąków (Szweda et al., 2015).

Następnie wyznaczono wartości MIC wyselekcjonowanych olejków na grupie 183 izolatów klinicznych *C. albicans* oraz 76 *C. glabrata*. Poza określeniem wartości MIC wyznaczano także minimalne stężenie grzybobójcze. Według definicji jest to minimalne stężenie związku, które hamuje wzrost mikroorganizmu po przeniesieniu na podłoże nie zawierające czynnika hamującego wzrost.

Na wykresach 3.12 poniżej przedstawiono histogramy wartości MIC oraz MFC dla wyselekcjonowanych olejków eterycznych. W przypadku analizy wyników uzyskanych z zastosowaniem olejku tymiankowego dla gatunku *C. glabrata* widoczny jest typowy rozkład dwumodalny z jednym maksimum dla wartości stężenia 0,16% (v/v), a drugim < 0,005%,



natomiast dla gatunku *C. albicans* rozkład odbiega od normalnego. Zahamowanie wzrostu wszystkich przebadanych szczepów następowało przy stężeniu 0,625%. Dominanta gatunku *C. albicans* wynosi 0,08%, a dla *C. glabrata* 0,16% (v/v). W 30 i 15 przypadkach odpowiednio dla *C. albicans* i *C. glabrata* niemożliwe było wyznaczenie wartości MIC w testowanym zakresie stężeń i wynosiły one poniżej 0,005% (v/v).

Olejek cytrynowy wykazywał nieco wyższą aktywność wobec drożdżaków z gatunku *C. glabrata*. Stężenie 0,625% (v/v) było wystarczające, aby zahamować wzrost wszystkich izolatów tego gatunku, przy czym ważne podkreślenia jest to, że badania aktywności wobec *C. glabrata* zostały przeprowadzone na 76 szczepach *C. glabrata*, natomiast liczba szczepów *C. albicans* była prawie 2,5 razy wyższa. W 21 (11,5%) przypadkach dla *C. albicans* i 27 (35,5%) dla *C. glabrata* nie było możliwe wyznaczenie wartości MIC, która wynosiła poniżej 0,005%.

Analiza aktywności olejku geraniowego wykazała typowy rozkład normalny dla obydwu gatunków. Wartość dominanty wynosiła dla nich 0,16%. Olejek geraniowy wykazywał jednak niższą aktywność od dwóch poprzednich. Aby zahamować wzrost wszystkich izolatów należało zastosować stężenie na poziomie 1,25% (v/v), a praktycznie wszystkie wartości MIC były wyższe niż 0,005% (v/v).

W rozkładzie wartości stężeń dla olejku bazyliowego także widoczne były dwa maksima, jedno przy stężeniu < 0,005% a drugie 0,3125% w przypadku obydwu gatunków. Najwyższa wartość MIC wynosiła dla nich 1,25% (v/v).

Analiza aktywności olejku goździkowego wykazała podobne wyniki aktywności jak uzyskane dla olejku geraniowego. Tu także rozkład jest w przybliżeniu normalny, wartość dominanty dla obydwu gatunków również wynosi 0,16% (v/v). Stężenie, przy którym wzrost wszystkich izolatów został zahamowany, wynosiło 2,5% (v/v) (Tabela 3. 7 i Tabela 3. 9).

**Tabela 3. 7.** Liczby izolatów *C. albicans* wykazujących MIC przy określonych stężeniach wybranych olejków eterycznych

MIC [% (v/v)]	tymiankowy	cytrynowy	geraniowy	bazyliowy	goździkowy
< 0,005	30	21	1	24	2
0,005	3	3	0	0	0
0,01	28	13	6	1	6
0,02	14	12	8	6	8
0,04	20	21	17	7	17
0,08	31	20	30	21	29
0,16	22	20	47	30	35
0,3125	26	31	40	55	29
0,625	9	23	28	26	29
1,25	0	12	6	13	20
2,5	0	5	0	0	8
> 2,5	0	2	0	0	0

Zdecydowanie najwyższą aktywnością odznaczał się olejek cynamonowy z kory. Dla omawianego produktu zastosowano odrębny zakres stężeń w granicach od 0,002% do 0,125%

(v/v). To jednak w dalszym ciągu nie pozwoliło na wyznaczenie wartości MIC dla 114 (62%) izolatów *C. albicans* oraz 43 (57%) izolatów *C. glabrata*, które w ich przypadku wynosiły poniżej 0,002% (v/v). Stężenie, które hamowało wzrost wszystkich testowanych szczepów wynosiło 0,125% (v/v), a więc było przynajmniej pięciokrotnie niższe niż pozostałych olejków (Tabela 3. 8 i Tabela 3. 10).

Stężenie 1,25% (v/v) okazało się wystarczające aby zahamować wzrost 92% wszystkich przebadanych izolatów *C. albicans* oraz 99% izolatów *C. glabrata* przez każdy z wytypowanych olejków. Wartości MFC były w większości przypadków równe MIC lub co najwyżej dwukrotnie wyższe.

**Tabela 3. 8.** Liczby izolatów *C. albicans* wykazujących MIC przy określonych stężeniach olejku cynamonowego

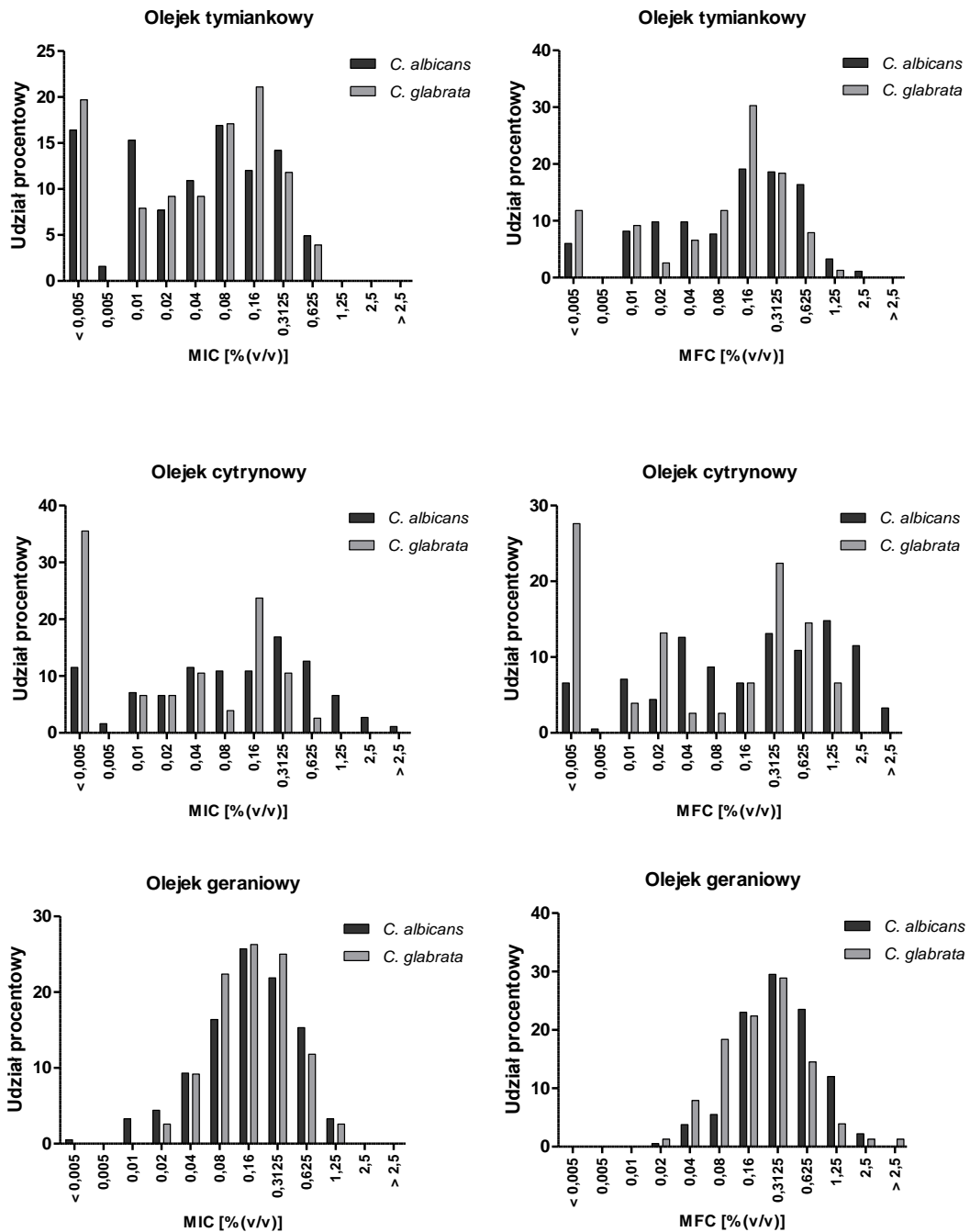
MIC [% (v/v)]	cynamonowy
< 0,002	114
0,002	9
0,004	12
0,008	9
0,016	12
0,031	16
0,062	10
0,125	1

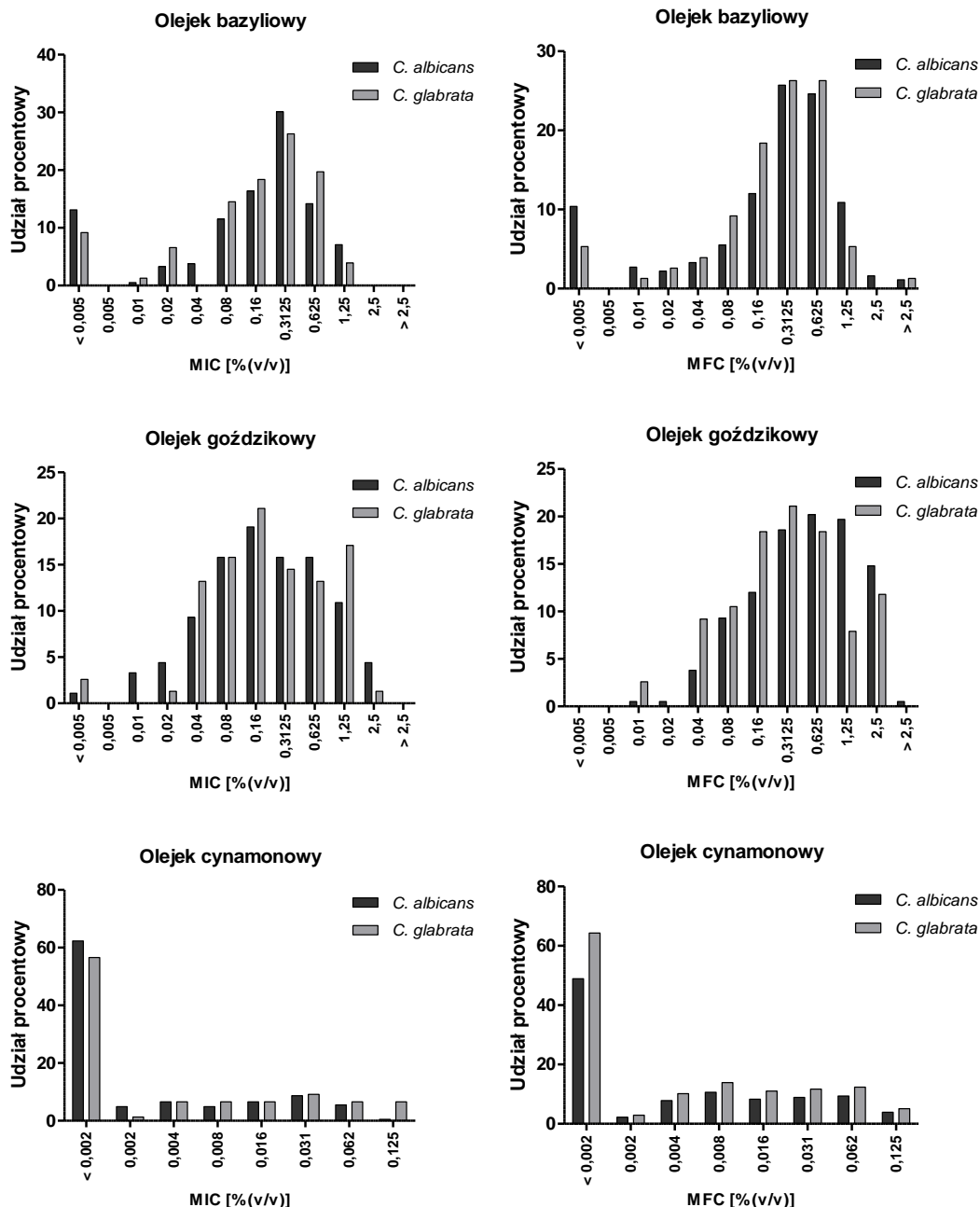
**Tabela 3. 9.** Liczby izolatów *C. glabrata* wykazujących MIC przy określonych stężeniach wybranych olejków eterycznych

MIC [% (v/v)]	tymiankowy	cytrynowy	geraniowy	bazyliowy	goździkowy
< 0,005	15	27	0	7	2
0,005	0	0	0	0	0
0,01	6	5	0	1	0
0,02	7	5	2	5	1
0,04	7	8	7	0	10
0,08	13	3	17	11	12
0,16	16	18	20	14	16
0,3125	9	8	19	20	11
0,625	3	2	9	15	10
1,25	0	0	2	3	13
2,5	0	0	0	0	1
> 2,5	0	0	0	0	0

**Tabela 3. 10.** Liczby izolatów *C. glabrata* wykazujących MIC przy określonych stężeniach olejku cynamonowego

MIC [% (v/v)]	cynamonowy
< 0,002	43
0,002	1
0,004	5
0,008	5
0,016	5
0,031	7
0,062	5
0,125	5



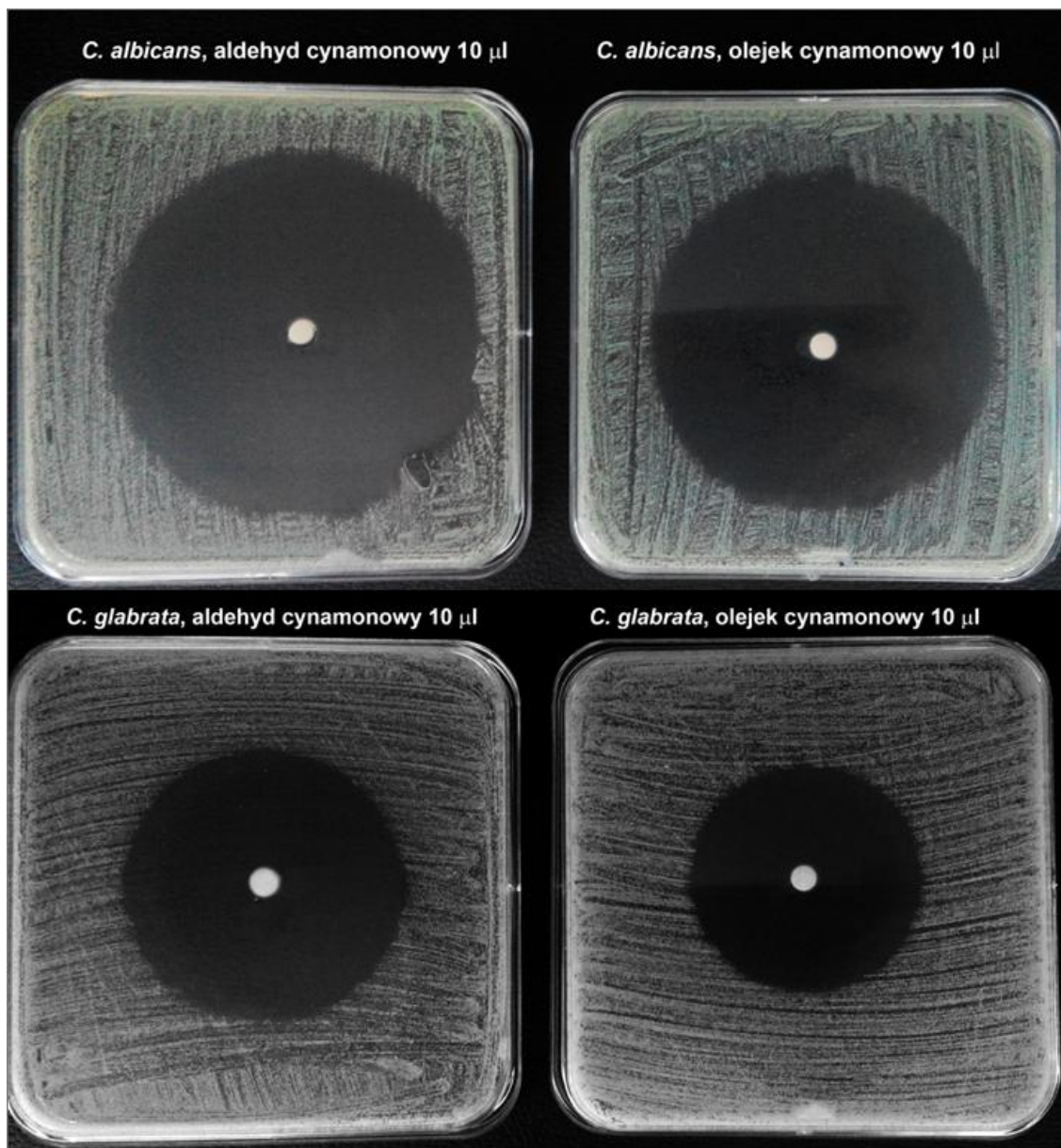


**Wyk. 3. 12.** Aktywności sześciu wybranych olejków eterycznych wobec izolatów klinicznych *C. albicans* oraz *C. glabrata*, wyznaczone jako wartość MIC (wykresy po lewej stronie) oraz MFC (wykresy po prawej stronie)

### 3.2.2. Porównanie aktywności olejku cynamonowego i aldehydu cynamonowego

Metodą dyfuzyjno-krążkową porównano aktywność olejku cynamonowego z aktywnością czystego aldehydu cynamonowego, głównego składnika tego olejku. Określano strefę zahamowania wzrostu dla dwóch szczepów referencyjnych *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226 na podłożach sporządzonych na kwadratowych płytkach o boku 12,5 cm. Strefa zahamowania wzrostu gatunku *C. albicans* po zastosowaniu 10  $\mu$ l aldehydu

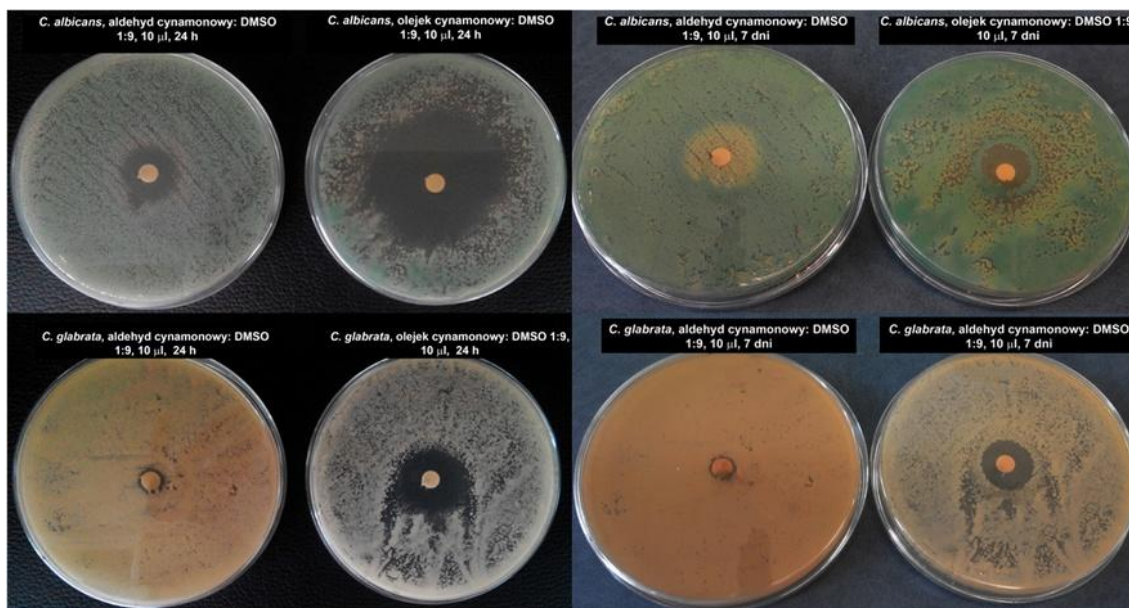
cynamonowego wynosiła około 9 cm, dla olejku cynamonowego była porównywalna, natomiast strefy zahamowania wzrostu *C. glabrata* wynosiły odpowiednio 6,8 oraz 5,9 cm (Fot. 3. 1).



Fot. 3. 1. Strefy zahamowania wzrostu szczepów *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226 uzyskane po zastosowaniu 10 µl aldehydu cynamonowego lub 10 µl olejku cynamonowego. Posiewy wykonano na kwadratowych płytkach o boku 12,5 cm

Ciekawy wynik uzyskano także po zastosowaniu preparatów rozcieńczonych w DMSO w stosunku 1:9 (Fot. 3.2). Strefy zahamowania wzrostu po 24 h wywołane olejkiem cynamonowym były znacząco większe niż samym aldehydem. Ponadto po kolejnych kilku dniach inkubacji wokół krążka z naniesionym aldehydem cynamonowym, gdzie pierwotnie nie obserwowano wzrostu, pojawił się wtórny wzrost mikroorganizmu. Strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z olejkiem cynamonowym częściowo się zmniejszyła, jednak wokół samego krążka przestrzeń została nieskolonizowana wtórnie przez mikroorganizmy. Kontrola samego

rozpuszczalnika wykazała, że DMSO w badanym stężeniu nie wpływał na wzrost mikroorganizmu (Fot. 3.3).



**Fot. 3. 2.** Strefy zahamowania wzrostu *C. albicans* i *C. glabrata* po 24 h i po 7 dniach uzyskane z zastosowaniem aldehydu cynamonowego lub olejku cynamonowego rozpuszczonego w DMSO w stosunku 1:9



**Fot. 3. 3.** Efekt zastosowania rozpuszczalnika wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231

### 3.2.3. Określenie kinetyki efektu grzybobójczego olejków eterycznych

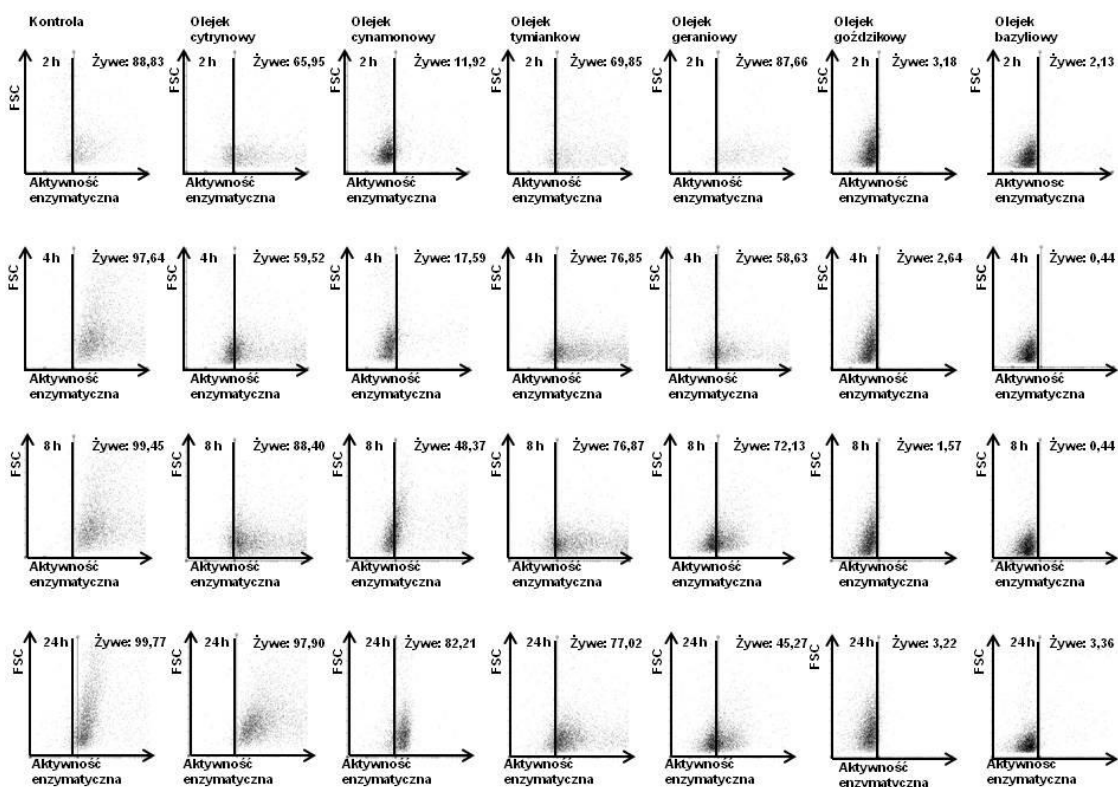
Kinetykę efektu grzybobójczego olejków eterycznych analizowano stosując metodę cytometrii przepływowej oraz test „time kill assay”. W pierwszej z tych metod, komórki inkubowane z badanym związkiem przez określony czas wybarwiano barwnikiem FDA (dioctan fluoresceiny). Barwnik ten pozwala na selektywne wybarwienie komórek żywych, wykazujących aktywność metaboliczną. Pod wpływem wewnątrzkomórkowych esteraz z FDA powstaje fluoresceina wykazująca po wzbudzeniu światłem odpowiedniej długości zieloną fluorescencję, mierzoną przy użyciu cytometru. Druga metoda polega na wykonaniu odpowiednich rozcieńczeń zawiesin komórkowych inkubowanych uprzednio przez określony czas z badanym

związkiem oraz kontroli, a następnie wykonaniu posiewów i zliczeniu liczby kolonii na płytkach wyrosłych po 24 h inkubacji.

### 3.2.3.1. Fluorescencyjna cytometria przepływowa

Wyniki eksperymentu, w którym badano kinetykę efektu grzybobójczego metodą cytometrii przepływowej przedstawiono na wykresie 3.13. Na wykresach tych oś odciętych oznacza poziom zielonej fluorescencji, a oś rzędnych boczne rozproszenie światła. Dodatkowa linia pionowa na wykresie to dyskryminator, którego pozycja wyznaczona jest na podstawie wykresów uzyskanych dla kontroli po określonych czasach. Dzieli on zbiór punktów na wykresie na dwie populacje; po prawej stronie od dyskryminatora komórki wykazują wysoki poziom fluorescencji, czyli uznawane są za żywe, a po lewej stronie wykazują niski poziom fluorescencji, a więc w eksperymencie uznane za martwe.

W największym stopniu widać wpływ olejków bazyliowego i goździkowego, które już po 2 h inkubacji spowodowały śmierć niemalże wszystkich komórek w zawiesinie. Olejek geraniowy w zastosowanym stężeniu pozwolił na redukcję liczby żywych komórek do połowy (po 24 h w zawiesinie wciąż obecne było około 45% żywych komórek) (Tabela 3. 11). Olejki cynamonowy i tymiankowy zastosowane były w najniższych stężeniach, przez co pozornie ich aktywność wydaje się najmniejsza. Wskazuje to jednocześnie, że w tego typu eksperymentach kluczowy jest dobór odpowiedniego stężenia związku aktywnego. Dla olejku cynamonowego, który we wcześniejszych eksperymentach został scharakteryzowany jako najaktywniejszy, spadek liczby żywych komórek nie był tak radykalny, jakiego można było się spodziewać. Prawdopodobnie wynikało to zastosowania zbyt niskiego stężenia, dlatego zostało on zmodyfikowane w eksperymencie „time kill assay”. Dodatkowo, w przypadku olejku cynamonowego widać ciekawe zjawisko. Po 2 h inkubacji przy stężeniu olejku wynoszącym 0,004%, nastąpił spadek liczby żywych komórek o blisko 90%, pozostawiając niewielką populację komórek opornych. W trakcie dalszej inkubacji, z grupy tej odrodziła się populacja, w której po 24 h ponad 80% stanowiły komórki żywe. Przy zastosowaniu stężenia czterokrotnie wyższego w teście „time kill assay” (opis znajduje się w kolejnym podrozdziale) zjawiska tego nie zaobserwowano.



**Wyk. 3. 13.** Przeżywalność komórek *C. albicans* ATCC 10231 w czasie inkubacji z olejkami eterycznymi.

Oś odciętych wskazuje poziom fluorescencji, oś rzędnych boczne rozproszenie światła. Zastosowane stężenia olejków: tymiankowy – 0,04%, cytrynowy 0,16%, geraniowy – 0,16%, cynamonowy – 0,004%, bazyliowy 0,16%, goździkowy – 0,625%

**Tabela 3. 11.** Procentowa zawartość żywych komórek *C. albicans* ATCC 10231 w hodowli traktowanej wybranym olejkami eterycznymi przez określony czas

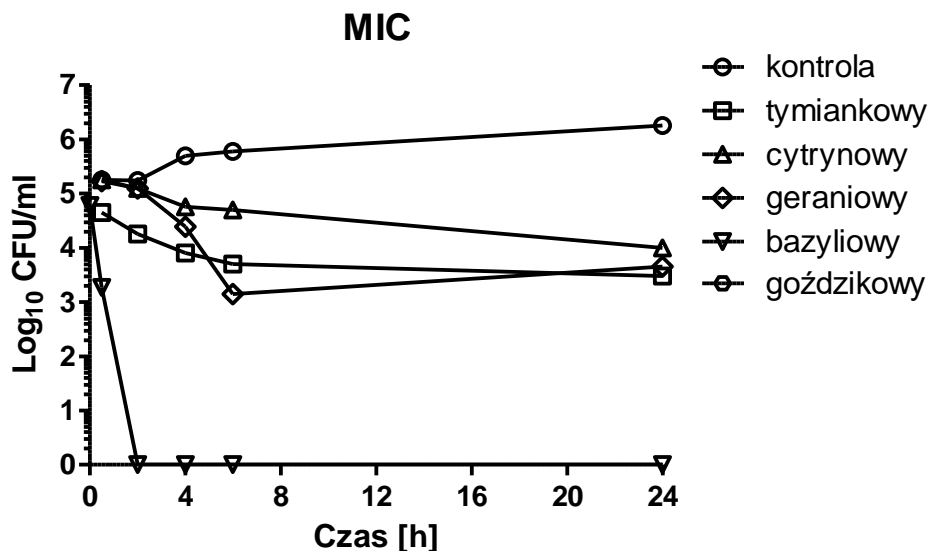
Olejek/Czas [h]	2	4	8	24
Kontrola	88,83	97,64	99,45	99,77
Geraniowy	87,66	58,63	72,13	45,27
Tymiankowy	69,85	76,85	76,87	72,02
Cytrynowy	65,95	59,52	88,4	97,9
Cynamonowy	11,92	17,59	48,37	82,21
Goździkowy	3,18	2,64	1,57	3,22
Bazyliowy	2,13	0,44	0,44	3,36

### 3.2.3.2. „Time kill assay”

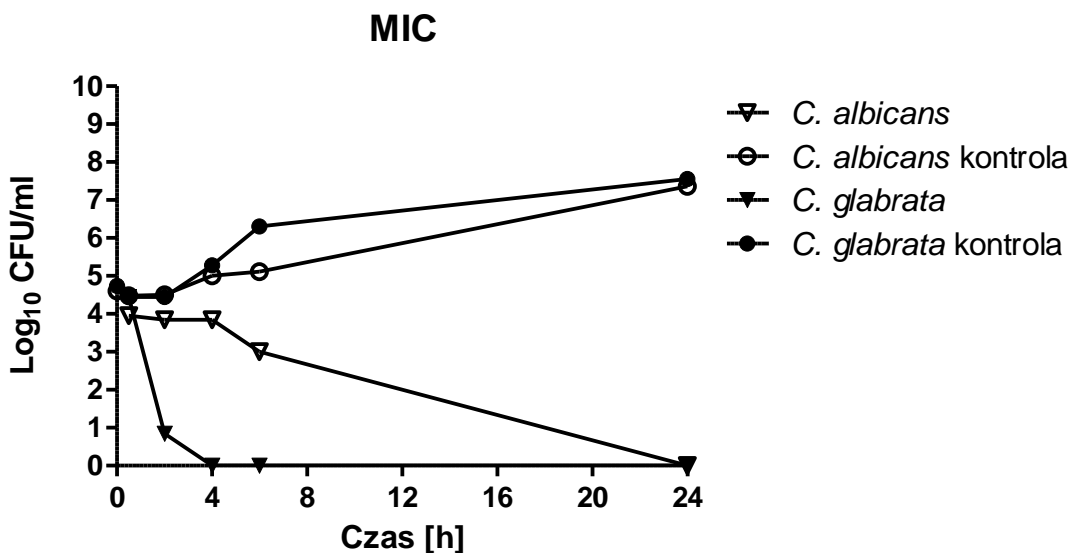
Na Wyk. 3. 14 przedstawiono „krzywe śmierci” uzyskane dla olejków tymiankowego, cytrynowego, geraniowego, bazyliowego oraz goździkowego. Inkubacja inokulum z olejkami w znaczący sposób redukowała liczbę komórek już po 2 - 6 h, a po 24 h redukcja ta była większa niż dwa rzędy wartości. Najlepiej widać oddziaływanie olejku bazyliowego, który po 2 h inkubacji zredukował liczbę CFU praktycznie do zera. Dla najbardziej aktywnego olejku, czyli



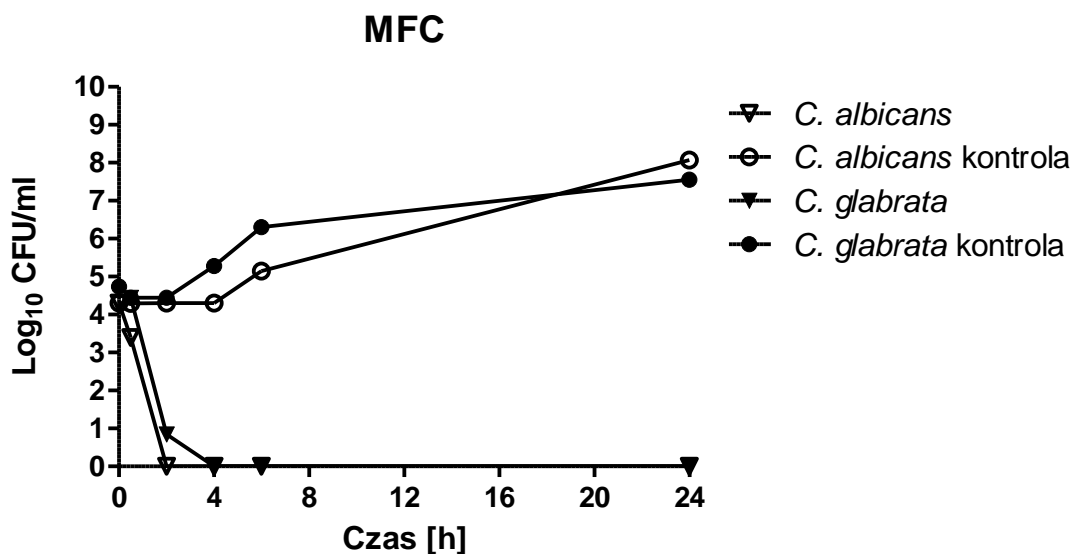
cynamonowego wykonano osobną analizę przy zastosowaniu stężeń  $1 \times \text{MIC}$  i  $1 \times \text{MFC}$ . Znaczącą redukcję liczby żywych komórek, podobnie jak w przypadku pozostałych olejków, widać było po 2 – 6 h, a po 24 h liczba ta spadła do zera. Przy zastosowaniu stężenia MFC całkowita redukcja żywych komórek występował po 2 lub 4 h.



**Wyk. 3. 14.** Krzywa śmierci 5 testowanych olejków eterycznych przy zastosowaniu stężenia równego  $1 \times \text{MIC}$  wobec szczepu *C. albicans* ATCC 10231 (tymiankowy – 0,04%, cytrynowy 0,16%, geraniowy – 0,16%, bazyliowy 0,16%, goździkowy – 0,625%)



**Wyk. 3. 15.** Krzywa śmierci dla olejku cynamonowego przy zastosowaniu stężenia równego  $1 \times \text{MIC}$  (0,016% (v/v)) wobec szczepów *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226



**Wyk. 3. 16.** Krzywa śmierci dla olejku cynamonowego przy zastosowaniu stężenia równego  $1 \times$  MFC (0,031% (v/v)) wobec szczepów *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226

### 3.2.4. Aktywność ekstraktów etanolowych propolisów

Wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów propolisów pszczelich jest znana, jednakże większość danych literaturowych na ten temat dotyczy aktywności przeciwbakteryjnej. W naszym zespole badawczym postanowiliśmy sprawdzić czy równie dobre aktywności wykazują one wobec drożdżaków z rodzaju *Candida*.

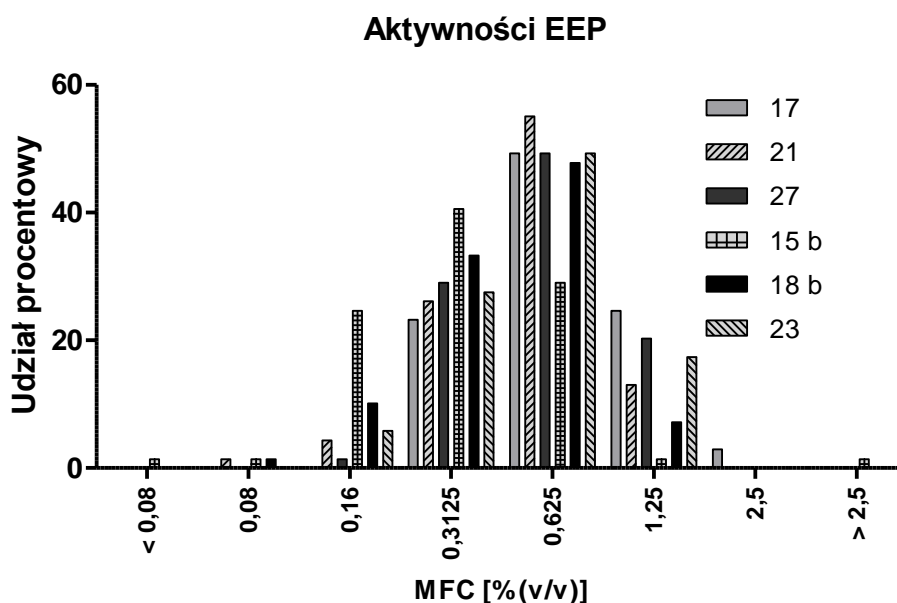
W badaniach wstępnych przetestowano aktywność 50 propolisów pszczelich, pozyskanych z pasiek na terenie Polski Północnej. Otrzymano ekstrakty etanolowe tych preparatów (EEP) wg procedury opisanej w p. 2.9. i wyznaczono wartości MFC wobec szczepów referencyjnych z rodzaju *Candida* (Tabela 3. 12). Kontrole aktywności rozpuszczalnika przeprowadzono na szczepach referencyjnych *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226, w których zamiast EEP zastosowano etanol. Wykazały one, że stężenie 10% nie powoduje zahamowania wzrostu gatunku *C. glabrata*, natomiast wartość MIC dla gatunku *C. albicans* wynosi właśnie 10%.

**Tabela 3. 12.** Aktywność EEP wobec wybranych szczepów referencyjnych z rodzaju *Candida*

MFC (% v/v)	Szczep referencyjny						Suma
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. glabrata</i> DSM 11226	B3	B4	Gu4	Gu5	
> 2,5	7	19	9	15	5	15	70
2,5	8	5	10	4	10	5	42
1,25	12	14	9	7	10	8	60
0,625	15	9	17	22	19	21	103
0,3125	8	3	5	2	6	1	25
Liczba testowanych EEP	50	50	50	50	50	50	300

Ze względu na charakter ekstraktów propolisów, które w kontakcie z pożywką stają się bardzo mętne i „ciągnące”, co utrudnia wyznaczenie wartości MIC, za miarę aktywności przyjęto wartości MFC. Następnie wytypowano spośród nich 6 najbardziej aktywnych preparatów oznaczonych numerami 17, 21, 27, 15 b, 18 b i 23 i wyznaczono wartości MFC wobec 69 izolatów klinicznych *C. albicans*. Podsumowanie wyników tego eksperymentu przedstawiono na Wyk. 3. 17.

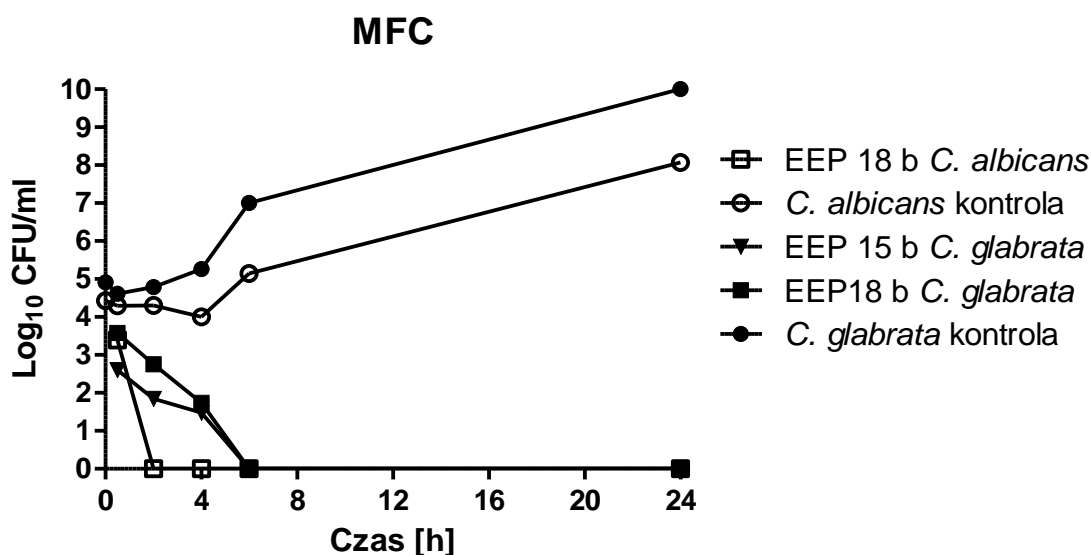
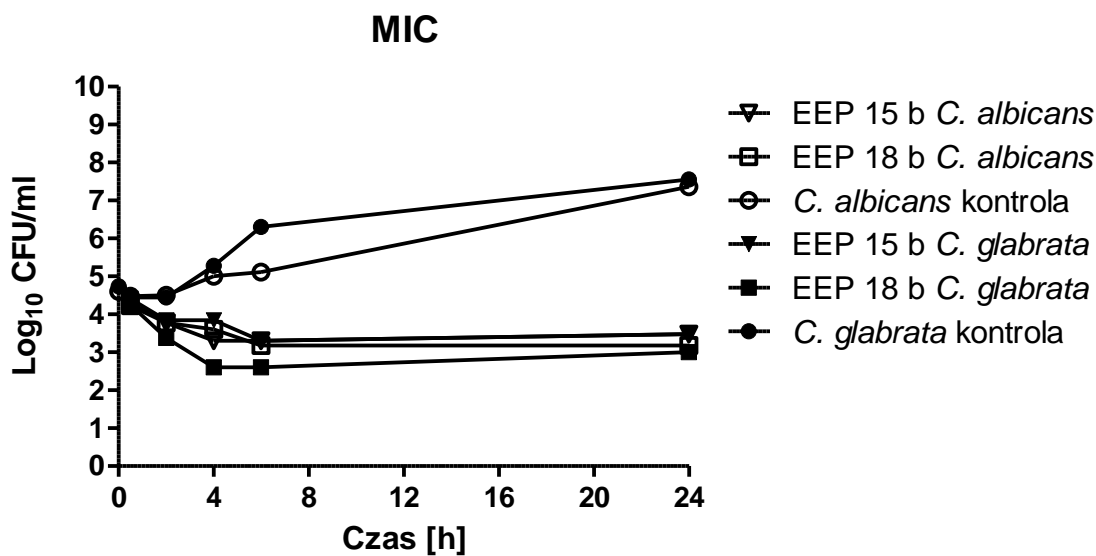
Wartości te dla wszystkich EEP wobec znakomitej większości szczepów były mniejsze lub równe 1,25% (v/v), a wobec większości szczepów wynosiły 0,3125% lub 0,625% (v/v). Najbardziej aktywny był preparat oznaczony jako 15 b, dla którego wyznaczono największy udział procentowy wartości MFC równej 0,16% (v/v) w porównaniu do innych preparatów (ponad 20% izolatów), a dla około 40% izolatów MFC wynosiło 0,3125% (v/v) (Wyk. 3. 17).



**Wyk. 3. 17.** Aktywność sześciu ekstraktów etanolowych propolisów pszczelich wyznaczona wobec grupy 69 izolatów *C. albicans*

### 3.2.5. Wpływ ekstraktów propolisu na kinetykę wzrostu drobnoustrojów

Przy ocenie kinetyki wzrostu zastosowano metodę „time kill assay”. Krzywe otrzymane dla dwóch najbardziej aktywnych EEP w stosunku do szczepów *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226 przedstawione są na wykresach 3.18. Zastosowane w eksperymencie stężenia odpowiadały wartościom MIC (0,16% i 0,3125% dla EEP 15 b i EEP 18 b odpowiednio wobec obydwu gatunków) oraz MFC (0,625% dla EEP 15 i EEP 18). Po zastosowaniu stężenia EEP odpowiadającego wartości MIC liczba komórek została zredukowana o 2-3 rzędy w skali  $\text{Log}_{10}$  w porównaniu do kontroli w czasie pomiędzy 4 - 6 h, natomiast po zastosowaniu stężenia odpowiadającego MFC liczba komórek spadła do zera w przedziale czasowym 2 – 6 h.



**Wyk. 3. 18.** Krzywe śmierci dla izolatów *C. albicans* ATCC 10231 i *C. glabrata* DSM 11226 uzyskane z zastosowanie dwóch wybranych EEP (MIC EEP 15 b 0,16%, EEP 18 b 0,3125% - tak samo dla obydwu gatunków, MFC 0,625% we wszystkich przypadkach)

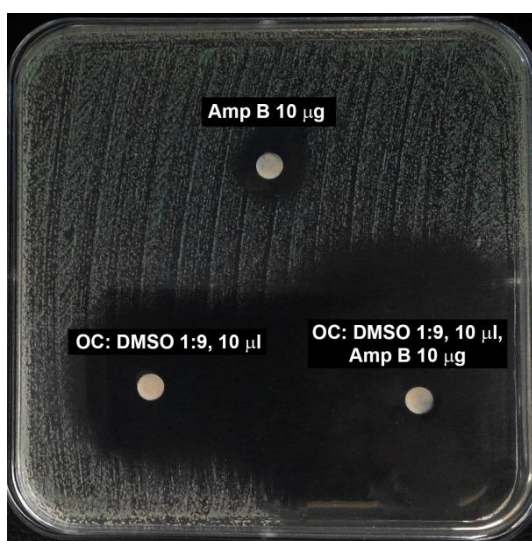
#### 3.2.6. Badanie działania kombinacji leków przeciwgrzybiczych z produktami pochodzenia naturalnego

Synergizm jest zjawiskiem wzajemnego wzmocnienia działania kilku substancji, gdy występują razem w jednym środowisku. Poszukiwania możliwości synergistycznego oddziaływania pomiędzy dwoma związkami ma duże znaczenie, gdyż ewentualny pozytywny efekt pozwoliłby na typowanie par substancji, które stosowane jednocześnie, wywołują lepszy

efekt terapeutyczny niż po zastosowaniu tych samych związków osobno. Do badań synergizmu zastosowano dwie metody: dyfuzyjno-krażkową oraz tzw. metodę checkerboard. Pierwsza z nich jest prostsza i pozwala na uzyskanie wyniku jakościowego, a przez to szybsze wytypowanie możliwości istnienia ewentualnego synergizmu. Za pomocą drugiej wspomnianej metody można dokładnie wyznaczyć przy jakich stężeniach obydwu zastosowanych związków obserwuje się największy efekt wzmocnionego działania.

#### 3.2.6.1. Określanie efektu skojarzonego działania metodą dyfuzyjno-krażkową

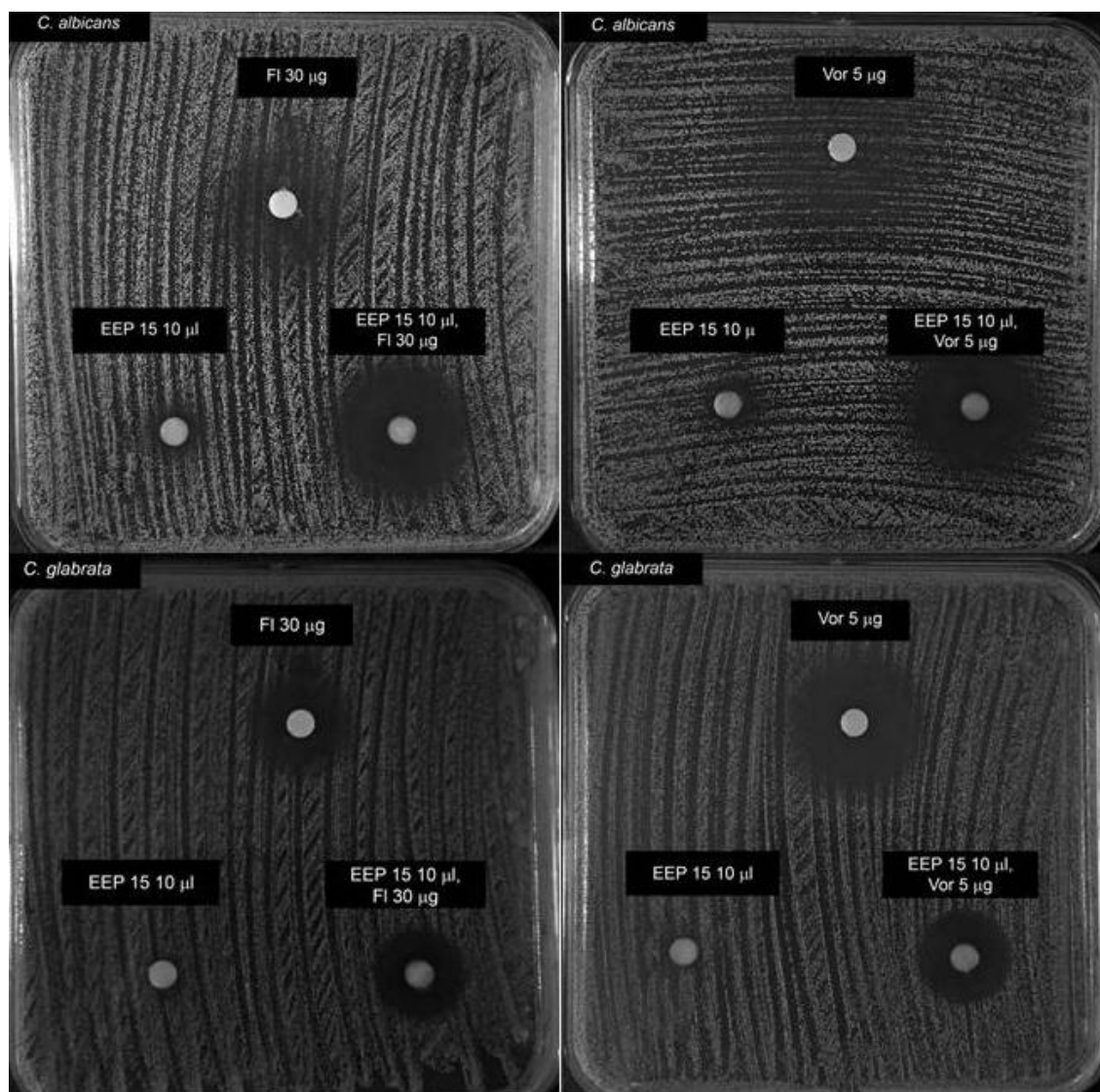
W badaniach z zastosowaniem metody dyfuzyjno-krażkowej przetestowano liczne kombinacje; każdy z wytypowanych olejków o największej aktywności (tymiankowy, cytrynowy, geraniowy, cynamonowy, bazyliowy i goździkowy) z każdym lekiem przeciwgrzybowym z grupy: flukonazol, worykonazol, 5-fluorocytozyna, kaspofungina oraz amfoterycyna B oraz wybrane preparaty EEP z każdym z wymienionych leków. Na podstawie przeprowadzonych testów nie udało się stwierdzić występowania synergizmu pomiędzy większością olejków a zastosowanymi lekami. Jedyny przypadek, gdzie odnotowano występowanie wzmocnionego wzajemnego działania dotyczył jednoczesnego zastosowania amfoterycyny B z rozcieńczonym dziesięciokrotnie (w DMSO) olejkiem cynamonowym (Fot. 3. 4).



**Fot. 3. 4.** Synergistyczne działanie amfoterycyny B (Amp B) wraz z rozcieńczonym olejkiem cynamonowym (OC) wobec szczepu referencyjnego *C. albicans* ATCC 10231

Ciekawy efekt uzyskano także przy jednoczesnym zastosowaniu leków z grupy azoli (flukonazolu i worykonazolu) z wybranymi EEP. Obydwa związki aplikowane były jednocześnie na jałowy krążek umieszczony na podłożu z wybranym szczepem. Dodatek EEP powodował eliminację zjawiska tzw. „ogonowania”, charakterystycznego dla gatunku *C. albicans*, pojawiającego się przede wszystkim przy stosowaniu leków z grupy azoli (Fot. 3. 5). Polega ono na tym, że pewna część komórek wykazuje wzrost nawet przy wysokich stężeniach zastosowanego leku, a przez to może się stać źródłem mikroorganizmów opornych i powodować trudności w terapii. Na przedstawionych zdjęciach widać wyraźnie zjawisko

„ogonowania”, pojawiające się wokół krążków z flukonazolem i worykonazolem na płytkach ze wzrostem *C. albicans* (wobec gatunku *C. glabrata* zjawisko to nie występuje lub w mniejszym stopniu, przedstawiono zdjęcia dla porównania). Wokół krążków pojawia się strefa ograniczonego wzrostu mikroorganizmów. Aktywność EEP 15 b w zastosowanym stężeniu była niewielka, natomiast gdy obydwie preparaty zastosowano jednocześnie, wokół krążków pojawiała się wyraźna, duża strefa zahamowania wzrostu.

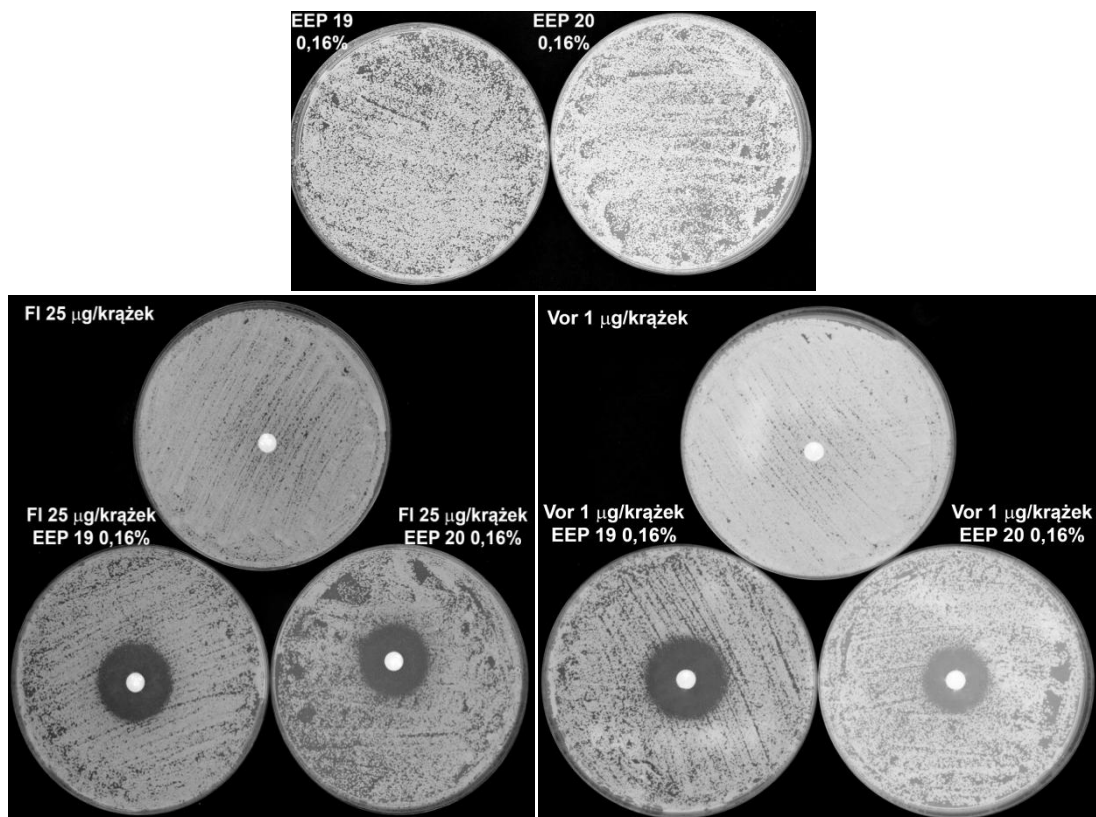


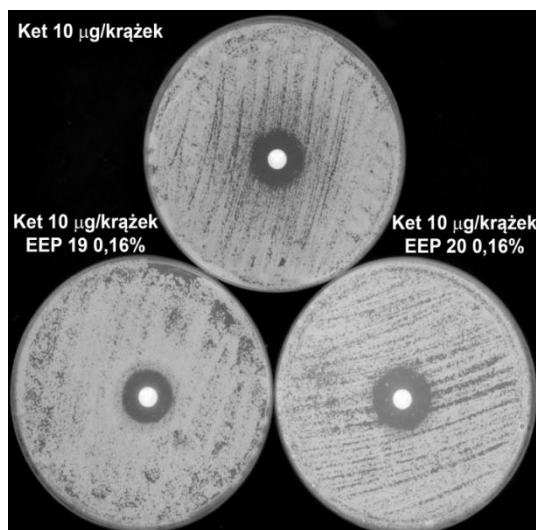
**Fot. 3. 5.** Synergizmu flukonazolu i worykonazolu z EEP 15 b wobec *C. albicans* ATCC 10231 oraz *C. glabrata* DSM 11226

Fl – flukonazol; Vor - worykonazol

Synergizm ekstraktów etanolowych propolisów z lekami z grupy azoli potwierdzono również dla innych ekstraktów propolisów wobec izolatu klinicznego opornego na flukonazol. W testach zastosowano nieznacznie zmienioną metodę dyfuzyjno-krążkową. Modyfikacja polegała na tym, że EEP (nr 19 i 20) dodawano do stygnącego agaru do końcowego stężenia wynoszącego szacunkowo  $\frac{1}{4}$  -  $\frac{1}{2} \times$  MIC. Po wykonaniu posiewów na płytkach, układano gotowe do użytku krążki z lekami (Oxoid). Testy wykazały, że w podłożach agarowych bez dodatku

EEP flukonazol (FI 25 µg/krażek) podobnie jak worykonazol (Vor 1 µg/krażek) nie powodują zahamowania wzrostu. Dalsze zwiększanie stężenia flukonazolu (100 µg/krażek) również nie przejawiało się pojawieniem się strefy zahamowania wzrostu, natomiast wyraźny efekt hamowania uzyskano przez dodatek do podłoża EEP w stężeniu 0,16% (v/v). Inny lek z grupy azoli, ketokonazol (Ket 10 µg/krażek) wykazywał aktywność wobec szczepu *C. albicans* w pojedynkę, natomiast nie powodował wzmocnionego efektu w połączeniu z EEP (Fot. 3.6). Występowanie synergizmu z flukonazolem i worykonazolem potwierdzono także dla innych preparatów EEP.





**Fot. 3. 6.** Synergizm EEP i azoli wobec izolatu klinicznego *C. albicans* opornego na flukonazol. Ekstrakty propolisu dodawane były do podłoża YPD w stężeniu 0,16%. Płytki zaszczerpiono  $10^5$  komórek i inkubowano (24 h, 37<sup>0</sup>C).

FI – flukonazol; Vor – worykonazol; Ket - ketokonazol

### 3.2.6.2. Badanie efektu skojarzonego działania metodą checkerboard

Synergizm będący efektem skojarzonego działania flukonazolu i worykonazolu z EEP potwierdzono metodą checkerboard stosując izolat kliniczny nr 7 wyizolowany od pacjenta ze szpitala we Wrocławiu, oporny krzyżowo na leki z grupy azoli. W celu stwierdzenia istnienia synergizmu wyznaczano parametr  $\Sigma$  FIC (Tabela 3. 13 i Tabela 3. 14). Jego wartość poniżej 0,5 oznacza oddziaływanie synergistyczne. Ze względu na to, że dla EEP wyznaczano wartość MIC<sub>90</sub>, w przypadku azoli również posłużono się tą wartością (zamiast MIC<sub>50</sub>). MIC<sub>90</sub> dla worykonazolu wyznaczono jako 32 µg/ml. Dodatek EEP w stężeniu 0,005% (v/v) pozwolił na zmniejszenie tego stężenia ośmiokrotnie (Tabela 3. 13). Dla flukonazolu MIC<sub>90</sub> wynosił przynajmniej 512 µg/ml (powyżej skali w zakresie 256-1 µg/ml). Dodatek EEP w stężeniu 0,01% (v/v) pozwolił na obniżenie tej wartości 16-krotnie (Tabela 3. 14).

**Tabela 3. 13.** Interakcje zależne od stężenia pomiędzy worykonazolem (Vor) a EEP 18 a wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole. Rezultaty uzyskane metodą checkerboard

MIC samego związku		MIC w kombinacji		FIC leku	FIC EEP	$\Sigma$ FIC	Interakcja*
Vor [µg/ml]	EEP 18 a [% v/v]	Vor [µg/ml]	EEP 18 a [% v/v]				
32	0,08	8	0,00125	0,25	0,02	0,27	S
		8	0,0025	0,25	0,03	0,28	S
		4	0,005	0,13	0,06	0,19	S
		4	0,01	0,13	0,13	0,25	S
		4	0,02	0,13	0,25	0,38	S
		0,125	0,04	0,00	0,50	0,50	I
		0,125	0,08	0,00	1,00	1,00	I

\*S - synergizm, I – oddziaływanie obojętne



**Tabela 3. 14.** Interakcje zależne od stężenia pomiędzy flukonazolem (FI) a EEP 18 a wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole. Rezultaty uzyskane metodą checkerboard

MIC samego związku		MIC w kombinacji		FIC leku	FIC EEP	Σ FIC	Interakcja*
FI [µg/ml]	EEP 18 a [% v/v]	FI [µg/ml]	EEP 18 a [% v/v]				
> 256	0,08	256	0,00125	0,50	0,02	0,52	I
		128	0,0025	0,25	0,03	0,28	S
		64	0,005	0,13	0,06	0,19	S
		32	0,01	0,06	0,13	0,19	S
		32	0,02	0,06	0,25	0,31	S
		32	0,04	0,06	0,50	0,56	I
		1	0,08	0,00	1,00	1,00	I

Efekt skojarzonego działania określano również inną metodą, w płytkach 96-dołkowych, w których w czterech kolejnych rzędach zastosowano gradient leku (dla flukonazolu 512 – 1 µg/ml, dla worykonazolu 8 – 0,015 µg/ml) oraz stałe stężenia EEP (0% w pierwszym rzędzie, 0,01% w drugim, 0,02% w trzecim, 0,04% (v/v) w czwartym). Uzyskane wyniki wskazały, że dodatek EEP w stężeniu 0,02% (v/v) pozwolił na obniżenie wartości MIC dla flukonazolu nawet 256-krotnie, a worykonazolu 32-krotnie (Tabela 3. 15).

**Tabela 3. 15.** Synergizm EEP 18 a z flukonazolem (FI) bądź worykonazolem (Vor) wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole

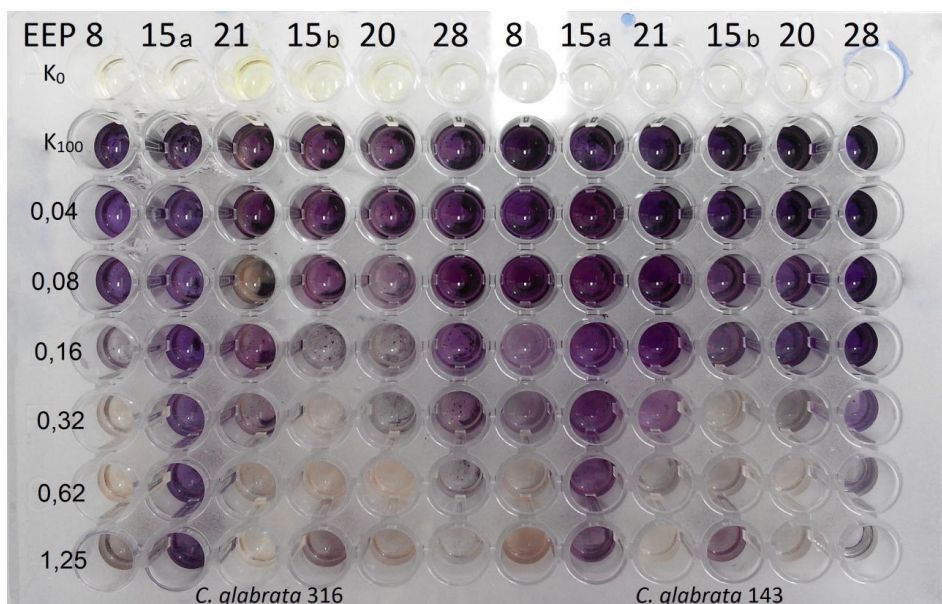
EEP 18 a [% (v/v)]	MIC <sub>90</sub> [µg/ml]	
	FI	Vor
0	> 512	> 8
0,01	128	16
0,02	4	0.5
0,04	4	0.5

### 3.2.7. Efektywność eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych przez EEP

Intensywność tworzenia biofilmu zależy od gatunku mikroorganizmu a nawet od podatności konkretnego izolatu. W badaniach, których wyniki opisano w tym podrozdziale, określano wartości MBEC<sub>50</sub>, tzn. stężenie, które powoduje zahamowanie aktywności enzymatycznej komórek w biofilmie o 50%. W tym celu zastosowano analizę MTT (*ang.* MTT assay). Jest to test kolorymetryczny mierzący redukcję żółtego MTT przez enzymy mitochondrialne takie jak dehydrogenaza bursztynianowa. MTT wchodzi do komórek i przechodzi do mitochondriów, gdzie jest redukowany do nierozpuszczalnego, ciemnofioletowego formazanu (Fot. 3. 7). Produkt ten rozpuszcza się następnie w rozpuszczalniku organicznym (np. izopropanolu), a intensywność zabarwienia powstałego roztworu jest mierzona spektrofotometrycznie. Ponieważ redukcja MTT może wystąpić tylko w metabolicznie aktywnych komórkach, poziom aktywności jest miarą żywotności komórek.

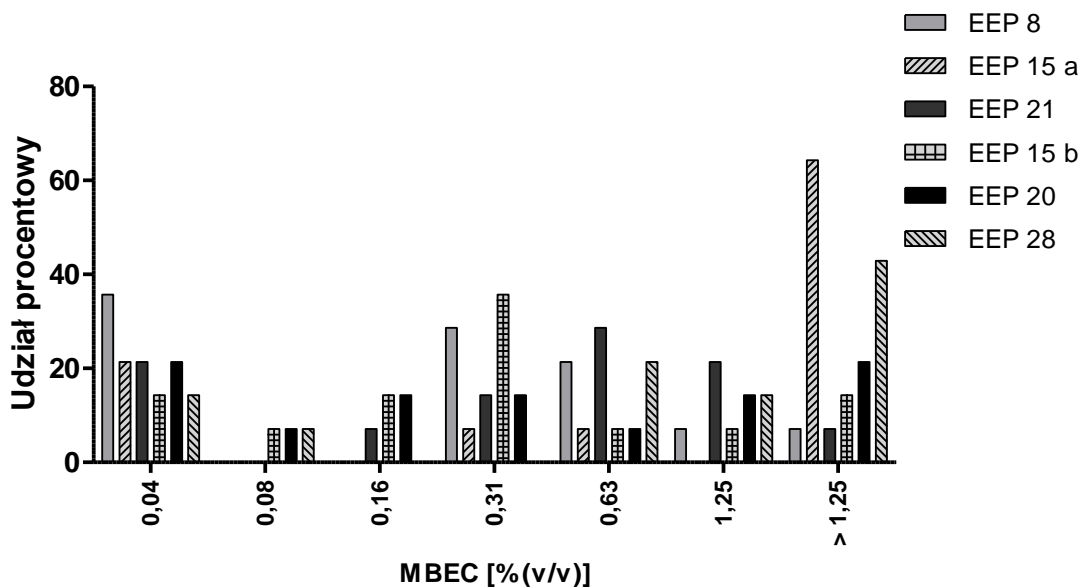
W doświadczeniu wyznaczono wartości MBEC<sub>50</sub> dla 14 izolatów klinicznych *C. albicans*, 10 *C. glabrata* oraz 10 *C. krusei*. Największą zdolność do tworzenia biofilmu wykazywał gatunek *C. krusei* a następnie *C. glabrata*. *C. albicans* charakteryzował się mniejszą zdolnością

tworzenia biofilmu, a pojedyncze izolaty nie tworzyły go wcale. Badaniom poddano wyselekcjonowane EEP.

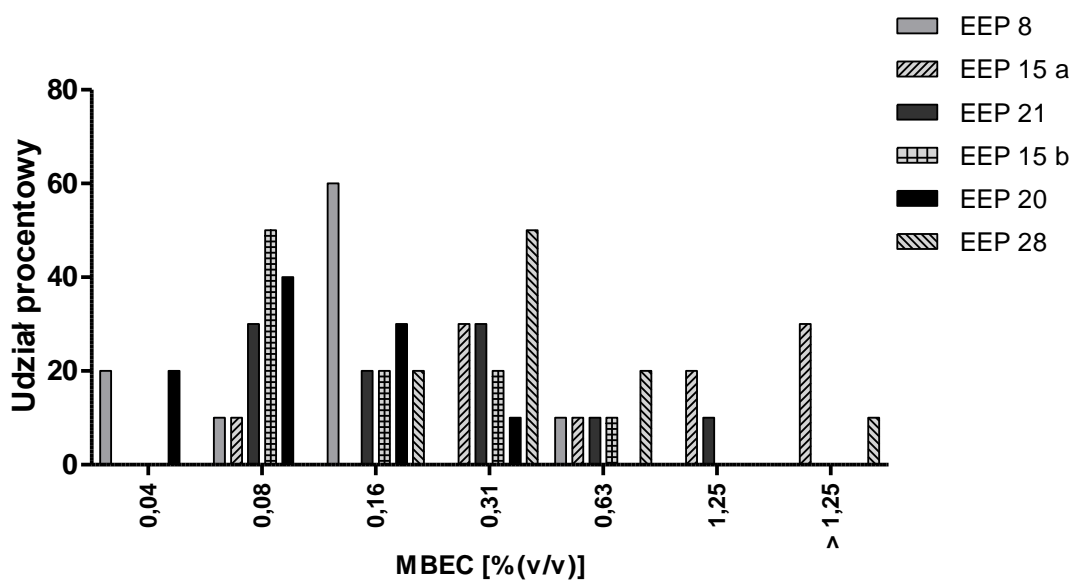


**Fot. 3. 7.** Wpływ ekstraktów propolisów w stężeniach 0,04 – 1,25% (v/v) na eradykację biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych. K<sub>0</sub> oznacza kontrolę podłoża, K<sub>100</sub> kontrolę wzrostu samych komórek nietraktowanych EEP

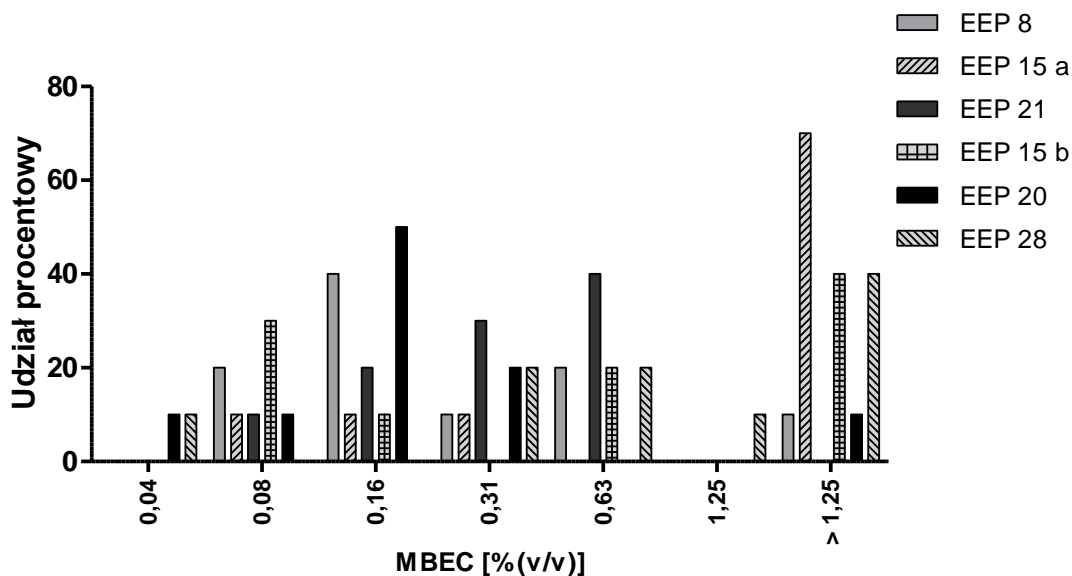
Zakres testowanych stężeń EEP wynosił 0,04 – 1,25% (v/v). Zdecydowanie największą aktywność w eradykacji biofilmu posiadał EEP 15 b, natomiast najniższą efektywność wykazywał EEP 15 a. Dobre aktywności wykazywały także EEP z numerami 8 i 20. Najtrudniejszy do eradykacji był biofilm utworzony przez *C. krusei*, przykładowo dla najaktywniejszego EEP 15 b wartość MBEC<sub>50</sub> w 40% przypadków wynosiła > 1,25% (v/v), dla porównania w przypadku *C. glabrata* stężenie 0,625% (v/v) było wystarczające do obniżenia aktywności metabolicznej o 50% wszystkich testowanych izolatów. Wykresy 3.19 - 3.21 przedstawiają jaki procent izolatów w badanej grupie charakteryzował się konkretną wartością MBEC<sub>50</sub>. Kontrole rozpuszczalnika wykonane z dodatkiem etanolu zamiast EEP wykazały, że stężenie wynoszące 10% nie wywołuje żadnych zmian w intensywności formowanego biofilmu w porównaniu do kontroli wzrostu.



Wyk. 3. 19. Wartości MBEC<sub>50</sub> przy eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych za pomocą sześciu różnych EEP w grupie 14 izolatów klinicznych *C. albicans*



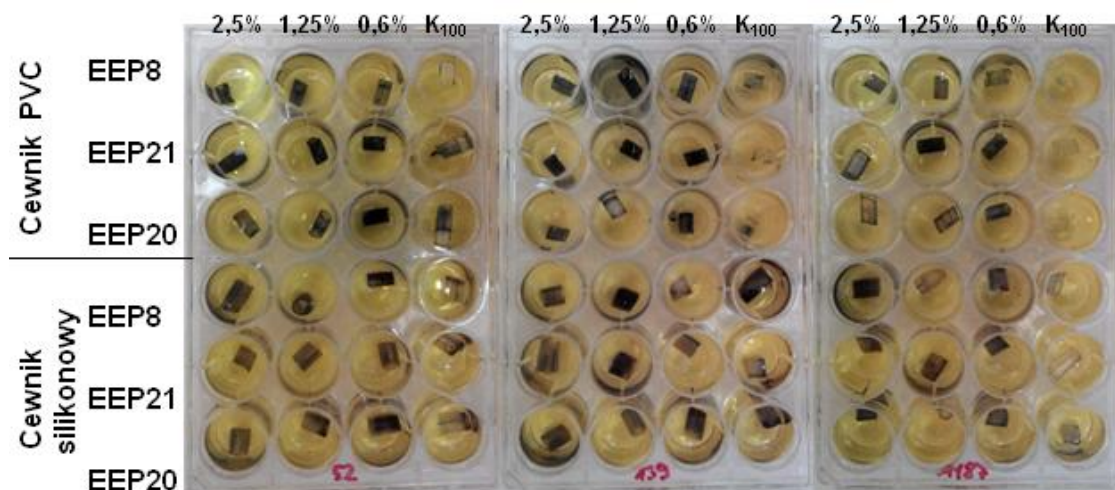
Wyk. 3. 20. Wartości MBEC<sub>50</sub> przy eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych za pomocą sześciu różnych EEP w grupie 10 izolatów klinicznych *C. glabrata*



Wyk. 3. 21. Wartości MBEC<sub>50</sub> przy eradykacji biofilmu z powierzchni płytek polistyrenowych za pomocą sześciu różnych EEP w grupie 10 izolatów klinicznych *C. krusei*

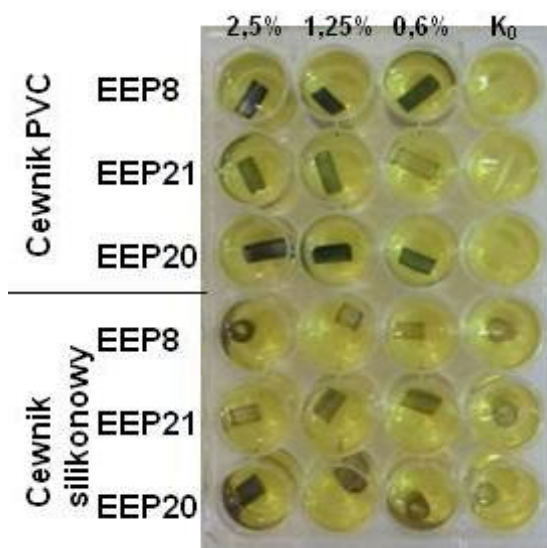
### 3.2.8. Efektywność eradykacji biofilmu z powierzchni cewników silikonowych oraz PVC

Eradykację biofilmu z powierzchni cewników medycznych testowano na 9 izolatach klinicznych (3 *C. albicans*, 3 *C. glabrata*, 3 *C. krusei*). Wszystkie badane szczepy wykazały wyższą zdolność tworzenia biofilmu na powierzchni cewników silikonowych. Aktywność EEP porównywano również do aktywności leków przeciwgrzybiczych: flukonazolu, kaspofunginy oraz amfoterycyny B. Flukonazol w zakresie stężeń 512 – 128 µg/ml był całkowicie nieefektywny. Kaspofungina w stężeniach 8 – 2 µg/ml pozwoliła na eradykację biofilmu z powierzchni PVC, natomiast nie działała na powierzchniach silikonowych. Podobne wyniki uzyskano dla amfoterycyny B (zakres stężeń 8 – 2 µg/ml, MBEC<sub>50</sub> dla PVC wynosiły 4 µg/ml dla *C. albicans* i *C. glabrata* oraz > 8 µg/ml dla *C. krusei*, a w przypadku cewników silikonowych dla wszystkich gatunków > 8 µg/ml). Świadczy to o tym, że biofilm nie tylko najłatwiej tworzy się na powierzchniach silikonowych lecz jest z nich także trudniejszy do usunięcia. Pierwsze wyniki badań z zastosowaniem EEP wykazały, że EEP są niezdolne do eradykacji biofilmu w zakresie stężeń 2,5-0,625% (v/v) (Fot. 3. 8).



**Fot. 3. 8.** Wpływ EEP na eradykację biofilmu utworzonego przez 3 izolaty *C. albicans* na powierzchniach cewników PVC i silikonowych. EEP były testowane w stężeniach 2,5 – 0,625% (v/v). K<sub>100</sub> oznacza kontrolę wzrostu nietraktowaną EEP. Na zdjęciu widać, że izolat 1187 w kontroli wzrostu tworzy bardzo słabą strukturę biofilmu na obydwu typach materiału.

Jednak pewne wątpliwości budziły obserwacje cewników, na których w kontroli wzrostu nie tworzył się biofilm, a po traktowaniu propolisami na fragmentach widać było fioletowe zabarwienie. Dlatego wykonano dodatkowy eksperyment w sposób analogiczny do powyższego, jednak bez dodatku komórek (Fot. 3. 9).



**Fot. 3. 9.** Produkt interakcji MTT z roztworami propolisów w stężeniach 2,5 - 0,625% (v/v) bez dodatku komórek. K<sub>0</sub> oznacza kontrolę nietraktowaną EEP

Okazało się, że w wyniku reakcji MTT z roztworami propolisów na cewnikach tworzy się produkt podobny do tego wytwarzanego przez żywe komórki obecne w strukturze biofilmu. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska jest obecność w propolisie śladowych ilości enzymów dehydrogenazy bursztynianowej, glukozy-6-fosfatazy, trifosfatazy adenozynowej i fosfatazy kwaśnej pochodzących bądź z gruczołów wydzielniczych pszczół bądź z pyłków roślin.

Kluczowe znaczenie wydaje się mieć dehydrogenaza bursztynianowa, która jest enzymem redukującym MTT, a przez to podstawą analizy w teście MTT.

W kolejnym etapie wykonano podobny eksperyment z zastosowaniem soli XTT. Okazało się, że w tym przypadku, po traktowaniu cewników samymi EEP, bez dodatku komórek, nie powstaje barwny produkt reakcji, dlatego metodę zastosowano do ewaluacji aktywności EEP w eradykacji biofilmu tworzonego na powierzchniach cewników medycznych. Uzyskane wyniki przedstawione są w Tabeli 3. 16.

**Tabela 3. 16.** Aktywność czterech EEP w eradykacji biofilmu utworzonego przez 3 gatunki *Candida* na powierzchniach cewników z PVC lub silikonu. Wyniki uzyskane metodą XTT

Izolat kliniczny	MBEC <sub>50</sub> wybranych EEP [% (v/v)]							
	Cewnik z PVC				Cewnik z silikonu			
	2	6	8	27	2	6	8	27
<i>C. albicans</i> 52	5	> 5	5	5	0,625	0,625	0,625	0,625
<i>C. albicans</i> 139	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>C. albicans</i> 1187	*	*	*	*	5	5	2,5	2,5
<i>C. glabrata</i> 137	1,25	0,625	1,25	1,25	*	0,625	0,625	2,5
<i>C. glabrata</i> 143	5	5	2,5	5	5	2,5	2,5	2,5
<i>C. glabrata</i> 342	0,625	1,25	0,625	0,625	0,625	> 5	0,625	2,5
<i>C. krusei</i> 2	5	5	5	1,25	2,5	2,5	2,5	1,25
<i>C. krusei</i> 35	2,5	5	5	5	5	1,25	1,25	1,25
<i>C. krusei</i> 59	2,5	5	5	5	5	2,5	2,5	1,25

\*słaba zdolność tworzenia biofilmu

Dwa z trzech izolatów klinicznych *C. albicans* odznaczały się bardzo niską zdolnością tworzenia biofilmu. Stężenia powodujące eradykację biofilmu mieściły się w zakresie 0,625 – 5% (v/v). W dwóch przypadkach wartość MBEC<sub>50</sub> przekraczała poza 5% (v/v). Najbardziej oporny okazał się biofilm utworzony przez *C. krusei*, natomiast najwyższą wrażliwość stwierdzono w przypadku izolatów *C. albicans*. Aktywność poszczególnych EEP była porównywalna (z nielicznymi wyjątkami np. wartość MBEC<sub>50</sub> dla EEP 6 i 8 różni się znacząco w przypadku biofilmu tworzonego przez izolat *C. glabrata* na cewniku silikonowym). Nie można natomiast wykazać korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą MTT i XTT. Dodatkowo biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku jednoczesnego stosowania MTT i EEP tworzy się fioletowy produkt dający fałszywie pozytywny wynik, wywnioskowano, że przy ocenie eradykacji biofilmu za pomocą ekstraktów propolisu absolutnie niezbędne jest korzystanie z metody XTT.

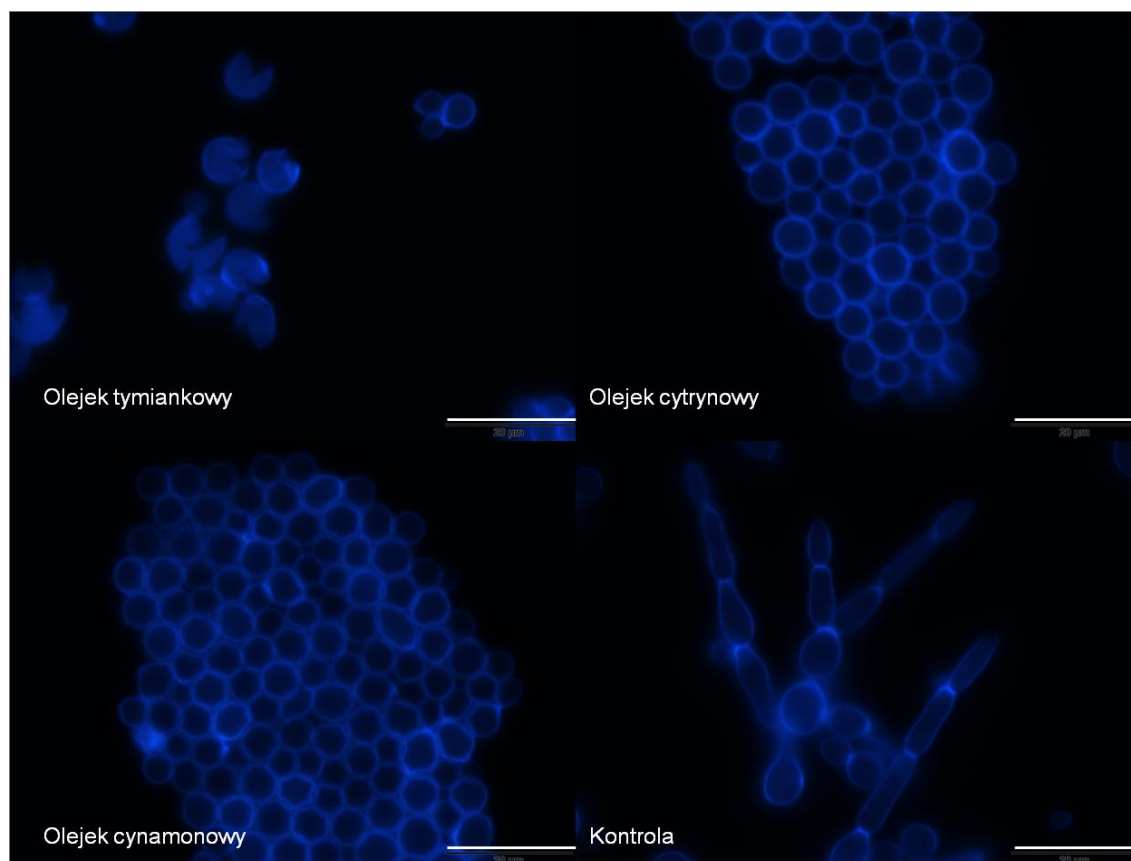
### **3.3. Badanie mechanizmów aktywności przeciwrzybowej produktów pochodzenia naturalnego**

#### **3.3.1. Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na ścianę komórkową**

##### **3.3.1.1. Obserwacje mikroskopowe**

Wpływ olejków na ścianę komórkową drożdżaków *C. albicans* określano za pomocą selektywnego wybarwienia tych struktur barwnikiem fluorescencyjnym i prowadzeniu obserwacji z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Odpowiednio przygotowane komórki

inkubowano z olejkami eterycznymi w stężeniu odpowiadającym wartości MIC, a następnie wybarwiano barwnikiem fluorescencyjnym Calcofluor White (CFW). CFW jest barwnikiem, który wiąże się silnie ze strukturami zawierającymi w swoim składzie celulozę obecną w komórkach roślinnych oraz chitynę występującą w dużych ilościach w ścianie komórkowej drożdży. Po związaniu barwnika z odpowiednią strukturą oraz wzbudzeniu światłem w zakresie UV, ściana komórkowa wykazuje charakterystyczną niebieską fluorescencję. Celem tego eksperymentu było określenie czy pod wpływem olejków eterycznych w ścianie komórkowej pojawiają się zmiany strukturalne. Testy przeprowadzono na szczepie referencyjnym *C. albicans* ATCC 10231 stosując olejki tymiankowy, cytrynowy oraz cynamonowy. Dodatkowo wykonano kontrolę komórek drożdży bez inkubacji z olejkiem. Preparaty mikroskopowe sporządzano po 2, 4, 24 i 48 h. Ze wzrostem czasu inkubacji w obecności olejku ilość komórek w polu widzenia mikroskopu była coraz mniejsza. Niewielkie zmiany strukturalne w ścianie komórkowej obserwowano dopiero po 48 h (Fot. 3. 10). Przykładowo dla olejku tymiankowego widoczne są częściowe uszkodzenia ścian, a w przypadku olejków cytrynowego oraz cynamonowego widać, że komórki mają zmieniony, nieregularny kształt, a ściana komórkowa wydaje się być „pomarszczona”. Przede wszystkim jednak zaobserwowano hamowanie tworzenia form mycelialnych, które dominują w kontroli.



**Fot. 3. 10.** Wpływ olejków eterycznych na ścianę komórkową *C. albicans* ATCC 10231 po 48 h inkubacji (biała linia odpowiada 20  $\mu\text{m}$ )

### 3.3.1.2. Wpływ obecności czynnika stabilizującego ciśnienie osmotyczne na efekt grzybostatyczny

W celu zbadania wpływu produktów naturalnych na ścianie komórkową, przeprowadzono test z sorbitolem. Ta pochodna sorbozy jest osmoprotektantem stosowanym m.in. do stabilizacji protoplastów grzybów. Działanie przeciwrzybicze specyficznych inhibitorów ściany komórkowej jest odwracane w podłożu zawierającym sorbitol, dlatego też komórki mogą rosnąć w obecności związków oddziałujących na ściany komórkowe, podczas gdy wzrost nie byłby możliwy w przypadku braku sorbitolu. Doświadczenie, którego wyniki opisano w tym podrozdziale polegało na porównaniu wartości MIC olejków eterycznych oraz propolisów w podłożach suplementowanych/niesuplementowanych sorbitolem. W przypadku działania olejku geraniowego i cytrynowego, wartości MIC pozostały praktycznie niezmienione. Dla olejku bazyliowego, wartość MIC w obecności sorbitolu wzrosła dwukrotnie wskazując, że olejek ten może mieć niewielki wpływ na ścianę komórkową. Ciekawe rezultaty otrzymano dla olejków tymiankowego, goździkowego, a w szczególności cynamonowego. We wszystkich przypadkach wartość MIC w obecności sorbitolu została obniżona (poza wynikiem uzyskanym dla olejku goździkowego wobec *C. glabrata*). Eksperyment powtarzano kilkakrotnie z zastosowaniem sorbitolu produkowanego przez różne firmy, a efekt był zawsze porównywalny. Kontrole bez dodatku produktów naturalnych wskazały, że sam sorbitol nie powoduje hamowania wzrostu oddziaływać na ścianę komórkową *C. albicans* oraz *C. glabrata* oraz olejku goździkowego na ścianę *C. glabrata* (Tabela 3. 17). Niemniej jednak wzrost wartości MIC nie był drastyczny, co wskazuje, że jest to raczej drugorzędny cel molekularny. Podobnie, w przypadku ekstraktów propolisu nie zaobserwowano, aby którykolwiek powodował podniesienie wartości MIC w podłożu suplementowanym sorbitolem (Tabela 3. 18).

**Tabela 3. 17.** Porównanie wartości MIC olejków eterycznych w podłożach suplementowanych bądź niesuplementowanych sorbitolem lub ergosterolem

Olejek	<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. glabrata</i> DSM 11226		
	RPMI	RPMI+sorbitol	RPMI+ergosterol	RPMI	RPMI+sorbitol	RPMI+ergosterol
tymiankowy	0,625	0,08	2,5	0,3125	0,16	1,25
cytrynowy	0,625	0,625	1,25	0,08	0,08	1,25
geraniowy	1,25	1,25	0,625	0,16	0,3125	1,25
cynamonowy	0,016	bw	0,016	0,031	0,002	0,031
bazyliowy	0,31	0,6	0,3125	0,31	0,3125/0,625	0,16
goździkowy	1,25	0,3125	2,5 lub >	0,625	2,5	2,5 lub >
AmB	0,06		0,5	0,06		8



**Tabela 3. 18.** Porównanie wartości MIC ekstraktów propolisów w podłożach suplementowanych bądź niesuplementowanych sorbitolem lub ergosterolem

EEP	<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. glabrata</i> DSM 11226		
	RPMI	RPMI +sorbitol	RPMI + ergosterol	RPMI	RPMI + sorbitol	RPMI + ergosterol
15 b	0,16	0,08	2,5	0,04	n/0,01	0,16
17	0,3125	0,16	5	0,625	0,04	> 5
18 b	0,3125	0,16	2,5	0,625	n/0,01	5
23	0,3125	0,16	5	0,3125	0,04/0,3125	0,04/0,08
AmB	0,0625	-	0,5	0,0625	-	8

\* n/0.01 – brak całkowitego wzrostu (wyłącznie częściowy wzrost do podanego stężenia EEP)

### 3.3.2. Wpływ olejków eterycznych i ekstraktów propolisów na błonę komórkową

#### 3.3.2.1. Wpływ obecności ergosterolu w podłożu na efekt grzybostatyczny

Obecność w podłożu ergosterolu może powodować wzrost wartości MIC dla związków przeciwgrzybowych, których celem molekularnym jest zawierająca ten sterol błona komórkowa. W przypadku badanych olejków, wzrost MIC zaobserwowano dla olejku tymiankowego, cytrynowego oraz goździkowego wobec obydwu szczepów referencyjnych oraz dla olejku geraniowego jedynie wobec gatunku *C. glabrata* (Tabela 3. 17). Zdecydowanie wyraźniejszy wpływ na wzrost wartości MIC zaobserwowano w przypadku ekstraktów propolisów. W podłożu suplementowanym ergosterolem, stężenia hamujące wzrost były 8 lub 16 razy wyższe niż niesuplementowanym (Tabela 3. 18). Jako kontrolę dodatnią zastosowano amfoterycynę B, o której wiadomo, że wiąże się z ergosterolem zawartym w błonie komórkowej. W jej przypadku wartość MIC wrosła 8 razy dla szczepu *C. albicans* oraz 128 razy dla *C. glabrata*.

#### 3.3.2.2. Określanie stopnia depolaryzacji błony komórkowej

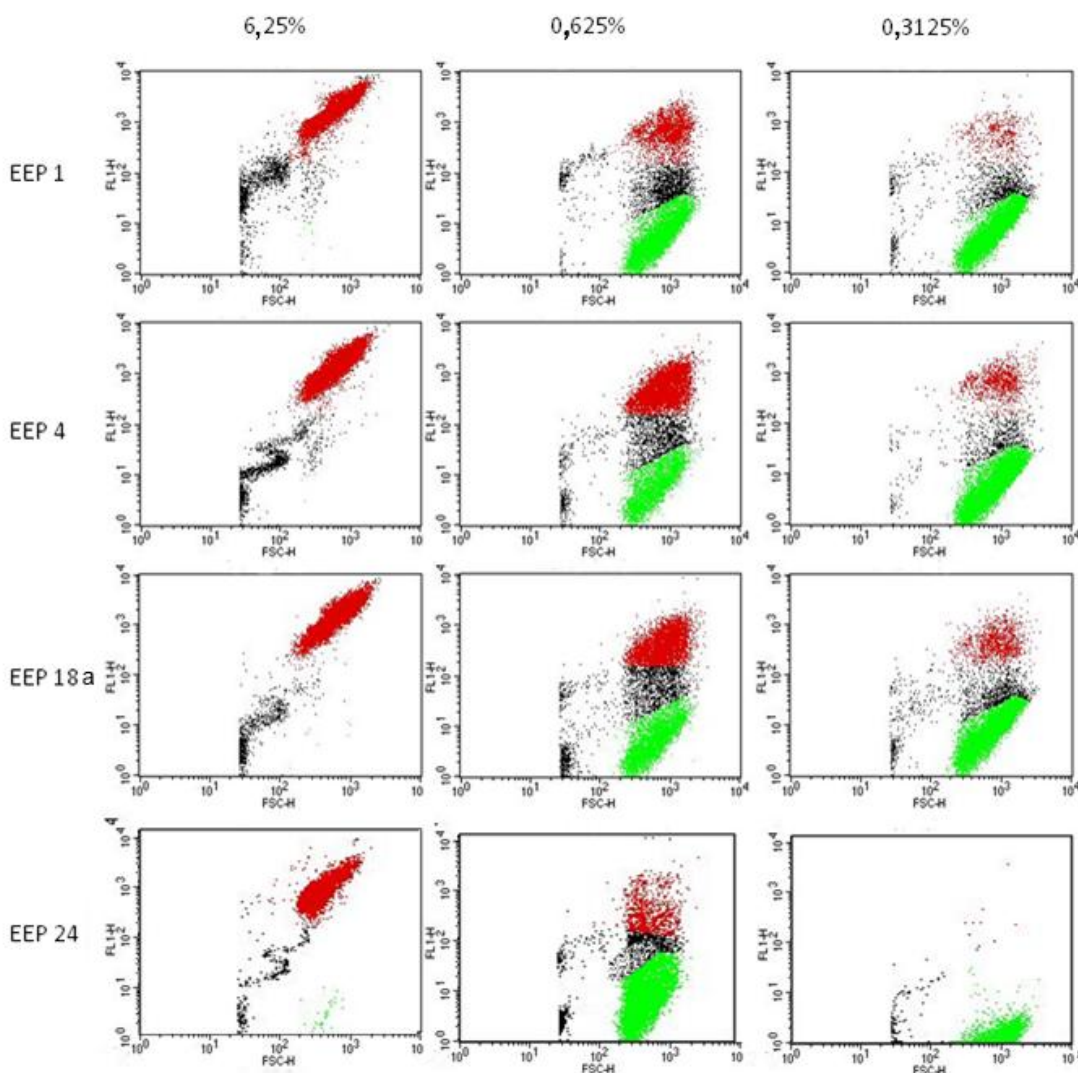
Wyniki badań opisane w poprzednich podrozdziałach wskazywały błonę komórkową jako najbardziej prawdopodobny cel molekularny składnika/składników ekstraktów etanolowych propolisów pszczelich. W celu dodatkowego potwierdzenia tej tezy wykonano badanie, którego celem było sprawdzenie, czy propolis powoduje depolaryzację błony. Kluczowym elementem badania było wykorzystanie anionowego barwnika fluorescencyjnego DiBAC<sub>4</sub>, który może wnikać tylko do komórek z zdepolaryzowaną błoną komórkową, po czym wiąże się z białkami wewnątrzkomórkowymi, co znacząco wzmacnia jego fluorescencję. Hiperpolaryzacja z kolei powoduje obniżenie fluorescencji. Barwnik wzbudzany jest światłem o długości około 490 nm, a emisja następuje przy długości fali światła 530 nm (± 15 nm) (Haugland, 2005). Dla mikroorganizmów depolaryzacja błony oznacza śmierć komórki, dlatego też metoda ta bywa stosowana do oceny przeżywalności.

Komórki doprowadzono do logarytmicznej fazy wzrostu, po czym traktowano przez 1 h czterema roztworami EEP w stężeniach 10 × MFC (6,25%), 1 × MFC (0,625%) oraz ½ × MFC (0,3125%) i tak traktowane komórki poddano analizie z użyciem cytometru przepływowego. Wyniki tej analizy przedstawiono na wykresie 3.22. Kolorem czerwonym zaznaczone są punkty odpowiadające komórkom martwym, o wysokim poziomie fluorescencji, czyli ze zdepolaryzowaną błoną komórkową, Na zielono oznaczone są punkty charakteryzujące komórki

żywe, o niskim poziomie fluorescencji. Na czarno oznaczone są punkty niezdefiniowane. Pomiędzy bramką czerwoną i zieloną zlokalizowane są punkty oznaczające komórki umierające, apoptotyczne, natomiast punkty bliżej początku układu współrzędnych wskazują na cząstki o mniejszych rozmiarach np. rozbite fragmenty komórkowe. Wykazano, że przy stężeniu wynoszącym  $10 \times$  MFC depolaryzacja błony jest bardzo szybka i zachodzi w 86 - 97% wszystkich komórek (Tabela 3. 19). W przypadku testowania stężenia  $1 \times$  MFC, największy efekt zaobserwowano dla EEP 4 a najslabszy dla EEP 24 (najniższy relatywny poziom fluorescencji świadczący o niskim poziomie depolaryzacji), czyli odwrotnie niż przy stężeniu  $10 \times$  MFC. Przy zastosowaniu stężenia  $\frac{1}{2} \times$  MFC, EEP 24 nie wywierał żadnego wpływu (poziom fluorescencji na poziomie kontroli nie poddanej ekspozycji na działanie żadnego EEP), a pozostałe trzy EEP wywierały tylko niewiele większy efekt. Dodatkowo wykonane były kontrole samego medium hodowlanego, oraz roztworów EEP w tych samych stężeniach bez dodatku komórek. W kontrolach tych nie stwierdzono obecności cząstek, które skutkowałyby fałszywie pozytywnym wynikiem. Eksperyment z porównywaniem wartości MIC w podłożu suplementowanym dodatkowym źródłem ergosterolu jak i ten wskazujący na depolaryzację błony wzmacniają wiarygodność tezy, wg której błona komórkowa jest pierwotnym celem molekularnym EEP.

**Tabela 3. 19.** Relatywny poziom fluorescencji komórek *C. albicans* SC5314 po ekspozycji na EEP i wybarwianiu barwnikiem DiBAC<sub>4</sub>

	6,25%	0,625%	0,3125%	Kontrola
EEP 1	86,20	19,21	3,84	0,22
EEP 4	86,54	41,13	9,3	
EEP 18 a	90,39	27,04	7,62	
EEP 24	96,92	5,93	0,07	

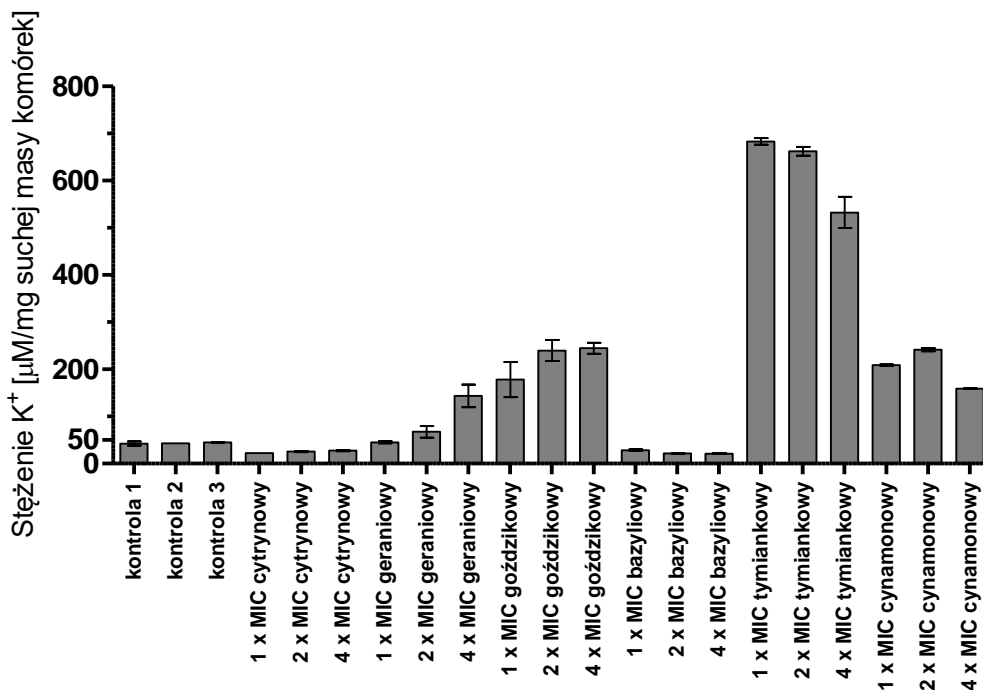


**Wyk. 3. 22.** Wpływ czterech ekstraktów propolisów (EEP 1, EEP 4, EEP 18 a, EEP 24) na depolaryzację błony komórkowej *C. albicans*. Komórki traktowane były ekstraktami propolisów w stężeniach 6,25%, 0,625%, 0,3125% odpowiadającym wartościom  $10 \times$  MFC,  $1 \times$  MFC,  $\frac{1}{2} \times$  MFC przez 1 h. Kolorem czerwonym oznaczona jest wyraźnie oddzielona grupa punktów oznaczających komórki o wysokiej fluorescencji, wskazującej na depolaryzację błony w komórkach martwych. Kolorem zielonym oznaczone są punkty wskazujące komórki żywe, o niskiej depolaryzacji. Pomiędzy obydwoma zaznaczonymi grupami występuje grupa punktów o pośredniej fluorescencji wskazująca na komórki na drodze apoptozy.

### 3.3.2.3. Indukcja wypływu jonów potasu pod działaniem produktów pochodzenia naturalnego

Prawidłowy poziom jonów potasu w komórce ma istotne znaczenie dla poprawnego funkcjonowania pomp sodowo-potasowych. Umożliwiają one utworzenie gradientu  $H^+$  w poprzek błony umożliwiając np. pobieranie glukozy wbrew gradientowi stężeń. Odpowiedni poziom potasu zapewnia prawidłowe pH i ciśnienie osmotyczne w komórce. Jony potasu są również potrzebne do prawidłowej pracy niektórych enzymów. Jeden z proponowanych w literaturze mechanizmów działania PPN dotyczy zaburzania zdolności komórki do kontrolowania przepływu jonów potasu przez błonę, co prowadzi do wycieku jonów z komórki, a następnie

utrąty jej żywotności. W przeprowadzonym eksperymencie nie stwierdzono, aby ekstrakt propolisu wpłynął znacząco na wypływ jonów potasu przez błonę komórkową (dane nieprzedstawione). Duży wypływ natomiast odnotowano w przypadku zastosowania olejków eterycznych, a szczególnie tymiankowego, cynamonowego oraz goździkowego (Wyk. 3. 23).



**Wyk. 3. 23.** Wpływ olejków eterycznych w stężeniach 1 × MIC, 2 × MIC, 4 × MIC, na wypływ jonów potasu z komórek *C. albicans* ATCC 10231

### 3.3.3. Wpływ EEP na morfogenezę

Tworzenie formy strzępkowej u *C. albicans* jest kluczowym czynnikiem wirulencji i inwazyjności. Indukcja formy mycelialnej może być zapoczątkowana przez wiele czynników takich jak przykładowo podwyższona temperatura czy obecność serum w pożywce. W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowano podłoże o ograniczonej ilości składników odżywczych tzw. podłoże Lee. Ponadto zastosowano szczep *C. albicans* SC5314, ponieważ szczep *C. albicans* ATCC 1023 charakteryzuje się obniżoną zdolnością tworzenia grzybni (Thewes et al., 2008). Po dwóch godzinach większość komórek w kontroli występowała w postaci mycelialnej bądź pseudomycelialnej, natomiast w próbach poddanych ekspozycji na działanie EEP zawartość tych form nie przekraczała 14%. Po 24 h zawartość form mycelialnych wynosiła maksymalnie 2%, jednak stanowiły one także mniejszy odsetek w kontroli (Tabela 3. 20). W przypadku zastosowania olejków eterycznych, po 2 h inkubacji liczba form mycelialnych stanowiła jeszcze mniejszy udział niż po traktowaniu EEP (Tabela 3. 21). Jednak po 24 h zaobserwowano, że dla olejku cynamonowego liczba form mycelialnych jest na poziomie kontroli. Eksperyment prowadzono także w podłożu limitującym Spider agar. EEP dodawano do agaru w stężeniach subletalnych: 0,16% oraz 0,3125% (v/v). Przy obydwu stężeniach tworzenie

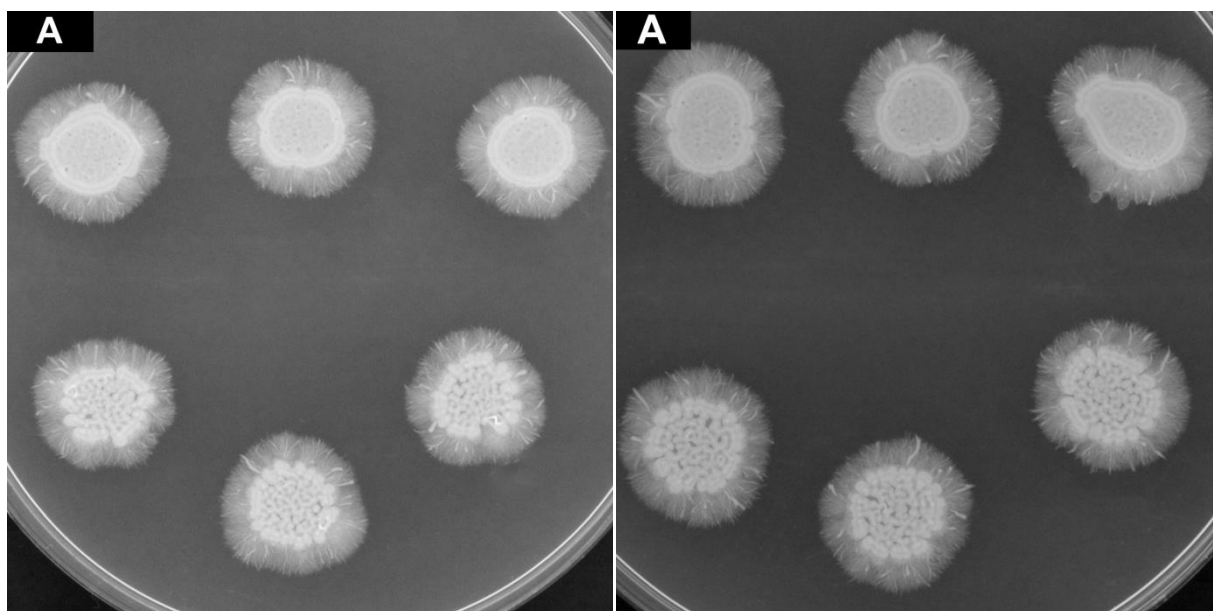
grzybni zostało całkowicie zahamowane. W kontrolach nie poddanych ekspozycji na działanie EEP widoczny był wyraźny wzrost kolonii w postaci grzybni (Fot. 3. 11).

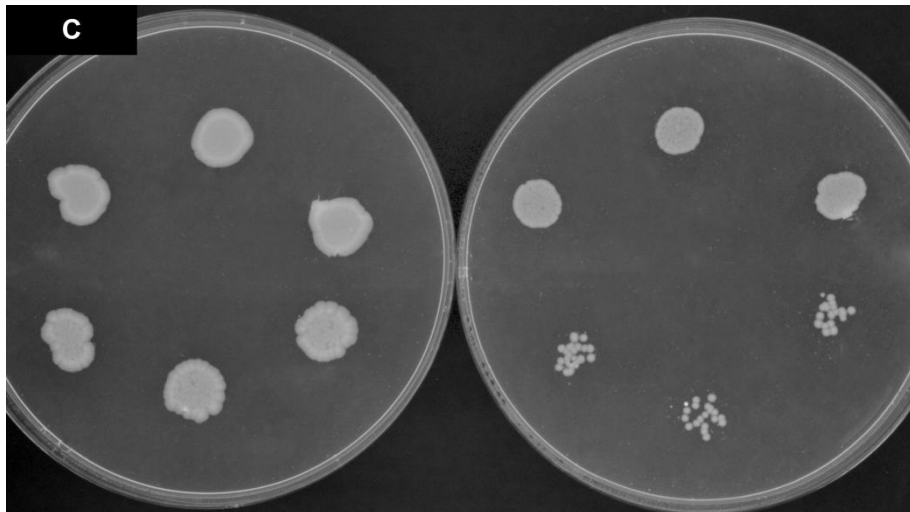
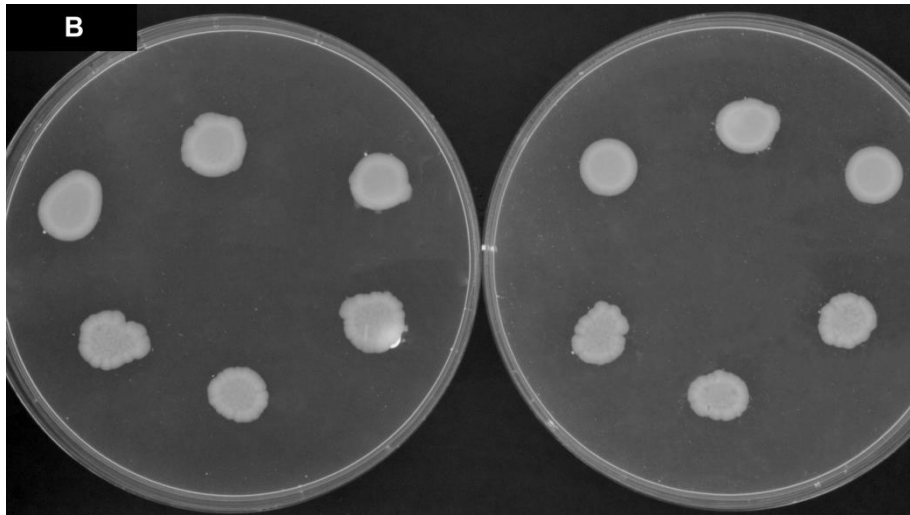
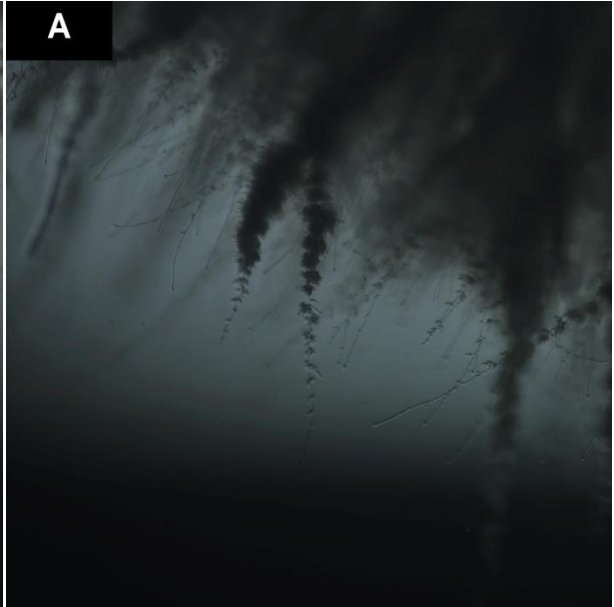
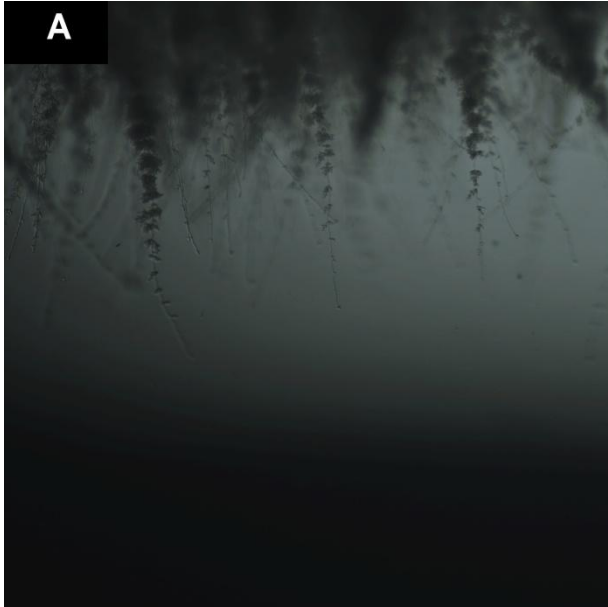
**Tabela 3. 20.** Zawartość form mycelialnych oraz pseudomycelialnych po traktowaniu komórek *C. albicans* SC5314 ekstraktami propolisów przez 2 lub 24 h w stężeniach odpowiednio  $1 \times \text{MIC}$  oraz  $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$

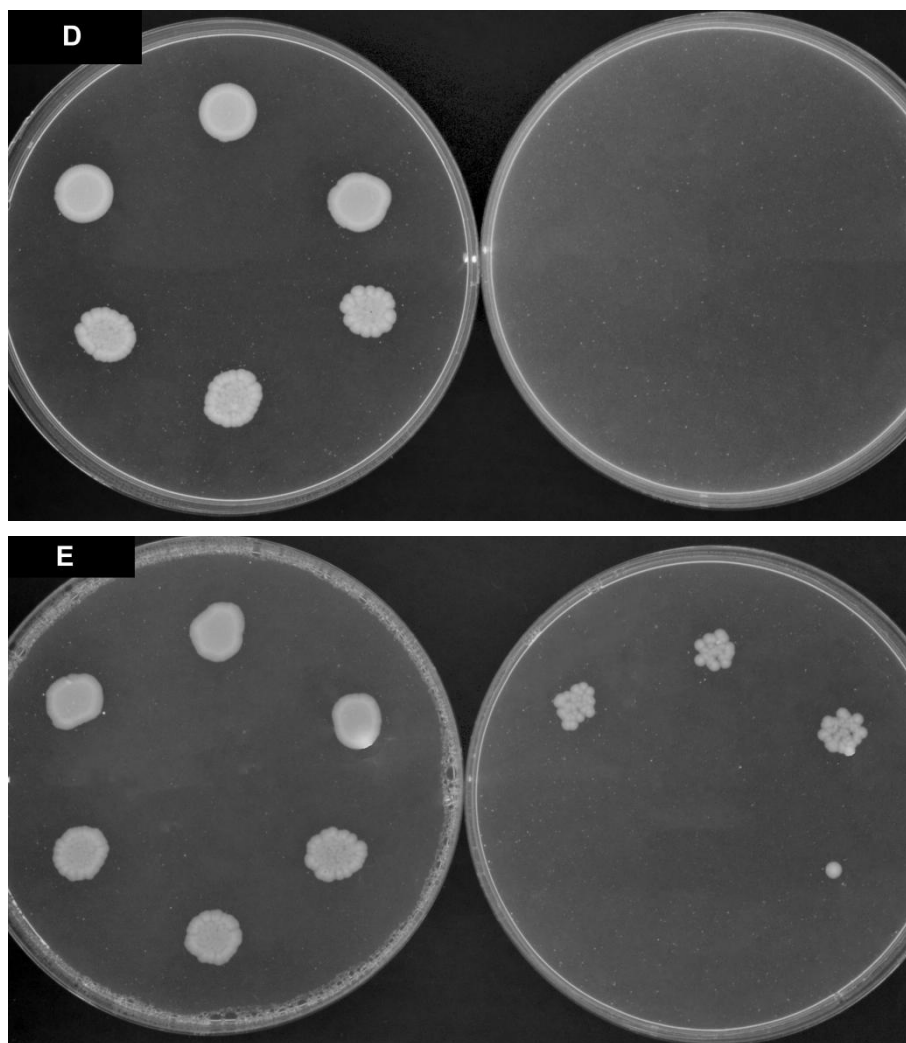
Propolis	Formy mycelialne i pseudomycelialne [%]	
	Po 2 h	Po 24 h
Kontrola	91	66
EEP 4	3	1
EEP 8	14	2
EEP 17	9	2
EEP 18 b	13	0

**Tabela 3. 21.** Zawartość form mycelialnych oraz pseudomycelialnych po traktowaniu komórek *C. albicans* SC5314 olejkami eterycznymi przez 2 lub 24 h w stężeniach odpowiednio  $1 \times \text{MIC}$  oraz  $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$

Olejek	Formy mycelialne i pseudomycelialne [%]	
	Po 2 h	Po 24 h
Kontrola	95	22
Tymiankowy	0	0
Cytrynowy	0	0
Geraniowy	0	0
Cynamonowy	0	27
Bazyliowy	5	11
Goździkowy	0	0







**Fot. 3. 11.** Wpływ EEP na hamowanie tworzenia grzybni przez *C. albicans* SC5314. A – kontrole bez dodatku EEP do podłoża, B – EEP 2, C- EEP 6, D – EEP 8, E – EEP 27. Komórki rosły na podłożu Spider bez EEP lub w obecności EEP w stężeniach 0,16% (szalki po lewej stronie) lub 0,3125% (v/v) (szalki po prawej stronie) przez 7 dni w temperaturze 37<sup>0</sup>C. Zdjęcia uzyskane przy zastosowaniu kamery cyfrowej i mikroskopu optycznego

#### 3.3.4. Wpływ związków naturalnych na poziomy ekspresji genów kodujących pompy wielolekowe

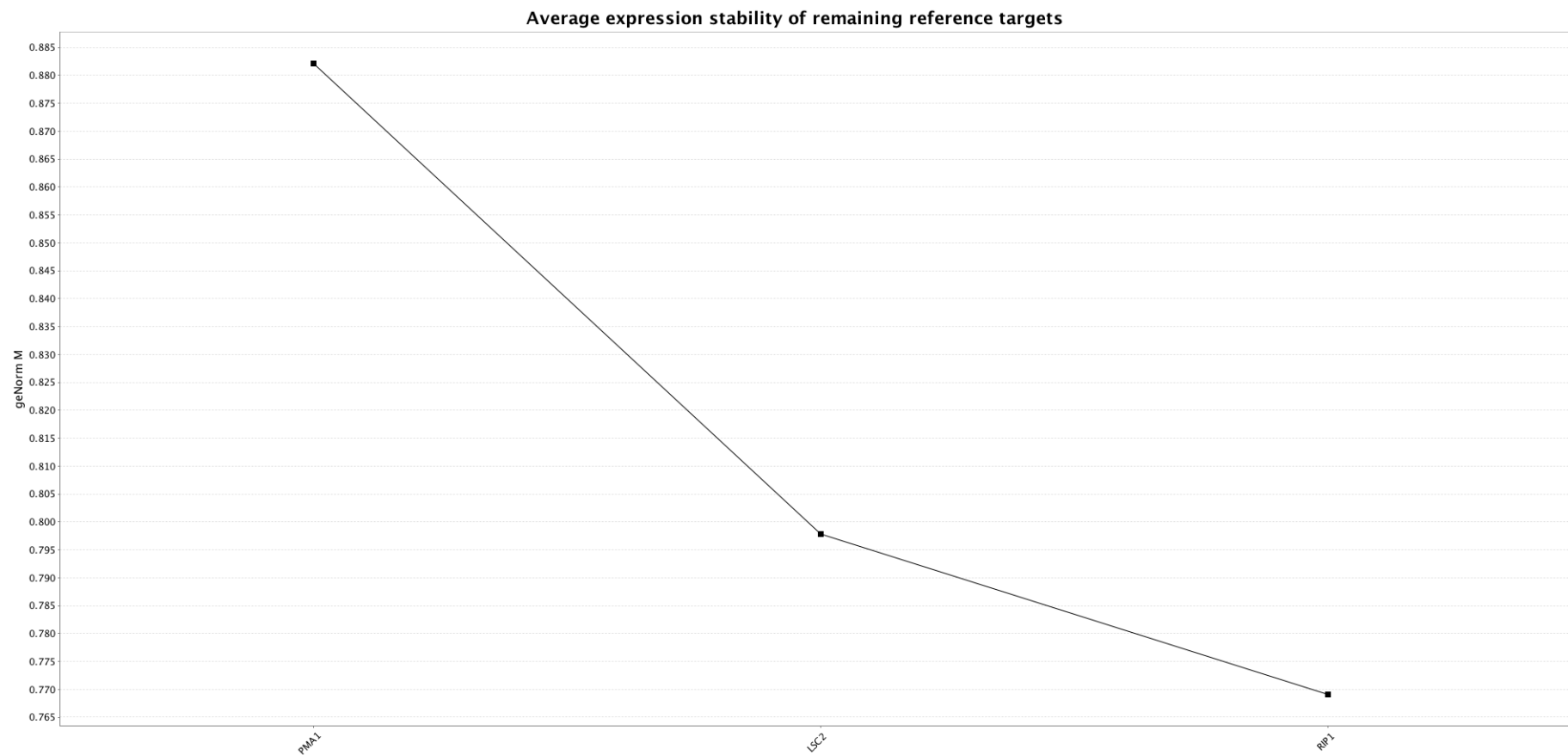
Wyniki wcześniej wykonywanych badań wskazały na istnienie znaczącego synergizmu pomiędzy lekami z grupy azoli i ekstraktami etanolowymi propolisów. Obniżona aktywność azoli jest często powodowana zwiększoną aktywnością pomp wielolekowych Cdr1p oraz Cdr2p. Dlatego też postanowiono hipotezę, że tak znacząca poprawa aktywności flukonazolu w obecności bardzo niskich stężeń propolisu może być wywołana obniżoną ekspresją genów *CDR1*, *CDR2* bądź *MDR1*. Podobne przypuszczenia miał zespół badawczy Pippi i in. (Pippi et al., 2015). Weryfikację tej tezy przeprowadzono z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Początkowo wyznaczono wydajności reakcji PCR dla wszystkich stosowanych genów docelowych oraz referencyjnych posługując się krzywymi standardowymi. Wszystkie wydajności mieściły się w zakresie 90 - 100%. W następnym etapie wybrano najbardziej

stabilne geny referencyjne w warunkach prowadzenia eksperymentu. Spośród siedmiu przetestowanych par starterów dla genów referencyjnych (*TDH3*, *18s*, *PMA1*, *RIP1*, *LSC2*, *EFB1* i *ACT1*) najbardziej stabilne, w warunkach prowadzenia reakcji, okazały się być geny *PMA1*, *LSC2* i *RIP1*, dla których współczynniki stabilności M wynosiły odpowiednio 0,88 0,80 i 0,77 (Wyk. 3. 24). Dla idealnych starterów genów referencyjnych wartość M powinna wynosić nie więcej niż 0,5, czego nie udało się osiągnąć, natomiast w trudnych warunkach prowadzenia reakcji dopuszczalna jest wartość do 1,0.

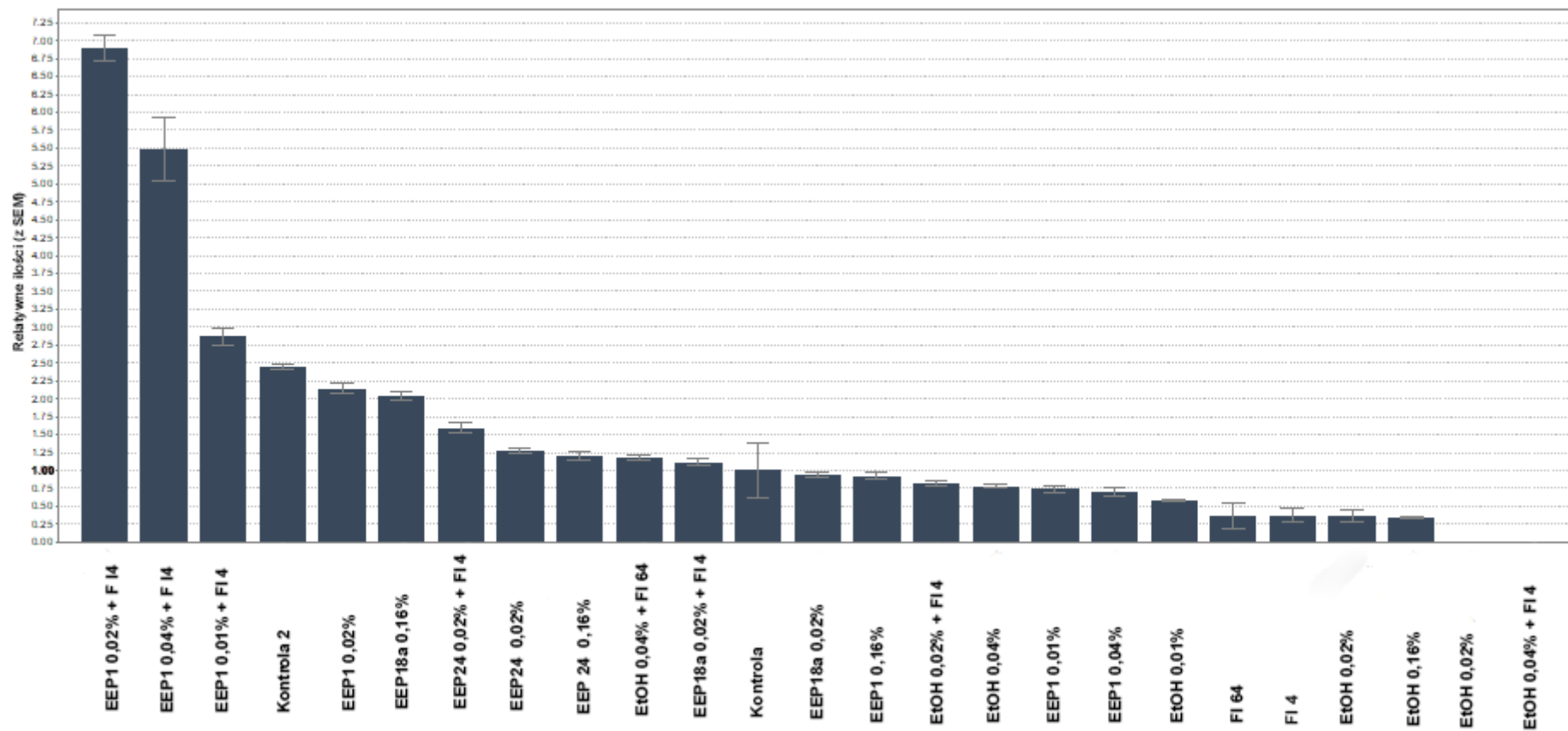
W eksperymencie przetestowano wpływ trzech ekstraktów propolisów (EEP 1, EEP 18 a i EEP 24) w stężeniach odpowiadających wartościom  $\frac{1}{2} \times \text{MIC}$  na ekspresję genów *CDR1*, *CDR2* i *MDR1*, wpływ flukonazolu w stężeniu 64  $\mu\text{g/ml}$  (stężenie subletalne), oraz wpływ kombinacji EEP i flukonazolu w stężeniach, które wywołują efekt synergistyczny (0,01%, 0,02%, 0,04% dla EEP i 4  $\mu\text{g/ml}$  dla flukonazolu). Dodatkowo zbadano wpływ etanolu dodanego w objętości odpowiadającej objętości testowanych EEP. Jako kalibrator zastosowano szczep nie poddany działaniu żadnego związku (oznaczony jako kontrola na wykresach ekspresji). Wyniki przedstawiono na wykresach 3.25, 3.26 i 3.27.

Uzyskane wyniki wskazują, że EEP nie wywierają jednoznacznego wpływu na poziomy ekspresji badanych genów. Działanie EEP 1 w znaczący sposób zwiększało poziom ekspresji wszystkich trzech genów, w największym stopniu dla genu *CDR2*. Intensywną nadekspresję *CDR1* obserwowano także dla kombinacji EEP 1 z flukonazolem o stężeniu 4  $\mu\text{g/ml}$ . Poziomy ekspresji genów po ekspozycji na EEP 18 a i EEP 24 były porównywalne do kontroli nietraktowanej tymi związkami.

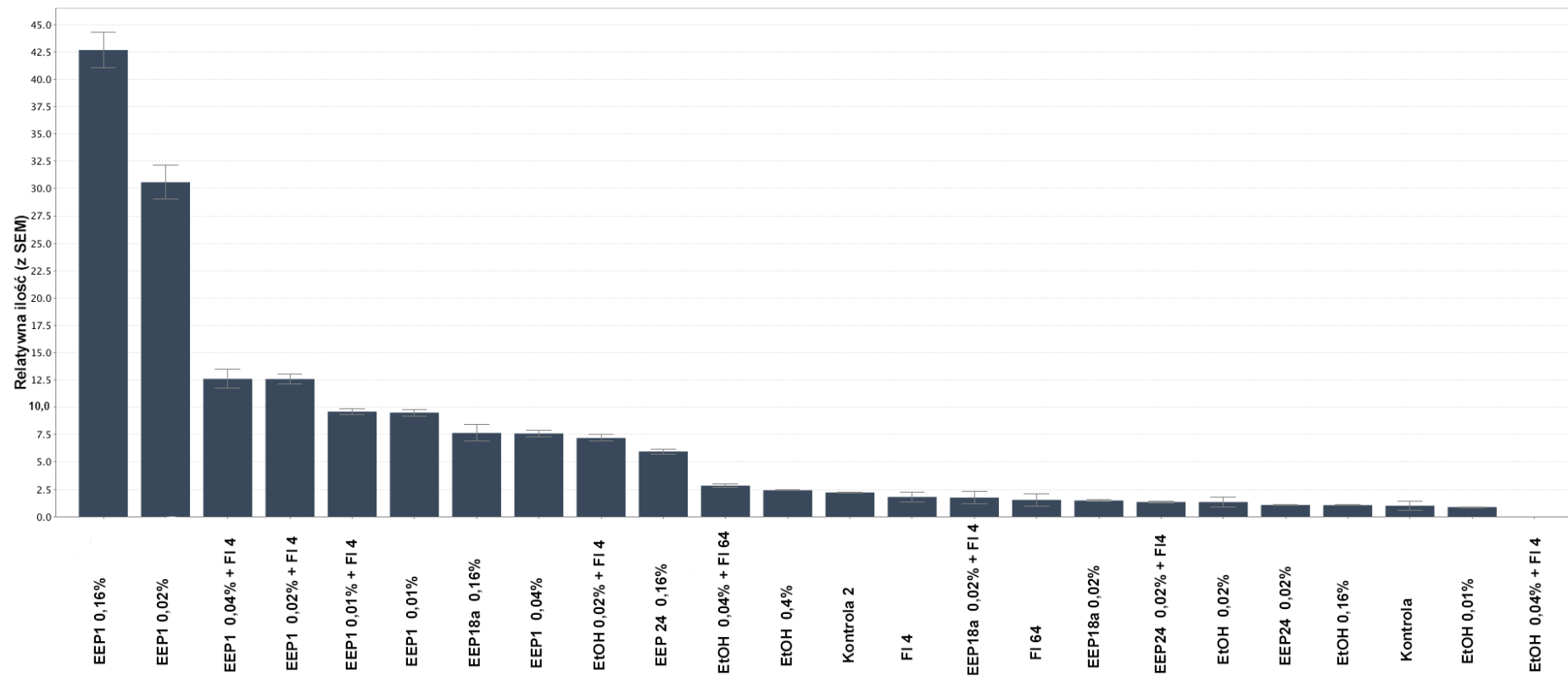




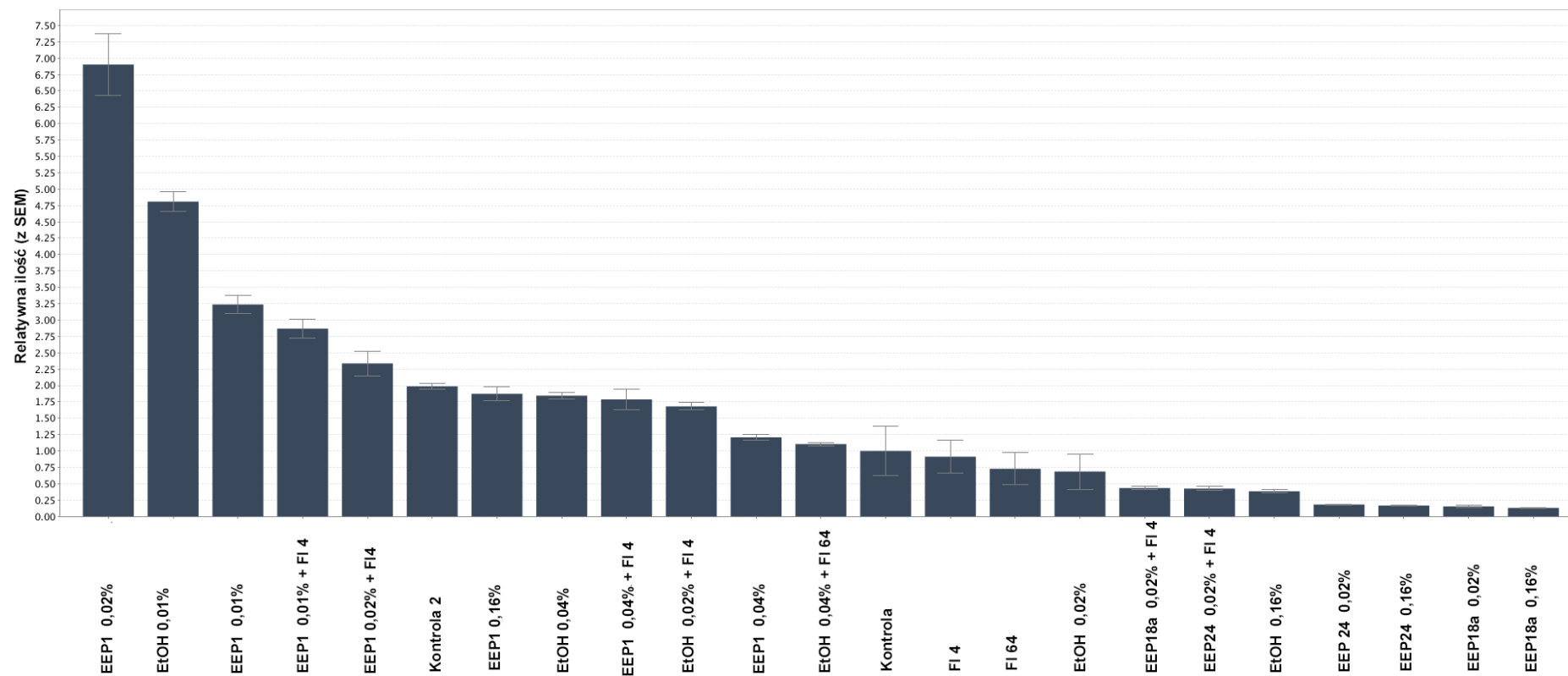
**Wyk. 3. 24.** Stabilności trzech wybranych genów referencyjnych



**Wyk. 3. 25.** Zmiany poziomów ekspresji genu *CDR1* szczepu *C. albicans* ATCC 10231 pod wpływem trzech ekstraktów etanolowych propolisów pszczelich w porównaniu do kontroli nietraktowanej propolisami. EEP – ekstrakt etanolowy propolisu, FL 4 lub FL 64 – roztwór wodny flukonazolu w stężeniu 4 µg/ml lub 64 µg/ml, EtOH – etanol w stężeniu odpowiadającym jego zawartości w ekstrakcie etanolowym propolisu



Wyk. 3. 26. Zmiany poziomów ekspresji genu *CDR2*. Opis jak powyżej



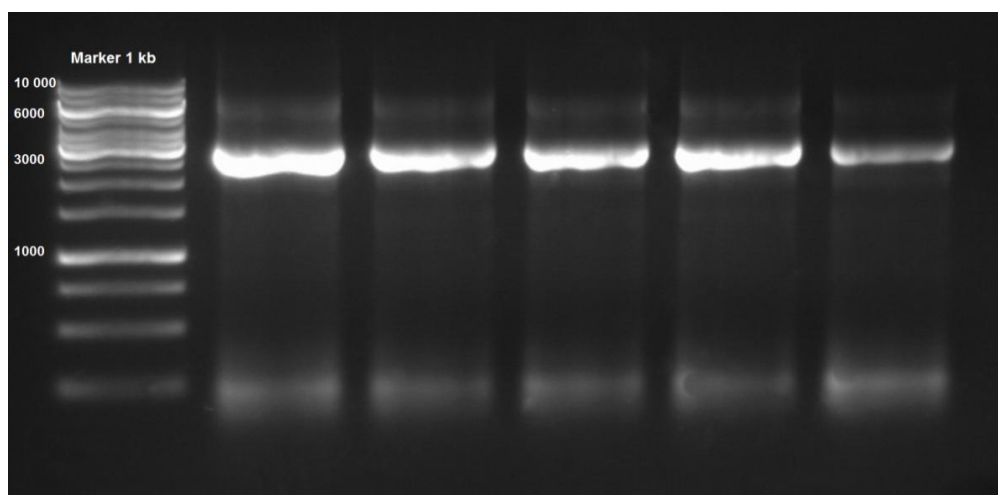
Wyk. 3. 27. Zmiany poziomów ekspresji genu *MDR1*. Opis jak powyżej

### 3.3.5. Wpływ EEP ekstraktów etanolowych propolisów na biosyntezę pomp typu ABC

Wyniki uzyskane w poprzednio opisanym eksperymencie nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy EEP powodują podwyższenie lub obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących pompy wielolekowe. Dlatego, w kolejnym eksperymencie sprawdzano czy EEP powodują obniżenie lub podwyższenie względnej ilości pomp w błonie w porównaniu do kontroli nie poddanej ekspozycji na działanie EEP. Było to możliwe dzięki sporządzeniu na drodze transformacji odpowiednich szczepów, w których białka Cdr1p oraz Cdr2p znakowane są białkiem zielonej fluorescencji i wykonywaniu obserwacji z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego.

#### 3.3.5.1. Transformacja komórek *C. albicans*

W pierwszym etapie transformacji amplifikowano gen *GFP* wraz z genem kodującym oporność na nourseotrycynę z plazmidu gamma mGFP-NAT1. Dodatkowo, amplifikowany fragment zawierał dwie sekwencje komplementarne do końcowego odcinka genu *CDR2*. Obecność produktu amplifikacji o długości 2700 pz potwierdzono wykonując elektroforezę w 1% żelu agarozowym (Fot. 3. 12).

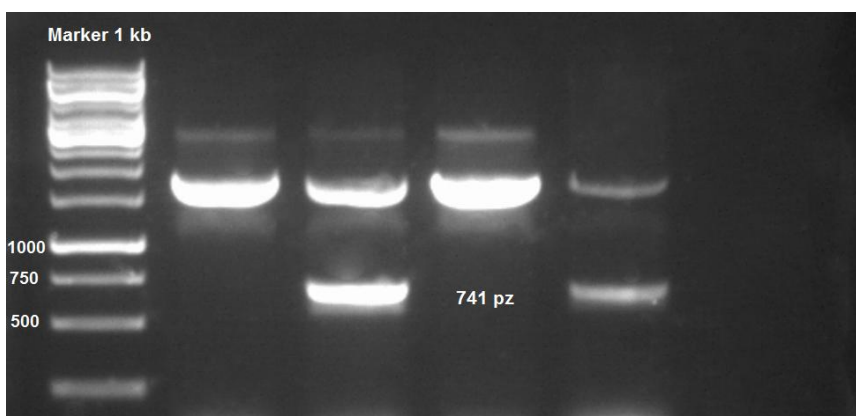


**Fot. 3. 12.** Produkty amplifikacji genów z plazmidu gamma mGFP-NAT1 w pierwszym etapie transformacji uwidocznione w 1% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Sybr Safe

Następnie transformowano komórki szczepu *C. albicans* SC 5314 uzyskanym produktem reakcji PCR z zastosowaniem metody z roztworem octanu litu.

Insercja amplifikowanych genów odbywa się na drodze rekombinacji homologicznej, co umożliwione było specjalną konstrukcją starterów (produkt amplifikacji posiadał dodatkowo dwa fragmenty sekwencji komplementarne do odcinków w genie *CDR2*). Po przeprowadzeniu transformacji wykonano posiewy na podłożu selekcyjnym YPD z dodatkiem nourseotrycyny. Po inkubacji stwierdzono wzrost szczepu transformowanego produktem amplifikacji i brak wzrostu w kontroli, w której nie zastosowano produktu reakcji PCR. Z czterech kolonii wyizolowano DNA i przeprowadzono reakcję amplifikacji z zastosowaniem starterów diagnostycznych w celu sprawdzenia poprawności insercji. Obecność produktów o długości 741 pz stwierdzono w

dwóch próbach z czterech (Fot. 3. 13) (oprócz produktu o długości 741 pz widoczne są produkty niespecyficzne o długości 1414 pz). Potwierdzono także, że szczepy wykazują fluorescencję po wzbudzeniu światłem lasera o długości 488 nm.

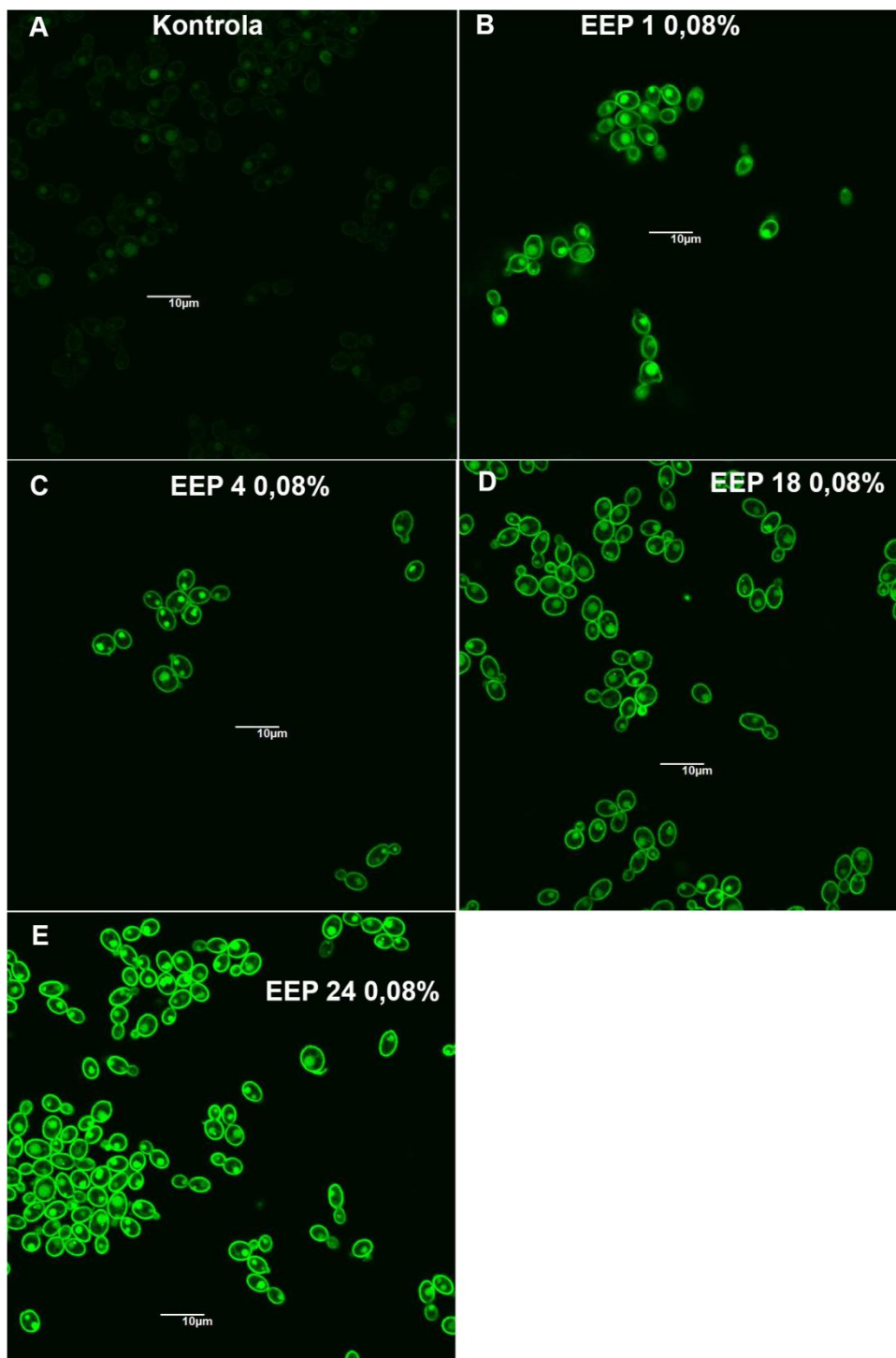


**Fot. 3. 13.** Produkty amplifikacji z zastosowaniem starterów diagnostycznych uwidocznione w 1% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Sybr Safe

W ten sposób otrzymano rekombinanty *C. albicans* SC5314 zawierające geny kodujące białka fuzyjne Cdr1p-GFP lub Cdr2p-GFP. Komórki te wykorzystano do zbadania wpływu EEP na biosyntezę Cdr1p i Cdr2p.

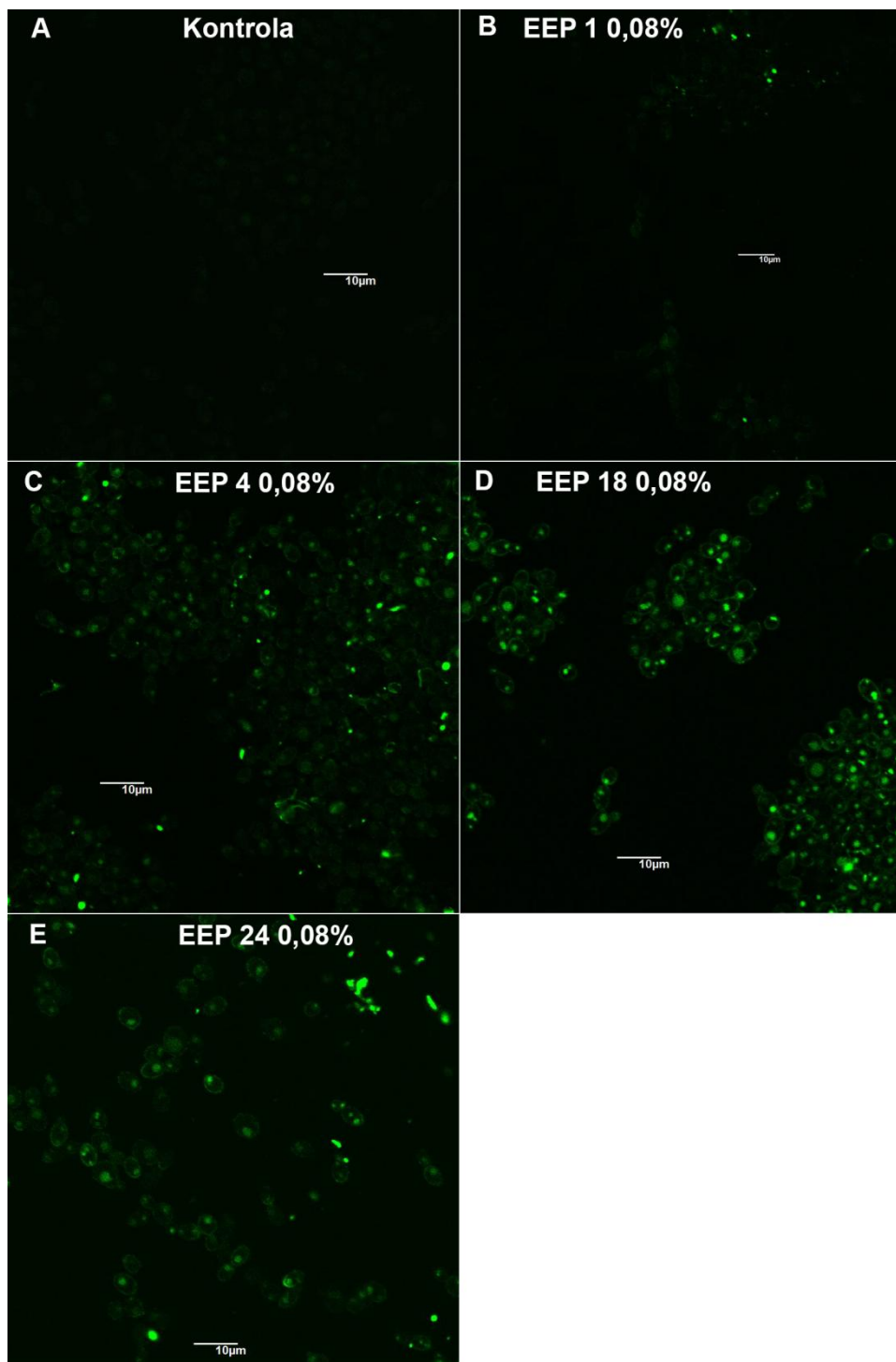
#### 3.3.5.2. Wpływ EEP na biosyntezę Cdr1p i Cdr2p.

Komórki zawierające geny kodujące białka fuzyjne inkubowano w obecności EEP przez 4 - 5 h i następnie poddawano obserwacjom w mikroskopie fluorescencyjnym. Wyniki przedstawiono na obrazach 3.14, 3.15 i 3.16. Nie ulega wątpliwości, że każdy z czterech testowanych EEP indukuje nadprodukcję pomp Cdr1p oraz Cdr2p. Objawiało się to znaczącym wzrostem zielonej fluorescencji w błonie komórkowej oraz częściowo w wakuolach po traktowaniu komórek EEP w porównaniu do kontroli nietraktowanej tym czynnikiem (Fot. 3. 14 i Fot. 3. 15). Wyraźna nadprodukcja Cdr1p występowała w błonach komórkowych, natomiast nadprodukcja Cdr2p w wakuolach. Trzecia seria zdjęć przedstawia komórki szczepu *C. albicans* SC5314 (a więc szczep, z którego uzyskano jego pochodne ze znakowanymi przez GFP pompami Cdr1p oraz Cdr2p) (Fot. 3. 16). Szczep nieznakowany białkiem GFP nie powinien wykazywać fluorescencji bądź stosunkowo niski poziom autofluorescencji. Kontrole z zastosowaniem tego szczepu wykonano w sposób analogiczny do dwóch pierwszych szczepów (te same propolis i stężenia), aby stwierdzić czy roztwory EEP nie powodują wzrostu poziomu autofluorescencji. Jednak porównując obrazy przed i po traktowaniu EEP nie zaobserwowano różnic w poziomie fluorescencji.



**Fot. 3. 14.** Wpływ EEP na biosyntezę białka fuzyjnego Cdr1p-GFP w błonach komórek *C. albicans* SC5314: A - szczep nietraktowany EEP, B - szczepy traktowany EEP 1, C - EEP 4, D – EEP 18 a, E – EEP 24 w stężeniu 0,08% (v/v). Zdjęcia wykonane przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego Olympus

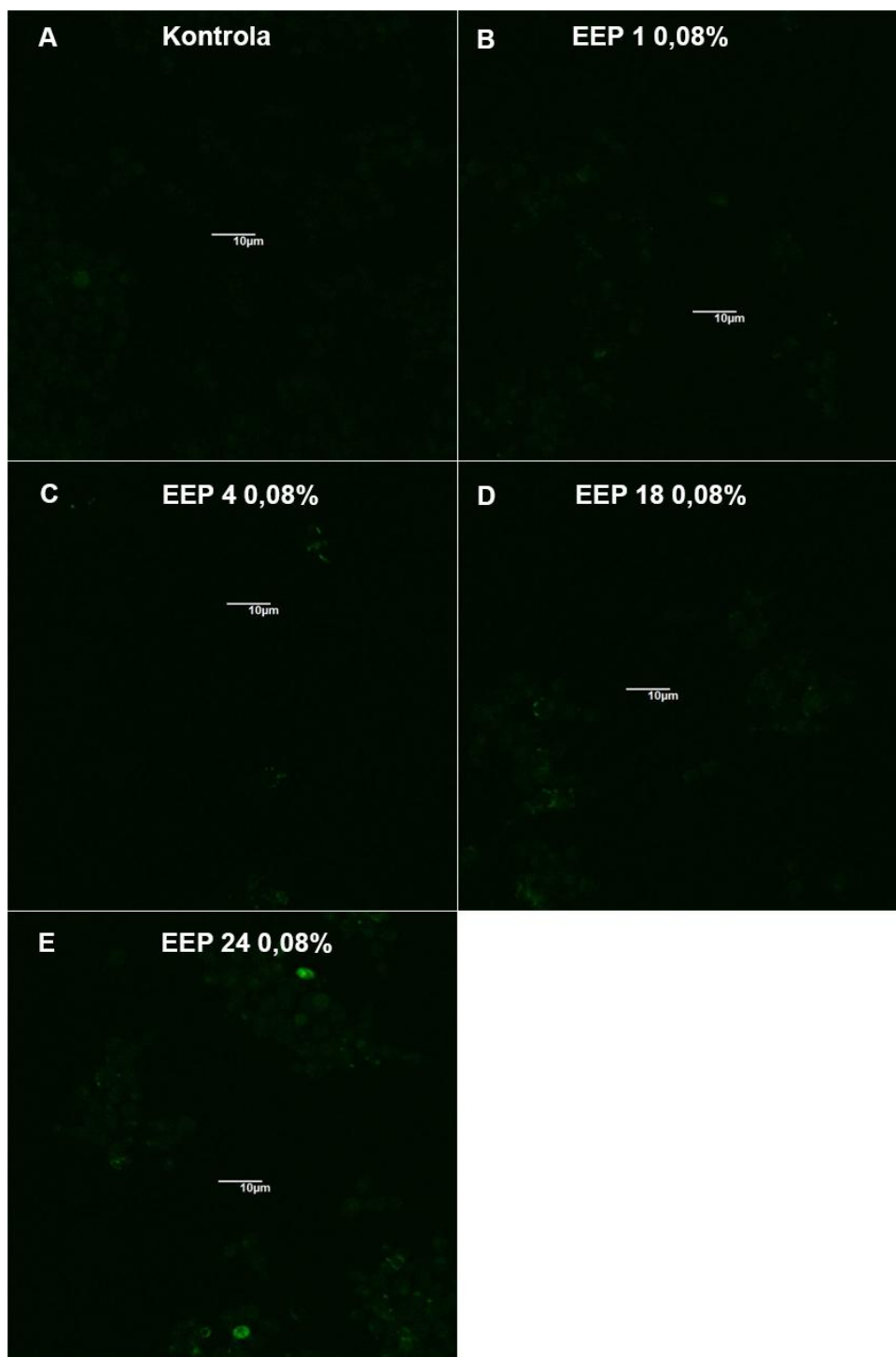
IX81



**Fot. 3. 15.** Wpływ EEP na biosyntezę białka fuzyjnego Cdr2p-GFP w wakuolach komórek *C. albicans* SC5314: A - szczep nietraktowany EEP, B - szczepy traktowany EEP 1, C - EEP 4, D – EEP 18 a, E – EEP 24 w stężeniu 0,08% (v/v). Zdjęcia wykonane przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego Olympus IX81

IX81





**Fot. 3. 16.** Kontrole szczepu *C. albicans* SC 5314. A - szczep nietraktowany EEP, B - szczepy traktowany EEP 1, C - EEP 4, D – EEP 18 a, E – EEP 24 w stężeniu 0,08% (v/v). Zdjęcia wykonane przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego Olympus IX81

#### **3.4. Próba indukcji oporności *C. albicans* na działanie produktów pochodzenia naturalnego**

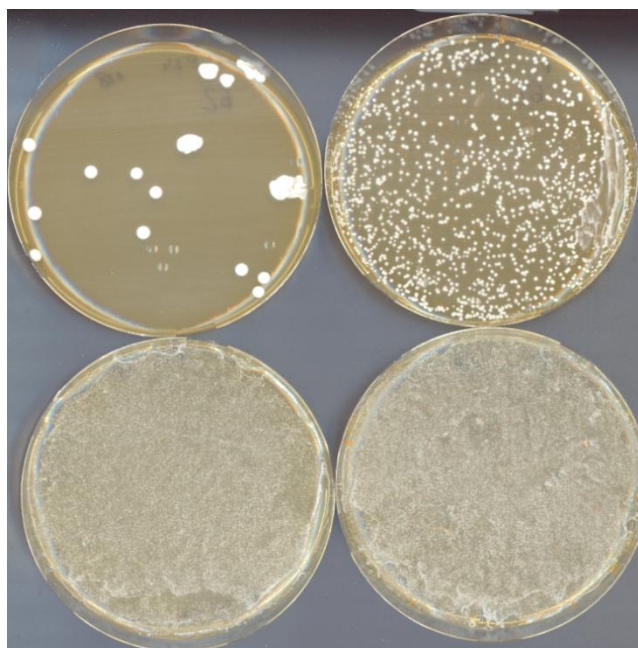
Celem tej części badań było ustalenie czy drożdżaki *C. albicans* zdolne są do nabywania oporności na EEP i olejki eteryczne.



W doświadczeniu sprawdzono możliwość indukcji oporności *C. albicans* na działanie EEP i olejków w wyniku długotrwałej ekspozycji. Doświadczalnie ustalono maksymalne stężenia związków dodawanych do podłoża stałego YPD, które pozwalają na wzrost od kilku do kilkuset kolonii na płytce lecz nie wzrost murawowy (Tabela 3. 22). W ten sposób uzyskano przypuszczalne mutanty odporne. Pojedyncze kolonie przesiano na płytce z podłożem zawierającym to samo stężenie związku aktywnego, co na płytce wyjściowej. W przypadku zastosowania czterech testowanych propolisów EEP 1, EEP 4, EEP 18 a i EEP 24 zaobserwowano, że szczepy te są zdolne do wzrostu na całej powierzchni płytki (Fot. 3. 17). Jest to wynikiem przejściowej nadekspresji genów kodujących pompy lekowe w odpowiedzi na stres komórkowy.

**Tabela 3. 22.** Maksymalne stężenia związków umożliwiające wzrost w ciągu 48 h na podłożach stałych YPD

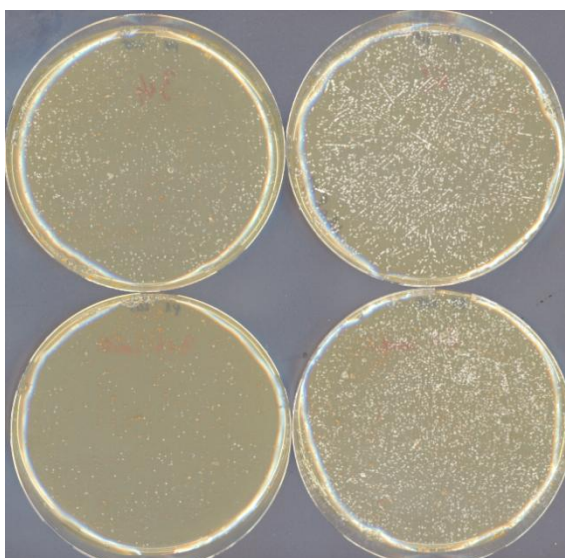
Produkt	Stężenie [%]
Olejki	
Cytrynowy	0,3125
Tymiankowy	0,02
Cynamonowy	0,004
Bazyliowy	0,625
Ekstrakty propolisów	
EEP 1	0,625
EEP 4	0,625
EEP 18 a	0,625
EEP 24	0,625



**Fot. 3. 17.** Indukcja oporności *C. albicans* SC5314 na działanie EEP (EEP 24 z lewej i EEP 1 z prawej).

Płytki górne – wzrost kolonii na podłożu zawierającym 0,625 % EEP. Płytki dolne – wzrost komórek wyizolowanych z pojedynczych kolonii na podłożu zawierającym 0,625 % EEP

W drugiej części eksperymentu, komórki izolowane z płytek wyjściowych oraz komórki szczepu kontrolnego nie poddawane uprzednio ekspozycji na EEP bądź EO pasażowano czterokrotnie (po 24 h) w podłożu płynnym YPD bez dodatku związków o aktywności przeciwgrzybowej. Następnie wykonano posiewy na podłożach YPD zawierających dodatek EEP lub EO w stężeniach wyjściowych (Tabela 3. 22). Wzrost komórek izolowanych z kolonii znacznie intensywniejszy niż wzrost (lub jego brak) komórek szczepu kontrolnego oznaczałby, że komórki izolowane z kolonii mają charakter trwałego mutantu, opornego na działanie związku. W przeprowadzonym eksperymencie nie stwierdzono, aby komórki izolowane z kolonii wyrosłych na podłożach zawierających którykolwiek z czterech testowanych EEP (EEP 1, EEP 4, EEP 18 a i EEP 24) i czterech EO (cynamonowy, bazyliowy, cytrynowy i tymiankowy) cechowały się intensywnym wzrostem. Po inkubacji obserwowano albo brak wzrostu szczepu testowanego jak i kontroli, albo bardzo porównywalny wzrost obydwu szczepów (Fot. 3. 18). Wskazuje to na to, że ekspozycja na działanie EO i EEP nie spowodowała powstania mutacji skutkujących nabyciem trwałej oporności.



**Fot. 3. 18.** Wzrost komórek *C. albicans* SC5314 na podłożu suplementowanym EEP1 w stężeniu 0,625%. Płytki górne – wzrost komórek izolowanych z kolonii po czterokrotnym pasażowaniu. Płytki dolne – wzrost komórek szczepów wyjściowych

Podstawowym mechanizmem obronnym drożdży na obecność w ich otoczeniu związków obcych jest nadprodukcja pomp błonowych z rodziny ABC, których zadaniem jest wyrzut leku z komórki, tak aby jego stężenie w środku było na tyle niskie, żeby nie stanowiło zagrożenia. Początkowo mechanizm ten zaproponowano dla wyjaśnienia zjawiska oporności na azole, które są najczęściej stosowaną grupą leków w terapii infekcji grzybiczych. Szybko okazało się jednak, że pompy takie jak Cdr1p oraz Cdr2 zdolne są do wyrzutu strukturalnie niepowiązanych związków. Nadprodukcja pomp może być zjawiskiem przejściowym, wynikającym ze stresu komórki narażonej na obecność w otoczeniu związków obcych. Synteza pomp stopniowo zmniejsza się, gdy komórki nie są narażone na ekspozycję danego związku. Innym mechanizmem oporności są mutacje w genomie. Zmiana taka jest trwała i dziedziczona,

dlatego oporność jest przenoszona na komórki potomne. Najczęstszą mutacją występującą u *C. albicans* prowadzącą do konstytutywnej ekspresji genów *CDR1* i *CDR2*, kodujących pompy typu efflux jest zmiana w obrębie czynnika transkrypcyjnego *TAC1* (*ang. transcriptional activator of CDR genes*) (Coste et al., 2004). Dla gatunku *C. glabrata* jest to odpowiednio czynnik transkrypcyjny kodowany przez gen *PDR1* (*ang. pleiotropic drug resistance*) (Tsai et al., 2006). Mutacje mogą pojawić się także w obrębie w innych genów.

Wynik doświadczenia opisanego w tym podrozdziale jest wstępem do badań potencjalnych mechanizmów oporności na produkty pochodzenia naturalnego, co samo w sobie nie było głównym celem projektu. Dalsze eksperymenty dotyczące możliwości nabierania oporności wymagałyby długotrwałych badań uzyskanych „mutantów”. Każda z kolonii uzyskana na płycie jest inna, a mutacja może pojawić się w jednej kolonii na kilkaset. Przykładowy eksperyment screeningu trwałych mutantów polegałby na wielokrotnym pasażowaniu kolonii metodą replik na podłoża nie zawierające EO/EEP, po czym ponownym sprawdzeniu ich wzrostu na podłożu suplementowanym tymi związkami. Spontaniczne mutacje w naturze są bardzo rzadkie, dlatego aby zwiększyć prawdopodobieństwo uzyskania mutantów, komórki dodatkowo traktuje się związkiem mutagennym, np. EMS (metanosulfonian etylu) bądź poddaje działaniu światła UV. Gdyby po pasażach którakolwiek kolonia była zdolna do wzrostu, świadczyłoby to o zaistnieniu trwałej mutacji, którą należałoby ujawnić za pomocą sekwencjonowania. Jednak najbardziej pożądanym wynikiem, ze względu na skuteczność produktów pochodzenia naturalnego, byłby brak możliwości indukowania takich mutacji.

Eksperymenty przedstawione w punktach 3.3.2.2, 3.3.4, 3.3.5. oraz 3.4 zostały wykonane podczas pobytu na dwumiesięcznym, zagranicznym stażu naukowym w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej, Flamandzkiego Instytutu Biotechnologii na Wydziale Nauki na Uniwersytecie Katolickim w Leuven w Belgii.

### **3.5. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych**

Olejki eteryczne stanowią bardzo złożoną mieszaninę, której skład zależy od wielu czynników. Istnieją już liczne doniesienia dotyczące właśnie składu najpopularniejszych z nich, jednak ze względu na duże zróżnicowanie takich produktów wciąż istotna jest ocena składu olejków, które są obiektem aktualnych badań. W tym celu zastosowano chromatografię gazową sprzężoną z detekcją mas typu TOF.

Obecność (bądź jej brak) poszczególnych komponentów mieszaniny wykonywano porównując uzyskane widma masowe z widmami w bazie danych NIST (National Institute of Standards and Technology). W Tabeli 3. 23 przedstawione zostały składy chemiczne sześciu olejków eterycznych najbardziej aktywnych wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz ich udział procentowy w mieszaninie. Stężenie procentowe danego związku określone zostało jako stosunek powierzchni pod pikiem określonego związku do powierzchni wszystkich pików występujących na chromatogramie. Nie jest to metoda idealna, gdyż różne związki mogą wykazywać różne oddziaływania z fazą stacjonarną, a przez to dawać odmienną odpowiedź. Idealne rozwiązanie wymagałoby sporządzenia analizy, z zastosowaniem każdego wzorca

związku występującego w mieszaninie dla przynajmniej pięciu stężeń w trzech powtórzeniach, wykonanie krzywych kalibracyjnych, a dopiero na ich podstawie możliwe byłoby wyznaczenie faktycznego udziału procentowego każdego składnika w roztworze. Jednak ze względu na to, że olejki eteryczne są bardzo złożonymi mieszaninami, w skład których wchodzić może nawet kilkaset związków, takie podejście wydaje się nierealne, a metoda oznaczania stężenia procentowego na podstawie pola powierzchni pod pikiem, mimo swojej niedoskonałości, jest powszechnie akceptowana i stosowana w piśmiennictwie. Natomiast zastosowanie bardzo nowoczesnej kompleksowej dwuwymiarowej chromatografii gazowej z detekcją masową pozwoliło na bardzo dokładną ocenę jakościową.

Uzyskane wyniki wskazują, że w skład olejku tymiarkowego wchodzi przede wszystkim mircen i terpinen, co nie jest zgodne z danymi literaturowymi. Zawartość tymolu, który powinien stanowić główny składnik olejku tymiarkowego, wyznaczono na 1,75 %. Wynik ten nie jest satysfakcjonujący, gdyż olejek tymiarkowy wykazywał w badaniach bardzo dobre aktywności przeciwgrzybowe, które powinny raczej, jak wspomniano we wstępie, wynikać z zawartości związków fenolowych, których tymol jest przedstawicielem. Mircen oraz terpinen są prostymi monoterpenami, nie zawierającymi żadnych dodatkowych ugrupowań chemicznych, dlatego mało prawdopodobne wydaje się być, że tak wysokie aktywności przeciwdrobnoustrojowe mogą wynikać z ich obecności. Mogą one natomiast wraz z innymi składnikami mieszaniny wywoływać efekt synergistyczny, czyli wzmocnionego działania.

**Tabela 3. 23.** Skład chemiczny testowanych olejków eterycznych oznaczony metodą chromatografii gazowej z detekcją masową

Związek	Powierzchnia pod pikiem					
	Tymiarkowy	Cytrynowy	Geraniowy	Cynamonowy	Bazyliowy	Goździkowy
2-amyllofuran			0,01			
2-bornanon					4,62	
3,7-tlenek linalolu			0,1			
Acetofenon				1,02		
Aldehyd 2-metoksybenzoesowy				0,23		
Aldehyd anyżowy					0,46	
Aldehyd benzoesowy				24,6		
Aldehyd cynamonowy				42,79	0,87	0,19
Aldehyd salicylowy				2,57		
Alkohol feniloetylowy			2,66	0,69		
Alloaromadendren			0,02			
Anetol					0,82	
$\alpha$ -Pinen			3,44			
Aromadendren				0,16		
Benzenopropanal				0,26		
Benzofuran				0,15		
Bergamoten				0,06	6,65	
Borneol				0,61		
Bornylen			8,21			

	Powierzchnia pod pikiem					
Związek	Tymiankowy	Cytrynowy	Geraniowy	Cynamonowy	Bazyliowy	Goździkowy
Bourbonen			1,14	0,17	0,09	
cis-octan geranylu			0,31			
Cykloizosatiwen				0,26		
Cymen	1,14		2,52	2,48	2,68	0,1
Cymenen		0,51				
Cytral		53,85	0,02		0,29	
Cytronelol			11,94			
Dekan						0,13
Endo-borneol					0,99	
Epoksyocymen					0,39	
Estragol	0,02	0,11		0,16	6,18	0,06
Eter metylowy karwakrolu	0,42	0,16				
Eugenol						68,24
Eukaliptol					35,44	
Exo-fenchol					3,04	
Farnezen					0,18	
Fellandren	0,67	0,46	0,3			
Furfural				0,23		
Fytan						0,01
Geraniol			2,99			
Heptan						0,67
Herboxydu drugorzędowy izomer			0,16			
Humulen	0,01		0,17			9,09
Kadinen	0,01				0,25	0,33
Kalmenen			0,19			
Kamfen	1,27	0,64	0,34	1,86	2,25	
Kamfora	0,4				8,75	
Karen		0,02			0,06	
Karweol						
Karwomenton	0,08	0,4				
Karyofylen	0,2					14,47
Kopaen			0,4	1,29	0,07	0,61
Limonen	0,12	5,29				0,45
Linalol	0,96		10,51			
Linalol o			0,77			
Mentol			0,01			
Metyloeugenol					0,13	
Mircen	34,35	0,7	0,11		0,24	
Mrówczan bornylu				0,32		
Mrówczan cytronellylu			13,2			
Mrówczan feniloetylu				0,76		
Mrówczan feniloetylu			0,54			
Mrówczan geraniolu			5,02			

Związek	Powierzchnia pod pikiem					
	Tymiankowy	Cytrynowy	Geraniowy	Cynamonowy	Bazyliowy	Goździkowy
Murolen				0,31		
Octan bornylu				0,07		
Octan cynamylu				0,13		
Octan izobornylu					3,01	
Ocymenten			0,49		3,2	
Oktadekan		0,02				
Okten-3-ol	0,88					
Pinen	2,61	0,05	0,04	1,02	1,36	
Piperiton		0,14				
P-ment-2,8-dien-1-ol		0,33				
P-menton			17,85			
Propionian cytronellylu			0,05			
Różany tlenek a			5,59			
Różany tlenek b			1,93			
Sabinen	0,02				0,04	
Safrol				0,11		
Styren				8,45		
Sulkaton			0,15	0,47		
Terpinen	46,55	4,49	0,03		0,32	
Terpinen-4-ol					0,15	
Terpineol			0,91			
Terpinolen		4,57				
Tetrahydrogeraniol			0,02			
Tlenek limonenu	0,97					
Tlenek linalolu					5,64	
Toluen						3,41
Tymol	1,75	0,11				
Inne	8,55	27,18	7,85	8,77	11,82	2,25

Zgodnie z oczekiwaniami, olejku cytrynowym głównym składnikiem jest cytral oraz limonen. Cytral posiadający ugrupowanie aldehydowe może wpływać na wysoką aktywność tego olejku.

Analiza składu chemicznego olejku geraniowego wykazała obecność ponad 300 związków. W tabeli 3.21 została przedstawiona lista tych, których podobieństwo do widm masowych związków wzorcowych obecnych w bazie NIST wynosi minimum 80% oraz takich, których zawartość procentowa w mieszaninie wynosi minimum 0,01%. Największe stężenie procentowe oznaczono dla cytronelolu, mrówczanu cytronelolu i linalolu, co jest zgodne z danymi literaturowymi. W mieszaninie obecny jest także geraniol w stężeniu niecałe 3% oraz jego pochodne.

Analiza wykazała także bogaty skład olejku bazyliowego, w którym przewagę stanowi eukaliptol (ponad 35%). Dane literaturowe także wskazują na obecność tego związku w olejku bazyliowym choć w znacznie mniejszym stężeniu. Ponadto w mieszaninie znajduje się duża zawartość kamfory, tlenku linalolu, bergamotenu oraz estragolu.

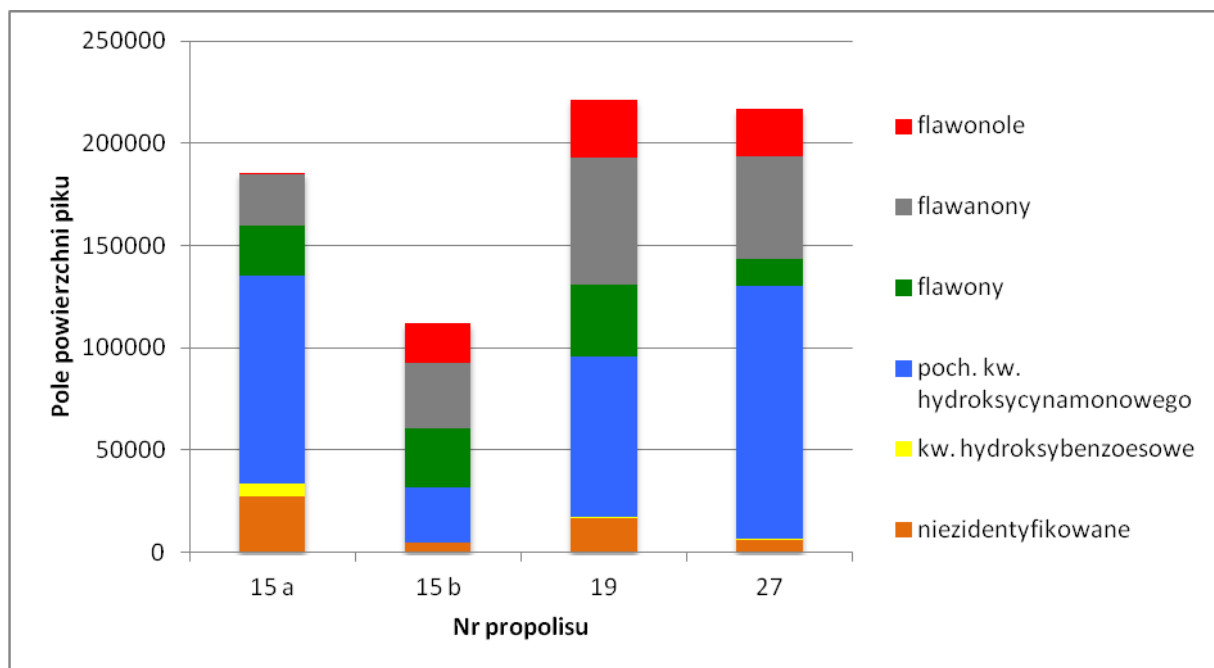
W skład olejków cynamonowego oraz goździkowego wchodzi zdecydowanie mniejsza ilość związków chemicznych. Analiza olejku cynamonowego wykazała największą zawartość aldehydu cynamonowego, który zarazem jest najbardziej aktywnym składnikiem mieszaniny. Ponadto w składzie tego olejku w dużych ilościach odnaleźć można benzaldehyd, niebędący żadnym z terpenów oraz liczne związki należące do grupy monoterpenu. Natomiast w skład olejku goździkowego wchodzi przede wszystkim eugenol (68% zawartości), który nadaje mu właściwości antyseptyczne oraz ostry charakterystyczny zapach.

### **3.6. Ocena składu chemicznego propolisów**

W ramach badań oceniono również skład chemiczny czterech ekstraktów etanolowych propolisów z podziałem na grupy występujących w nich związków. Na podstawie analizy widm UV oraz masowych dokonano podziału związków na 5 głównych grup: flawonole, flawanony, flawony, pochodne kwasu hydroksycynamonowego, kwasy hydroksybenzoesowe (Wyk. 3. 27). W ekstraktach stwierdzono także obecność związków, które ciężko było przypisać do którejkolwiek z wymienionych grup. We wcześniejszych badaniach określano także aktywność ekstraktów 50 zgromadzonych propolisów (w tym również czterech poniżej przedstawionych) wobec sześciu szczepów referencyjnych (*C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* DSM 11226, *C. albicans* Gu5 i B4 opornych na flukonazol oraz Gu4 i B3 wrażliwych na flukonazol). Stwierdzono, że propolis 15a nie posiada praktycznie żadnej aktywności (wszystkie wartości MFC powyżej 2,5%). Z pozostałych trzech EEP, 15b był najaktywniejszy, bardzo podobną aktywność wykazywał również EEP 27 (MFC w zakresie 0,3125 – 0,625% (v/v)), natomiast dla EEP 192 wartości MFC wynosiły 0,625 – 1,25% (v/v). Porównując aktywności i skład chemiczny propolisów można stwierdzić, że najmniej skuteczny (a właściwie całkowicie nieskuteczny) propolis 15a jest praktycznie pozbawiony związków z grupy flawonoli. Pozostałe trzy propolisys zawierają znacznie większą zawartość flawonoli, co koreluje z ich aktywnością. Dodatkowo z analizy można wywnioskować, że na aktywność ekstraktów propolisu nie wpływa zawartość



pochodnych kwasu hydroksycynamonowego, gdyż są one zawarte zarówno w propolisach aktywnych jak i nieaktywnym (EEP 15 a). Co ciekawe, ogólna zawartość związków organicznych (wyznaczona na podstawie pola powierzchni pod wszystkimi pikami) także nie koreluje z aktywnością, co widać na przykładzie porównania EEP 15 a (większa zawartość związków organicznych) i EEP 15 b (mniejsza zawartość związków organicznych i większa aktywność). Jednak aby w pełni określić zależność aktywności od obecności i zawartości poszczególnych grup związków chemicznych wskazane byłoby przeprowadzenia analizy składu większej liczby ekstraktów, zarówno tych o stwierdzonej niskiej jak i wysokiej skuteczności.



**Wyk. 3. 28.** Skład chemiczny ekstraktów etanolowych propolisów z podziałem na grupy występujących w nich związków. Analiza składu została wykonana na podstawie kształtu widm UV i obecności charakterystycznych jonów molekularnych w widmach masowych

## DYSKUSJA

W przedstawionej rozprawie doktorskiej można wyodrębnić dwa główne nurty pracy, obydwa jednak dotyczące związków wykazujących aktywność przeciwko drożdżakom z rodzaju *Candida*. Pierwszy wątek dotyczył oceny aktywności w warunkach *in vitro* dziewięciu leków przeciwgrzybowych, które w określonych sytuacjach mogą być zastosowane w terapii infekcji grzybiczych. Jako, że grupą leków pierwszego wyboru, ze względu na niewielką toksyczność dla gospodarza, są azole, a ich nadużywanie nieuchronnie prowadzi do nabywania przez mikroorganizm oporności, podjęto badania których celem była ocena mechanizmów oporności na azole wśród izolatów grzybowych od pacjentów z polskich szpitali. Badania te prowadzone były w ramach grantu „Mechanizmy oporności na leki z grupy azoli wśród krajowych, klinicznych izolatów drożdży z rodzaju *Candida*” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem był dr inż. Piotr Szweda. Jednym z ważnych wniosków podsumowujących wykonane w tym projekcie badania było to, że wśród krajowych izolatów *Candida* istnieje oporność na leki z grupy azoli lecz w mniejszym stopniu niż początkowo zakładano. Niektóre leki o aktywności przeciwgrzybowej wykazują wysoką toksyczność dla pacjenta, na inne natomiast mikroorganizmy mogą stosunkowo szybko nabywać oporność, dlatego też narodziła się idea poszukiwania produktów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej w źródłach naturalnych. Drugi główny nurt pracy dotyczył właśnie aktywności oraz mechanizmów działania produktów pochodzenia naturalnego, a badania wykonywane były w ramach projektu „Olejki eteryczne, propolis oraz nanocząstki srebra i miedzi jako alternatywa lub czynnik wspomagający dla konwencjonalnej terapii i profilaktyki infekcji wywołanych przez drożdże z rodzaju *Candida*” zakwalifikowanego do programu Preludium 8, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. W obydwu projektach do badań aktywności leków jak i PPN zastosowano tę samą kolekcję izolatów klinicznych z rodzaju *Candida*, a pojedyncze izolaty odporne na azole posłużyły do badań aktywności leków w synergizmie z PPN bądź aktywności wobec biofilmu.

Celem badań prowadzonych w ramach pierwszego wspomnianego projektu było poznanie mechanizmów lekooporności drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz ocena aktualnego stanu lekooporności szczepów izolowanych od pacjentów z polskich szpitali. Przeprowadzone badania pokazują, że problemem jest występowanie oporności na flukonazol, która pojawia się zarówno w przypadku gatunku *C. glabrata* (22% populacji oporna na chemoterapeutyk) jak i *C. albicans*. Jednak w przypadku tego drugiego gatunku, zaklasyfikowanie do grup wrażliwości jest zdecydowanie bardziej problematyczne, w większym stopniu zależy od zastosowanego testu diagnostycznego oraz czasu od momentu izolacji szczepu od pacjenta po jakim wykona się oznaczenie. Grupa 43 izolatów ze szpitala w Warszawie wg pracowników przyszpitalnego laboratorium analitycznego składała się wyłącznie z izolatów opornych na flukonazol. Testowana grupa szczepów izolowana była bezpośrednio od pacjentów leczonych flukonazolem, a oporność na ten lek oznaczana była tzw. E-testem. W następnym etapie, wrażliwość izolatów określana była przede mnie testem Sensititre, w wyniku czego 29 szczepów określono jako odporne na FL. Ostatecznie wrażliwość testowano metodą

mikrorozcieńczeniową rekomendowaną przez CLSI, w wyniku czego 5 szczepów oznaczono jako odporne na FL. Grupa 104 izolatów *C. albicans* izolowanych od pacjentów ze szpitala we Wrocławiu nie była wstępnie charakteryzowana E-testem. Badania z zastosowaniem testu Sensititre pozwoliły określić oporność na FL dla 19 izolatów, natomiast w przypadku zastosowania metody zalecanej przez CLSI tylko dwa okazały się być odporne. Badane szczepy były pasażowane oraz odmładzane na podłożu stałym YPD bez dodatku flukonazolu, a więc czynnika dla nich stresującego. Analiza powyższych wyników wskazuje, że szczepy izolowane bezpośrednio od pacjentów leczonych flukonazolem, a więc będące pod wpływem przejściowego stresu, wykazują również przejściową (w większości przypadków) obniżoną wrażliwość na FL. Oporność ta mija z czasem, gdy komórki nie są poddane ekspozycji na czynnik stresujący (flukonazol). Przy ostatecznej analizie zaledwie niewielka część izolatów wykazuje trwałą, dziedziczną oporność, która z wysokim prawdopodobieństwem wynika z mutacji w obrębie czynnika transkrypcyjnego TAC1, która powoduje konstytutywną ekspresję genów *CDR*. Dodatkowego komentarza wymaga także użyteczność zastosowanych testów diagnostycznych. E-testy są stosunkowo proste i szybkie w wykonaniu, jednak uzyskany wynik jest najmniej precyzyjny i najmniej wiarygodny. Test Sensititre jest również stosunkowo prosty w wykonaniu, nie ma potrzeby sporządzania roztworów chemoterapeutyków w wymaganych stężeniach, wynik odczytuje się na podstawie zmiany zabarwienia zawiesiny w studzienkach, co eliminuje konieczność stosowania dodatkowej aparatury takiej jak czytnik płytek. Wiele doniesień literaturowych potwierdza skuteczność tej metody i zgodność wyników z innymi stosowanymi metodami diagnostycznymi, jednak w mojej opinii nie dotyczy to analizy wrażliwości gatunku *C. albicans* na leki z grupy azoli. Jest to metoda bardzo czuła, w której zmiana zabarwienia zawartości studzienki pojawia się już przy minimalnym wzroście drobnoustroju, nawet przy wysokim stężeniu leku, co w przypadku gatunku *C. albicans* określane jest mianem tzw. ogonowania. Może ono skutkować uzyskiwaniem fałszywie wysokich wartości MIC i klasyfikacją szczepów jako odporne, tymczasem w praktyce klinicznej obserwuje się, że izolaty ze zjawiskiem ogonowania odpowiadają na leczenie raczej jak szczepy wrażliwe na lek (Revankar et al., 1998). Problemu tego nie odnotowano natomiast w przypadku gatunku *C. glabrata*. Metoda mikrorozcieńczeniowa jest zdecydowanie najbardziej czasochłonna i pracochłonna, jednak uzyskane wyniki są zdecydowanie najbardziej miarodajne. Dlatego też jeżeli celem badań jest dalsza charakterystyka szczepów opornych, najbardziej racjonalne jest stosowanie metody rekomendowanej przez CLSI.

Wśród szczepów izolowanych od pacjentów obserwowano także istnienie oporności krzyżowej na wszystkie chemoterapeutyki z grupy azoli. Źródła literaturowe wskazują, że utrata wrażliwości na jeden lek w wyniku długotrwałej ekspozycji na jego działanie może powodować nabywanie oporności na inny z danej grupy nawet, gdy komórki drożdżaka nie były wcześniej poddawane jego działaniu. Leki z grupy echinokandyn, a także 5-fluorocytozyna i amfoterycyna B wydają się być wciąż skuteczne, co wynika prawdopodobnie z ich rzadkiego stosowania, lecz w grupie przebadanych szczepów znalazły się pojedyncze, które wykazywały wysoką oporność na echinokandyny oraz 5-fluorocytozynę. Jednak echinokandyny są uważane za znacznie

bardziej toksyczne niż powszechnie stosowany flukonazol, a 5-fluorocytozynę, na którą mikroorganizmy stosunkowo szybko nabywają oporność, należy stosować w formie terapii kombinowanej wraz z innymi lekami (Keele et al., 2001).

Jednoznaczne wyjaśnienie istnienia oporności we wszystkich szczepach jest wciąż trudnym zadaniem. Na podstawie wyników uzyskanych z przeprowadzonych badań można stwierdzić, że mechanizmy oporności różnią się w zależności od gatunku. Szczególną rolę w nabywaniu oporności gatunku *C. glabrata* odgrywa nadekspresja genów kodujących pompy *CDR1* usuwających lek poza komórkę. Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Abbes i in., wskazując nadekspresję genów transporterów z rodziny ABC jako kluczową w nabywaniu oporności gatunku *C. glabrata* (Abbes et al., 2013). Vermitsky i Edlind. stwierdzili 6 -15 krotną nadregulację genu *CDR1* w 10 z 12 izolatów opornych na flukonazol (Vermitsky & Edlind, 2004). Także inni autorzy potwierdzają, że oporność *C. glabrata* wynika z nadekspresji genów kodujących transportery typu ABC (geny *CDR1* oraz *PDH1* i *SNQ2*), która z kolei wynika z ciągłej nadregulacji przez hipaeraktywną formę czynnika transkrypcyjnego PDR1.

Ciekawe jest to, że poziomy ekspresji takich genów jak *ERG11*, który uczestniczy w biosyntezie ergosterolu czy *MDR1*, kodującego pompy wypompowujące leki z komórki nie mają realnego wpływu na poziomy lekowrażliwości. W przeprowadzonych badaniach zaledwie 5 izolatów opornych wykazywało podwyższony poziom ekspresji genu *ERG11*, a 18 zdecydowanie obniżony. Jest to także sprzeczne z naszymi oczekiwaniami, gdyż nadekspresja genu *ERG11* jest w literaturze często wymieniana jako jeden z potencjalnych mechanizmów lekooporności. Przykładowo Marichal i wsp., oszacowali ośmiokrotny wzrost ekspresji *ERG11* w szczepach opornych na flukonazol w stosunku do wrażliwych (Timmerman et al., 1997). Z drugiej strony Abbes i in. określili, że nadekspresja genu *ERG11* nie ma znaczenia w nabywaniu oporności *C. glabrata* (Abbes et al., 2013). Także Vermitsky i wsp. nie odnotowali znaczącej zmiany w poziomach ekspresji genu *ERG11* u *C. glabrata* opornych na FL (Vermitsky & Edlind, 2004)

Także występowanie mutacji punktowych genu *ERG11* nie tłumaczy fenomenu zyskiwania oporności *C. glabrata*. W przeprowadzonych badaniach na grupie 43 szczepów *C. glabrata* uzyskanych od pacjentów poddanych leczeniu flukonazolem ze szpitali w Gdańsku i Warszawie nie stwierdzono istnienia żadnych mutacji punktowych w sekwencji aminokwasowej produktu tego genu. Jednak w literaturze występują pojedyncze doniesienia mówiące o możliwości wpływu takich substytucji na zjawisko oporności *C. glabrata*. Przykładowo, Nabili i in. w badaniach z zastosowaniem modelowania molekularnego stwierdzili, że substytucja G236V w miejscu wiązania oraz substytucje H146Q i D234E w pobliżu miejsca wiązania triazoli z dużym prawdopodobieństwem mogą się przyczyniać do rozwoju oporności (Nabili et al., 2016). Natomiast brak zmian w obrębie Erg11p stwierdził zespół badawczy Silva (dos Santos Silva et al., 2016). Również Whaley i wsp. w pracy przeglądowej wskazali, że mutacje w genie *ERG11* dotyczą przede wszystkim gatunków *C. albicans*, *C. parapsilosis* oraz *C. tropicalis* i raczej nie występują w gatunku *C. glabrata* (Whaley et al., 2017).

W przypadku izolatów *C. albicans* przyczyna oporności jest bardziej złożona. W roku 1995 Prasad i wsp. po raz pierwszy scharakteryzowali rolę genu *CDR1* w nabywaniu oporności na azole (Prasad et al., 1995) natomiast w roku 1997 Sanglard i in. opisali znaczenie genu *CDR2* (Sanglard et al., 1997). Od tamtej pory, doniesienia dotyczące korelacji pomiędzy nadekspresją obydwu genów a opornością gatunku *C. albicans* na azole są bardzo liczne. W bazie danych *Candida* Genome Database wyróżnionych jest blisko 400 publikacji dotyczących powiązania obydwu opisywanych genów z opornością na azole. Dodatkowo zespół badawczy Niimi wykazał, że nadekspresja genów *CDR1* przyczynia się do oporności *C. albicans* także na inne niż flukonazol związki, niekoniecznie strukturalnie powiązane takie jak terbinafina, brefeldina A, cerulenina i nigeryna, a także inne z grupy azoli, ale nie na antybiotyki polienowe (M. Niimi et al., 2004) czy echinokandyny (K. Niimi et al., 2006). Prasad i in. w pracy przeglądowej z 2015 roku wyliczają, że substratami dla pomp Cdr1p mogą być również leki przeciwnowotworowe, steroidy, lipidy, herbicydy, związki pochodzenia roślinnego, antybiotyki i barwniki fluorescencyjne (Prasad et al., 2015).

Nadekspresja genów kodujących pompy wielolekowe może pojawiać się również w parze z mutacjami w genie *ERG11*. Przykładowo Chen i in. określili, że oporność może wynikać z nadekspresji genów *CDR1* i *CDR2* wraz z jednoczesnym występowaniem mutacji G487T i T916C w obrębie genu *ERG11* (Chen et al., 2010). W przeciwieństwie do gatunku *C. glabrata*, mutacje w obrębie genu *ERG11* u gatunku *C. albicans* są bardzo powszechne, a w literaturze są często wskazywane jako kolejny możliwy mechanizm oporności. W odniesieniu do najnowszych badań, Xiang i współpracownicy oznaczyli w sekwencji genu *ERG11* w grupie 23 izolatów *C. albicans* 17 mutacji skutkujących zmianami w sekwencji aminokwasowej, z czego 7 nie było dotychczas opisanych w literaturze (K143Q, Y205E, A255V, E260V, N435V, G472R i D502E). Za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej oznaczyli oni, że 5 mutacji w znaczący sposób podwyższa oporność na flukonazol bądź worykonazol (przynajmniej czterokrotnie), natomiast nie mają większego wpływu na oporność na itraconazol (Xiang et al., 2013). Podobnie wprowadzenie pojedynczej mutacji (jako mutacji homozygotycznej) spośród Y132F, K143R, F145L, S405F, D446E, G448E, F449V oraz G450E do szczepów wrażliwych na flukonazol powodowało przynajmniej czterokrotny wzrost oporności na lek (Flowers et al., 2015).

Kolejny zespół stwierdził istnienie mutacji A114S oraz Y257H pojawiających się wyłącznie wśród izolatów *C. albicans* opornych na flukonazol (Xu et al., 2015). Dodatkowo zespół sprawdził czy w grupie tych izolatów występuje nadekspresja genów oporności (*CDR1*, *CDR2*, *ERG11*, *MDR1*, *FLU1*). Stwierdzono, że ekspresja części genów jest podwyższona, a części obniżona bądź nawet ledwie wykrywalna. Świadczyć to może o tym, że to właśnie zmiany w obrębie Erg11p mogą stanowić bardzo prawdopodobną przyczynę oporności na azole, szczególnie wśród szczepów, u których nie da się jej wyjaśnić nadekspresją genów warunkujących oporność (Xu et al., 2015).

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań nie potwierdzają, aby któraś ze zidentyfikowanych mutacji miała realny wpływ na nabywanie oporności na flukonazol przez

szczyty *C. albicans*, które badałam. Bardzo często występujące mutacje E266D i V488I pojawiały się zarówno w szczepach wrażliwych jak i niewrażliwych na flukonazol, co jest zgodne z danymi literaturowymi. Część mutacji pojawiła się tylko w szczepach zaklasyfikowanych jako wrażliwe. Były też takie, które występowały tylko w izolatach oznaczonych jako odporne na flukonazol. Były to substytucje D153E, R163K oraz K342R. Obecność mutacji D153E w szczepie opornym jednocześnie na flukonazol, worykonazol i itrakonazol zaobserwowali Rosana i in. (Rosana et al., 2015). Istnienie tej samej mutacji wśród izolatów o obniżonej wrażliwości na flukonazol stwierdzili Wang i wsp. (Wang et al., 2009). Natomiast Marchial i in. stwierdzili jej obecność również w szczepie wrażliwym na FL. Podobnie substytucja K342R również stwierdzona była w izolacie wrażliwym na FL (Goldman et al., 2004). Natomiast rola mutacji R163K w oporności na flukonazol nie jest jeszcze opisana w literaturze.

W badaniach dotyczących nadprodukcji genów kodujących pompy typu ABC wśród szczepów opornych na FL szczególnie istotna okazała się prawidłowa diagnostyka grup wrażliwości. Przy zastosowaniu najbardziej miarodajnej metody do grupy szczepów opornych na FL (ze szpitala w Warszawie) zaliczono izolaty o numerach 30, 48, 572, 1002, 1026, z których wszystkie poza numerem 572 wykazywały podniesiony poziom ekspresji genu *CDR1*, a numery 30, 1002, 1026 dodatkowo wykazywały szczególnie wysoki poziom ekspresji genu *CDR2*. Natomiast szczep *C. albicans* 572 został oznaczony jako oporny, a pomimo to miał obniżoną ekspresję porównywanych genów. W jego przypadku zidentyfikowano występowanie dwóch mutacji V112I oraz G450R w obrębie genu *ERG11*, jednak w pojedynkę występowały one również w szczepach wrażliwych. W przypadku niektórych szczepów można zaobserwować jednoczesne występowanie nadekspresji genów *CDR1*, *CDR2* i *ERG11* wraz z występowaniem mutacji punktowych. Są to przykładowo izolaty 30 (substytucja V112I) oraz 1026 (substytucje V112I oraz G450R). Uzyskane rezultaty świadczą o tym, że oporność w największym stopniu tłumaczona jest trwałą ekspresją genów kodujących pompy wielolekowe. Mutacje w genie *ERG11* mają zdecydowanie ograniczone znaczenie, ponieważ często identyfikowane są równolegle w szczepach wrażliwych na FL. Zdarzają się także przypadki w których, obniżona wrażliwość na lek nie jest tłumaczona żadnym z proponowanych w literaturze mechanizmów. Świadczy to o tym, że najprawdopodobniej istnieją jeszcze inne niż poznane dotychczas i opisywane w literaturze mechanizmy oporności.

Celem badań prowadzonych w ramach drugiego realizowanego projektu był screening produktów pochodzenia naturalnego, wykazujących właściwości przeciwdrobnoustrojowe, które mogłyby stanowić pewną alternatywę dla leków stosowanych w terapiach przeciwgrzybiczych. Poszukiwanie nowych możliwości poprawy skuteczności obecnie stosowanych terapii przeciwgrzybowych jest interesującym celem wielu zespołów naukowych na świecie. Naturalne produkty stanowią niewyczerpane źródło związków o silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Dodatkowo rozpoczęto również badania nad mechanizmami działania tego typu produktów.

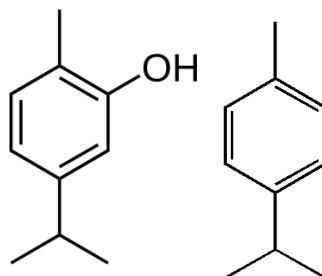


Szczególnie interesującą grupą związków okazały się olejki eteryczne ze względu na ich wysokie aktywności oraz złożony mechanizm działania wynikający z bogatego składu mieszaniny. Spośród 38 olejków eterycznych wybrano sześć o największej aktywności: tymiankowy, cytrynowy, geraniowy, cynamonowy, bazyliowy oraz goździkowy. Stężenia, które hamowały wzrost drożdżaków z rodzaju *Candida* nie przekraczały 1,25% (v/v). Zalecane stężenia olejków eterycznych w różnych rodzajach preparatów do inhalacji bądź materiałach stosowanych jako opatrunki na rany mieszczą się w przedziale od 1 do 5%. Wartości MIC testowanych olejków znajdują się w tym zakresie, dlatego mogłyby stanowić świetny substrat do produkcji tego typu wyrobów. Dodatkowo stwierdzono bardzo wysoką aktywność olejku cynamonowego z kory, ze stężeniem hamującym wzrost wszystkich przebadanych szczepów nie wyższym niż 0,125%, a dla ponad połowy przebadanych izolatów było ono niższe niż 0,002%. Głównym składnikiem olejku cynamonowego jest aldehyd cynamonowy, któremu przypisuje się rolę w hamowaniu aktywności syntazy  $\beta$ -1,3-glukanu oraz syntazy chityny (Bang et al., 2000). Testy porównujące aktywność olejku cynamonowego i aldehydu cynamonowego potwierdzają, że tak duża aktywność olejku wynika przede wszystkim z obecności w składzie aldehydu cynamonowego. Jednak dalsze eksperymenty z preparatem rozcieńczonym z kilkudniową inkubacją wykazały, że aldehyd cynamonowy wykazuje przede wszystkim działanie grzybobójcze, a olejek cynamonowy działanie grzybobójcze. Wynika to najprawdopodobniej z równoległego działania aldehydu oraz innych związków zawartych w tym produkcie.

Skład chemiczny olejku cynamonowego oraz pięciu pozostałych produktów wykazujących obiecujące aktywności, oznaczono z zastosowaniem chromatografii gazowej z detektorem spektrometrii mas. Stwierdzono, że w skład olejku tymiankowego wchodzi przede wszystkim terpinen, mircen oraz tymol, olejku cytrynowego limonen i cytral, olejku geraniowego menton, cytronelol, linalol i geraniol, a w olejku cynamonowym poza wspomnianym aldehydem cynamonowym w dużej ilości znajduje się też benzaldehyd. W składzie olejku bazyliowego w dużych ilościach występują eukaliptol, estragol i kamfora, a w olejku goździkowym eugenol, kariofilen i humulen.

Jak pokazano na przykładzie olejku cynamonowego aktywność danego olejku może wynikać z aktywności głównego składnika. Nie jest to jednak regułą. W niektórych przypadkach większe znaczenie ma obecność związków chemicznych zawierających specyficzne ugrupowania funkcyjne. Tak jak wspomniano na przykładzie olejku tymiankowego to raczej tymol odgrywa decydującą rolę w aktywności niż inne związki o budowie alifatycznej bez dodatkowych ugrupowań. Większość terpenów, rozumianych jako związki chemiczne zawierające rdzeń węglowodorowy bez dodatkowych ugrupowań (czasami określenie terpeny bywa niepoprawnie stosowane zamiennie z określeniem terpenoidy) nie ma znaczącego wpływu na aktywność przeciwdrobnoustrojową (Bagamboula et al., 2004). Wśród terpenów do najpopularniejszych należą cymen, limonen, terpinen, sabinen, pinen. (Dorman & Deans, 2000) Dorman i in. określili, że gdy są one stosowane w pojedynkę wykazują wobec bakterii bardzo niskie lub wręcz zerowe aktywności. Nieco inaczej sprawa przedstawia się dla terpenoidów, związków które posiadają dodatkowy atom tlenu w postaci grupy funkcyjnej. Najbardziej

znanyymi terpenoidami są tymol, karwakrol, linalol, mentol, geraniol, octan linalolu, linolelal czy piperiton. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa tych związków powiązana jest z grupą funkcyjną i zależy od obecności grupy hydroksylowej w pierścieniu fenolowym oraz obecności delokalizowanych elektronów. Przykładowo karwakrol wykazuje zdecydowanie większą aktywność niż identyczny strukturalnie terpen p-cymen, nie posiadający grupy hydroksylowej (Rys. 1) (Ben Arfa et al., 2006; Ultee et al., 1999).



Rys. 1 Wzory strukturalne karwakrolu i p-cymenu

Zmiana pozycji grupy hydroksylowej tak jak ma to miejsce w przypadku karwakrolu i jego izomeru konstytucyjnego tymolu nie wpływa na aktywność tych związków (Lambert et al., 2001).

W badaniach screeningowych 50 ekstraktów propolisów pszczelich stwierdzono, że większość z nich wykazuje obiecujące aktywności wobec *C. albicans* oraz *C. glabrata*. W większości przypadków stężenia uzyskanych preparatów wykazujące efekt bójczy wynosiły 0,3125 – 0,625% (v/v), jednak zdarzały się też ekstrakty, dla których wartość MFC wynosiła > 2,5%. Wyliczona gęstość preparatów EEP stosowanych w moich badaniach wynosiła 170 mg/ml. Oznacza to, że stężenie 2,5% (v/v) odpowiada wartości 4200 µg/ml, a przeważający zakres stężeń wywołujący efekt bójczy (0,3125 – 0,625% (v/v)) odpowiada wartościom 530 - 1060 µg/ml. Uzyskane aktywności ekstraktów propolisów pochodzących z Polski są zatem porównywalne do aktywności EEP pochodzących z różnych rejonów geograficznych świata, co potwierdzono w pracach innych autorów. Przykładowo Siqueira i wsp. wykazali, że stężenia bójcze czerwonego propolisu brazylijskiego wynoszą 64-512 µg/ml dla *C. albicans* i 64-256 µg/ml dla *C. glabrata*. Grupa Tobaldiniego określała stężenia hamujące wzrost dla zielonego propolisu brazylijskiego, które mieściły się w zakresie 220 do 880 µg/ml. Bardzo dobrą skuteczność brazylijskich EEP stwierdzili również inni badacze (Freires et al., 2016; Pippi et al., 2015; Dota et al., 2011), natomiast grupa Pina zastosowała brazylijski EEP z sukcesem do leczenia kandydozy jamy ustnej (Pina et al., 2017). Haghdoost i in. badali aktywność propolisu irańskiego. Wartości MIC i MFC wobec szczepu *C. albicans* wynosiły dla nich odpowiednio 360 µg/ml i 1250 µg/ml (Haghdoost, et. al., 2016). Kolejne prace dotyczą aktywności propolisów argentyńskich (MFC w zakresie od 200 do 800 µg/ml) (Agüero et al., 2014) oraz z południowej Afryki (MFC od 147 do 3125 µg/ml) (Suleman et., 2015). Natomiast Massaro i wsp. donosili o braku aktywności propolisu ze wschodniej Australii wobec *C. albicans* ATCC 10231 (Massaro et al., 2015).



Stężenia EEP, przy których obserwowano efekt grzybostatyczny lub grzybobójczy były stosunkowo wysokie (sięgały 1,25% (v/v)), co nie byłoby akceptowalne w przypadku leków. Jednak należy tu dodać, że preparaty propolisów pszczelich posiadają szereg zalet, których brakuje lekom przeciwgrzybiczym. Wykazują one działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwpasożytnicze, przeciwzapalne, antyoksydacyjne, aktywność immunomodulacyjną, przeciwnowotworową, przyspieszają gojenie ran, działają przeciwbólowo (De Castro et al., 2013), nie będąc przy tym tak toksyczne jak część stosowanych leków przeciwgrzybowych, dodatkowo nie występuje wobec nich zjawisko oporności.

W kolejnych badaniach stwierdzono występowanie znaczącego synergizmu pomiędzy dwoma lekami z grupy azoli a ekstraktem propolisu. Aktywność synergistyczną brazylijskiego propolisu z flukonazolem zaobserwował zespół badawczy Pippi (Pippi et al., 2015). Nadużywanie leków przeciwdrobnoustrojowych często prowadzi do nabywania przez dany mikroorganizm oporności, a przez to konieczności stosowania coraz wyższych dawek leków, co zwiększa ryzyko występowania poważnych skutków ubocznych. Problem występowania oporności bardzo często występuje w odniesieniu do flukonazolu, który jest uważany za najmniej toksyczny z obecnie stosowanych leków przeciwgrzybowych, a zatem jest najczęściej stosowany. Dzięki zastosowaniu terapii kombinowanej, ze związkami pochodzenia naturalnego możliwe byłoby znaczne spowolnienie rozwoju zjawiska oporności na azole w tym flukonazol. Dodatkowo w związku z tym, że bardzo małe stężenia mogą znacząco obniżyć wartości MIC flukonazolu czy worykonazolu, koszty takiej terapii mogłyby być znacząco obniżone, pacjenci odczuwaliby mniej skutków ubocznych związanych z przyjmowaniem dużych dawek leków, a ponadto terapia taka byłaby bardziej przyjazna dla środowiska. Istotne jest także, że przy zastosowaniu flukonazolu w kombinacji z propolisem eliminuje się tzw. ogonowanie *C. albicans*. Polega ono na tym, że część komórek jest w stanie przeżyć nawet przy bardzo wysokich stężeniach zastosowanych leków, a przez to stać się przyczyną nawracających infekcji. Zomorodian i in. określili, że ogonowanie pojawia się nawet w 90% izolatów poddanych działaniu flukonazolu, ketokonazolu bądź itrakonazolu oraz w 78% izolatów traktowanych worykonazolem (Zomorodian et al., 2016). Eliminacja zjawiska „ogonowania” jest o tyle ważna, że *C. albicans* jest patogenem najczęściej przyczyniającym się do infekcji grzybiczych na azole, które są najpowszechniej stosowaną grupą leków w terapii. Między innymi ze względu na zjawisko „ogonowania”, terapia grzybic bywa nieskuteczna i skutkuje pojawianiem się szczepów opornych. Zastosowanie w terapii infekcji grzybiczych leków z grupy azoli wraz z ekstraktami propolisów z całą pewnością przyczyniłoby się do poprawy skuteczności takiej terapii i eliminowania sytuacji częstych nawrotów choroby.

W moich badaniach wykazałam, że EEP wykazują znacznie niższe aktywności w stosunku do komórek żyjących w biofilmie. Struktura ta jest jednym z kluczowych elementów wirulencji rodzaju *Candida*, a dodatkowo przyczynia się do zwiększonej oporności na leki. Stężenia EEP, które pozwalały na eradykację biofilmu w 50% wynosiły do 5% (8,5 mg/ml) lub w pojedynczych przypadkach powyżej. Oznacza to, że mogą być nawet kilka razy wyższe niż analogiczne stężenia w stosunku do formy planktonicznej. Jednak w przypadku stosowania

niektórych leków rozbieżności te mogą być dużo większe. Przykładowo Maiolo i in. określili, że MIC flukonazolu może być w stosunku do biofilmu nawet tysiąc razy wyższy niż dla formy planktonicznej. Ci sami autorzy stwierdzili także, że różnica skuteczności kaspofunginy w eradykacji biofilmu i eliminacji komórek planktonicznych jest dużo niższa. Stężenie  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  hamowało wzrost szczepów *Candida* w formie planktonicznej, natomiast do eradykacji biofilmu wymagane były stężenia od 2 do 16  $\mu\text{g/ml}$  dla *C. albicans* i *C. glabrata* oraz do 64  $\mu\text{g/ml}$  *C. krusei* i *C. parapsilosis* (Maiolo et al., 2014). Badania aktywności propolisów prowadzono także w innych zespołach badawczych. Przykładowo Capocci i in. wykazali, że EEP w stężeniu 273  $\mu\text{g/ml}$  hamował tworzenie biofilmu, natomiast Freires i wsp., że EEP w stężeniu 500  $\mu\text{g/ml}$  niszczył strukturę biofilmu uprzednio utworzonego przez szczepy *Candida* (Capocci et al., 2015; Freires et al., 2016) Dlatego też, uwzględniając niską efektywność leków przeciwgrzybowych w stosunku do komórek w biofilmie, ekstrakty propolisów wydają się być ciekawą alternatywą bądź uzupełnieniem terapii infekcji wywoływanych przez biofilmu *Candida* spp.

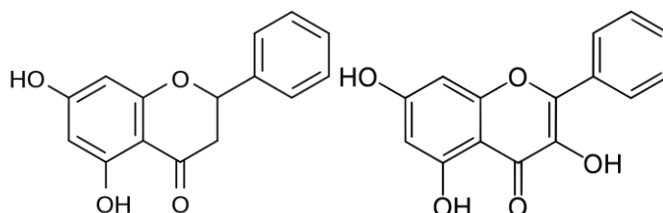
Rozpatrując możliwe mechanizmy aktywności badanych EEP i EO stwierdziłam, że najbardziej prawdopodobnym celem molekularnym obydwu grup związków jest błona komórkowa. Większy efekt na błonę wydają się jednak wywierać propolis pszczele. Wzrost wartości MIC wybranych EEP w podłożu suplementowanym ergosterolem był porównywalny do wzrostu uzyskanego dla amfoterycyny B, której celem molekularnym jest właśnie błona komórkowa. Zaobserwowano również wyraźny wpływ EEP na depolaryzację błony, zależny od zastosowanego stężenia. Olejki natomiast powodują znacznie większy wpływ jonów potasu. Z kolei ściana komórkowa stanowi raczej drugoplanowy cel obydwu grup związków. W eksperymencie z podłożem suplementowanym sorbitolem nie zaobserwowano znaczących różnic we wzroście wartości MIC w porównaniu do kontroli. Jednak wpływu EEP na ścianę komórkową nie można wykluczyć (sugerują to niektóre wyniki badań, które zostaną przedstawione w przyszłej publikacji).

Kolejnym niezwykle istotnym czynnikiem wirulencji jest „przełączanie fenotypowe (*ang. phenotypic switching*). Komórki *C. albicans* mają zdolność do odwracalnej przemiany z formy drożdżowej, w pseudogrzybnię lub grzybnię, co ułatwia im znacząco proces infekcji. Wydłużona forma mycelialna umożliwia adhezję do nabłonków gospodarza za pomocą białek stanu mycelialnego takich jak Als3 i Hwp1, ułatwia penetrację przez tkanki, a następnie dostanie się do układu krwionośnego. W naczyniach krwionośnych wydłużone formy nitkowe umożliwiają ucieczkę z makrofagów lub ich rozbicie. Forma mycelialna nie jest jednak niezbędna do procesu infekcji. Przykładowo gatunek *C. glabrata*, który nie tworzy grzybni, do adhezji stosuje białko Epa, sposób penetracji przez tkanki nie jest do końca wyjaśniony, natomiast stwierdzono, że gatunek ten może przeżyć we wnętrzu makrofagów i być za ich pośrednictwem transportowany do innych miejsc w organizmie gospodarza. Wyniki przez nas uzyskane wskazują, że zarówno propolis jak i olejki eteryczne efektywnie hamują transformację do pseudomycelium bądź mycelium w stężeniach subletalnych, co w przypadku gatunków tworzących grzybnię niewątpliwie wpływa na zmniejszenie inwazyjności patogenu. Wyniki te są zgodne z rezultatami otrzymanymi przez Haghdoosta i wsp., którzy stwierdzili efektywność

irańskiego propolisu w hamowaniu tworzenia mycelium przez gatunek *C. albicans* (Haghdoust et al., 2016).

Dodatkowo w badaniach stwierdzano wpływ olejków jak i propolisów na ekspresję genów kodujących pompy wielolekowe oraz ich obecność w błonie komórkowej. W początkowych założeniach zakładano, że bardzo wysoka aktywność flukonazolu w połączeniu z ekstraktem propolisu może wynikać ze zmniejszonej syntezy pomp. Jednak uzyskane rezultaty wskazują, że jest wręcz przeciwnie, a pomimo tego EEP ciągle zachowują wysoką aktywność zwłaszcza w synergizmie. Dlatego też wyjaśnienie synergizmu może być zupełnie inne. Prawdopodobnym wytłumaczeniem może być także to, że gdy komórki „zajmują się” wypompowywaniem składników ekstraktu propolisu, cząsteczki flukonazolu mogą znacznie efektywniej oddziaływać z celem molekularnym. W trakcie badań sprawdzano również za pomocą mikroskopii konfokalnej z zastosowaniem szczepu *C. albicans* produkującego białko fuzyjne *CDR1-GFP* wpływ na ilość pompy Cdr1p w błonie czterech olejków eterycznych (zdjęcia nie zostały przedstawione w tej pracy). Olejki tymiankowy, cytrynowy oraz bazyliowy również powodowały nadprodukcję pompy, lecz w znacznie mniejszym stopniu niż ekstrakty propolisów, natomiast fluorescencja szczepu traktowanego olejkami cytrynowym i bazyliowym była na poziomie kontroli szczepu nietraktowanego. Obserwacje te potwierdzają to, że wiele strukturalnie niepowiązanych związków chemicznych może być substratem dla pomp typu ABC.

Analiza składu chemicznego wykazała, że ekstrakty propolisów również stanowią bardzo złożoną mieszaninę. W skład każdego preparatu wchodziło blisko po sto związków, które w przeprowadzonej analizie zostały zaklasyfikowane do pięciu różnych grup: flawonole, flawanony, flawony, pochodne kwasu hydroksycynamonowego, kwasy hydroksybenzoesowe. Stwierdzono również, że grupą która ma największy wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową propolisów są flawonole. Podobne dane przedstawiane są w literaturze, natomiast flawonole najczęściej występujące w propolisach to przykładowo kwercetyna, kemferol, pinobanksyna, galangina. Kolejna grupa związków o niższej aktywności to flawanony. Strukturalnie są one bardzo podobne do flawonoli, jednak nie posiadają ugrupowania hydroksylowego na trzecim atomie węgla. Obecność właśnie tej grupy funkcyjnej w danym miejscu zdaje się mieć największy wpływ na aktywność przeciwdrobnoustrojową flawonoli. Na rysunku 2 przedstawiono strukturalne podobieństwo pinocembryny (flawanon) i galanginy (flawonol).



**Rys. 2** Wzory strukturalne pinocembryny i galanginy

Analiza składu chemicznego uwzględniająca wszystkie obecne w mieszaninie olejków czy też ekstraktów propolisów składniki nie odpowie jednak na pytanie, który ze związków na

pewno wpływa na aktywność preparatu, ale ewentualnie czy jego obecność może mieć wpływ na aktywność całego preparatu. Ponadto związki zawarte w mieszaninie mogą wzajemnie wywoływać efekt synergistyczny, niekoniecznie obecny przy zastosowaniu komponentów oddzielnie.

## PODSUMOWANIE

Reasumując powyższe zagadnienia można stwierdzić, że zjawisko oporności drożdży z rodzaju *Candida* izolowanych od pacjentów polskich szpitali na leki inne niż azole jest problemem stosunkowo rzadkim. Rozpatrując oporność izolatów *C. albicans* na leki z grupy azoli można stwierdzić, że problem ten faktycznie istnieje, jednak w mniejszym stopniu niż pierwotnie zakładano. Przejściowa oporność na flukonazol rozwija się w trakcie ekspozycji na działanie leku, co prawdopodobnie wiąże się z koniecznością zmiany sposobu leczenia przy długotrwałej terapii. Część izolatów wykazuje jednak trwałą dziedziczną oporność na FL, dlatego aby w takich przypadkach uniknąć błędnej klasyfikacji do grup wrażliwości oraz leczenia pacjentów lekiem od początku nieskutecznym ważne jest stosowanie odpowiedniej metody określania lekowrażliwości. Pod tym względem proste metody dostępne komercyjnie (E-test i Sensititre) są zdecydowanie mniej skuteczne, a uzasadnione jest stosowanie metody zalecanej przez CLSI.

Mechanizmy oporności na azole drożdżaków z rodzaju *Candida* różnią się w zależności od gatunku. W przypadku *C. glabrata* wynikają przede wszystkim z nadprodukcji białek z rodziny transporterów typu ABC, nie mogą być tłumaczone mutacjami (ze względu na ich brak) genu *ERG11*. Oporność gatunku *C. albicans* jest bardziej złożona. Wynika przede wszystkim z nadprodukcji pomp wielolekowych jednak uzupełniające znaczenie może mieć także istnienie mutacji w genie *ERG11*. Nadekspresja genów kodujących pompy może również występować jednocześnie z mutacjami w obrębie genu *ERG11*. W niektórych przypadkach oporność nie jest tłumaczona żadnym z powyższych mechanizmów, dlatego ciągle potrzebne są dalsze badania w celu dokładnego poznania problemu.

Podsumowując badania dotyczące produktów naturalnych z całą pewnością można stwierdzić, że zarówno olejki eteryczne jak i ekstrakty propolisów pszczelich stanowią bardzo obiecującą grupę związków o aktywności przeciwgrzybowej. Są one jednocześnie zadawalająco aktywne, bezpieczniejsze w stosowaniu niż produkty syntezy chemicznej podawane pacjentom jako leki i posiadają dodatkowe zalety, których brak mykotokom. Są one dodatkowo aktywne w stosunku do komórek żyjących w biofilmie, jednak ich efektywność, podobnie jak w przypadku leków, jest niższa. Najciekawszym spostrzeżeniem dotyczącym aktywności produktów naturalnych jest to, że ekstrakty propolisów wywołują bardzo istotny efekt synergistyczny w połączeniu z flukonazolem (obniżenie wartości MIC flukonazolu do 256 razy) lub z worykonazolem (do 32 razy). Dodatkowo propolis eliminują zjawisko „ogonowania”.

Zarówno olejki eteryczne jak i propolis pszczele oddziałują na błonę komórkową, jednak efekt bardziej widoczny jest w przypadku EEP. Natomiast dla olejków zaobserwowano znacząco wyższy wpływ jonów potasu. Obydwie grupy związków stanowią substrat dla pomp wielolekowych, lecz pomimo tego ciągle zachowują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Bardzo znaczącym wynikiem jest również to, że obydwie grupy związków hamują przejście do formy mycelialnej bądź pseudomycelialnej, co jest kluczowym czynnikiem zarówno wirulencji jak i inwazyjności gatunku *C. albicans*. Ciekawym spostrzeżeniem jest także to, że olejki i propolis

nie przyczyniają się do trwałego nabywania oporności, jednak aby to zweryfikować potrzebne byłyby dalsze badania na szerszą skalę.

## PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

W ciągu dwóch ostatnich lat przeprowadzono badania aktywności olejków eterycznych i propolisów wobec drożdży z rodzaju *Candida*. W testach określono aktywność olejków ekstrahowanych z roślin 37 gatunków. W naturze występują tysiące gatunków roślin, które mogą produkować związki wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową, dlatego uzasadnione byłoby przetestowanie znacząco większej grupy olejków eterycznych. Dodatkowo pewną niepewność budzi sposób testowania aktywności tego typu produktów. Większość zespołów badawczych aktywność testuje w sposób analogiczny do badania np. leków (proszek rozpuszczalny w wodzie). Jednak główną frakcją aktywną w olejkach jest faza lotna, która może także wywoływać aktywność na odległość, a przez to skutkować uzyskiwaniem fałszywie pozytywnych wyników w przypadku, gdy na jednej płytce 96-dołkowej testowanych jest więcej niż jeden olejek. Po raz pierwszy problem ten dokładnie opisał dopiero w roku 2017 zespół badawczy Adama Feyaerts (Feyaerts et al., 2017). Według tych badaczy faza lotna olejku pozyskanego z *Origanum compactum* może hamować wzrost w kontrolach wzrostu przyległych do studzienek zawierających olejek (powyższych, poniższych oraz po bokach lecz nie po skosie). Proponowanym podejściem jest zastosowanie uszczelnienia 96-dołkowego, które hamuje migrację fazy lotnej do sąsiadujących studzienek. Innym rozwiązaniem może być zastosowanie dodatkowych kontroli wewnętrznych pomiędzy rzędami z gradientem olejku. Oczywiście nie każdy olejek eteryczny musi wywoływać efekt na odległość. Autor przedstawia przykładowo, że olejek pozyskany z *Pimenta racemosa* nie wywołuje analogicznego efektu na odległość. Tak więc dodatkowym rozwiązaniem wydaje się być w fazie wstępnej badań sprawdzenie czy dany olejek wywołuje efekt w sąsiadujących studzienkach, w celu sprawdzenia czy do oznaczenia wartości MIC konieczna jest modyfikacja tradycyjnej metody mikrorozcieńczeniowej.

Drugim aspektem wartym szerszego rozważenia są mechanizm aktywności olejków eterycznych bądź propolisów pszczelich. W niniejszej pracy przedstawiono zostało wpływ na kilka możliwych celów molekularnych. Obydwie przedstawione grupy związków są bogatą mieszaniną nawet do kilkuset związków dlatego nie dziwi fakt, że mechanizm działania jest tak różnorodny. Jednak do potencjalnego zastosowania w przemyśle farmaceutycznym stanowi to dużą przeszkodę, która na razie uniemożliwia zastosowanie ich w celach terapeutycznych. Stosowanie jakiegokolwiek związku do produkcji leków wymaga znajomości dokładnego składu i zawartości danego związku, a w przypadku produktów naturalnych nie jest to w zasadzie możliwe. Dlatego celowe wydają się być określenie, który ze związków w mieszaninie wywiera najważniejszy efekt oraz jaki jest jego konkretny cel molekularny. Być może podobnie jak w przypadku antybiotyków możliwa byłaby modyfikacja danego związku (np. wymiana któregoś z atomów, przyłączenie dodatkowej grupy funkcyjnej) i sprawdzenie w warunkach *in silico* wpływu na interakcję z danym celem molekularnym oraz możliwości zwielokrotnienia pożądanego efektu. Pewne trudności może jedynie budzić modyfikacja związków, które mają charakter lotny.

Oczywiście sprawdzanie po kolei, który ze składników danego olejku/propolisu wywołuje największy efekt byłoby bardzo trudne i czasochłonne. Dlatego w tym celu należałoby przeprowadzić tzw. analizę skupień. Badanie tego typu wymagałoby określenia aktywności szeregu olejków/propolisów wobec szczepów referencyjnych oraz oceny składu chemicznego wszystkich badanych produktów (z podziałem na grupy związków a nie na konkretne składniki). W następnym kroku należałoby ustalić, które produkty wykazują największą aktywność i jaka jest różnica w składzie danego produktu, w stosunku do tego, który nie wykazuje zadawalającej aktywności. Gdyby przykładowo olejek nr 1 wykazywał bardzo wysoką aktywność, a nr 2 bardzo słabą, a jedyną różnicą w grupie związków obecnych w obydwu olejkach byłoby występowanie np. fenoli w oleju 1, to w ten sposób zidentyfikowana zostałaby grupa związków mających największy wpływ na nadawanie wysokiej aktywności.

Szukając analogii do antybiotyków należałoby także uwzględnić możliwość nabywania oporności na produkty alternatywne. Pod tym względem bogaty skład chemiczny takich produktów wydaje się być raczej zaletą, ponieważ komórce wiele trudniej nabyć oporność na kilkadziesiąt lub nawet kilkaset związków jednocześnie niż tylko na jeden. Jednak nie jest to wykluczone. Przedstawione eksperymenty są jedynie namiastką badań nad możliwością indukcji mechanizmów oporności. Konieczny byłby tu screening na dużą skalę z jednoczesnymi czynnikami takimi jak przedstawione w pracy promieniowanie UV czy związkami chemicznymi jak EMS, które zwiększają częstotliwość występowania mutacji w genomie. Do tej pory jedynie pojedyncze zespoły badawcze zajęły się tematyką mechanizmów oporności na związki naturalne, a ponadto tylko przy zastosowaniu bardzo podstawowych technik badawczych.

Podsumowując, badania dotyczące PPN są bardzo interesujące, obiecujące i z pewnością warte kontynuacji.

*Mimo wielu doniesień na temat badań wpływu naturalnych substancji na leczenie, przed światem naukowym jest jeszcze wiele do zrobienia, a cichym życzeniem każdego badacza jest, aby efekty jego pracy ujrzały światło dzienne zgodnie z sentencją:*

*„Wszystko, czego się dotąd nauczyłeś, ztraci sens, jeśli nie potrafisz znaleźć zastosowania dla tej wiedzy.”*

*Paulo Coelho*

## WYKAZ LITERATURY

- Abbes, S., Mary, C., Sellami, H., Michel-Nguyen, A., Ayadi, A., & Ranque, S. (2013). Interactions between copy number and expression level of genes involved in fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 74. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00074>
- Agüero, M. B., Svetaz, L., Baroni, V., Lima, B., Luna, L., Zacchino, S., Tapia, A. (2014). Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Industrial Crops and Products*, 57, 166–173.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., & Khan, L. A. (2010). Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48(1), 35–41. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.10.001>
- Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 81(8), 1157–1162. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.020>
- Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 43(4), 285–318. <http://doi.org/10.1080/13693780500138971>
- Al-Dhaheri, R. S., & Douglas, L. J. (2010). Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *Journal of Medical Microbiology*, 59(2), 149–157. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.015784-0>
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), 999–1008. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>
- Alali, W. Q., Hofacre, C. L., Mathis, G. F., Faltys, G., Ricke, S. C., & Doyle, M. P. (2013). Effect of non-pharmaceutical compounds on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. *Food Control*, 31(1), 125–128. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.001>
- Al Thaqafi, A. H. O., Farahat, F. M., Al Harbi, M. I., Al Amri, A. F. W., & Perfect, J. R. (2014). Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: Eight-year surveillance, western Saudi Arabia. *International Journal of Infectious Diseases*, 21(2), 5–9. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.012>
- Almeida, L. de F. D. de, Paula, J. F. de, Almeida, R. V. D. de, Williams, D. W., Hebling, J., & Cavalcanti, Y. W. (2016). Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(5), 393–398. <http://doi.org/10.3109/00016357.2016.1166261>
- Alviano, W. S., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, D. S., Bizzo, H. R., Souto-Pradrón, T., Rodrigues, M. L., ... Souza, M. M. G. (2005). Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(2), 101–105. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x>
- Andes, D., Nett, J., & Oschel, P. (2004). Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and Immunity*, 72(10), 6023–6031. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6023>
- Araújo, L. X., Novato, T. P. L., Zeringota, V., Matos, R. S., Senra, T. O. S., Maturano, R., ... Monteiro, C. M. O. (2015). Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. *Parasitology Research*, 114(9), 3271–3276. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4547-3>
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33–42. [http://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](http://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1543–1575. <http://doi.org/10.3390/ph6121543>



- Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(3), 397–403. <http://doi.org/10.1093/jac/46.3.397>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bang, K.-H., Lee, D.-W., Park, H.-M., & Rhee, Y.-H. (2000). Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, 64(August), 1061–1063. <http://doi.org/10.1271/bbb.64.1061>
- Bannour, M., Aouadhi, C., Khalfaoui, H., Aschi-Smiti, S., & Khadhri, A. (2016). Barks Essential Oil, Secondary Metabolites and Biological Activities of Four Organs of Tunisian *Calligonum azel Maire*. *Chemistry and Biodiversity*, 13(11), 1527–1536. <http://doi.org/10.1002/cbdv.201600086>
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
- Bink, A., Kucharíková, S., Neirinck, B., Vleugels, J., Van Dijck, P., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2012). The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the in vivo activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Infectious Diseases*, 206(11), 1790–1797. <http://doi.org/10.1093/infdis/jis594>
- Bizerra, F. C., Da Silva, P. I., & Hayashi, M. A. F. (2012). Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-2. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00398>
- Borecká-Melkusová, S., Moran, G. P., Sullivan, D. J., Kucharíková, S., Chorvát, D., & Bujdaková, H. (2009). The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses*, 52(2), 118–128. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01550.x>
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265. <http://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M. J., & Manresa, A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1139–1149. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04740.x>
- Boyle, W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 66, 25–28.
- Bryan, J., Redden, P., & Traba, C. (2016). The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 62(2), 192–198. <http://doi.org/10.1111/lam.12532>
- Burdock, G. A. (1998). Review of the Biological Properties and. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)
- Calcagno, A. M., Bignell, E., Warn, P., Jones, M. D., Denning, D. W., Mühlischlegel, F. A., Haynes, K. (2003). *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1309–1318. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03755.x>
- Capoci, I. R. G., Bonfim-Mendonça, P. D. S., Arita, G. S., Pereira, R. R. D. A., Consolaro, M. E. L., Bruschi, M. L., Svidzinski, T. I. E. (2015). Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 1–9. <http://doi.org/10.1155/2015/287693>
- Charles, D. J., & Simon, J. E. (1990). Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(3), 458–462.



- Chen, L. M., Xu, Y. H., Zhou, C. L., Zhao, J., Li, C. Y., & Wang, R. (2010). Overexpression of *CDR1* and *CDR2* genes plays an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. *The Journal of International Medical Research*, 38(2), 536–545. <http://doi.org/10.1177/147323001003800216>
- CLSI. (2012). *M27-S4 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (Vol. 28).
- Coste, A. T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., & Sanglard, D. (2004). TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1639–1652. <http://doi.org/10.1128/EC.3.6.1639-1652.2004>
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2001). Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6(2), 87–91. <http://doi.org/10.3390/60100087>
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
- Cushnie, T. P. T., Hamilton, V. E. S., Chapman, D. G., Taylor, P. W., & Lamb, A. J. (2007). Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1562–1567. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03393.x>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39–44. [http://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](http://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Dawidowicz, A. L., & Rado, E. (2010). Matrix solid-phase dispersion (MSPD) in chromatographic analysis of essential oils in herbs. *J Pharm Biomed Anal*, 52(1), 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.12.024>
- De Bona Da Silva, C., Guterres, S. S., Weisheimer, V., & Schapoval, E. E. S. (2008). Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. *BJID The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 1212(61), 63–66. <http://doi.org/10.1590/S1413-86702008000100014>
- De Castro, P. A., Bom, V. L. P., Brown, N. A., Almeida, R. S. C. de, Ramalho, L. N. Z., Savoldi, M., Goldman, G. H. (2013). Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 74–86. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.001>
- de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 417. <http://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2>
- De Morais, S. M., Vila-Nova, N. S., Bevilaqua, C. M. L., Rondon, F. C., Lobo, C. H., De Alencar Araripe Noronha Moura, A., De Andrade, H. F. (2014). Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(21), 6250–6255. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.020>
- Desai, M., Bühler, T., Weller, P. H., & Brown, M. R. (1998). Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(2), 153–160. <http://doi.org/10.1093/jac/42.2.153>
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H., & Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(1), 77–82.

[http://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90135-Z](http://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90135-Z)

- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- dos Santos Silva, D. B., Carbonera Rodrigues, L. M., De Almeida, A. A., de Oliveira, K. M. P., & Grisolia, A. B. (2016). Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(3), 192–199. <http://doi.org/10.1590/0074-02760150400>
- Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R. W., & Gilbert, P. (1992). Effect of biofilm culture upon the susceptibility of staphylococcus epidermidis to tobramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30(6), 803–810. <http://doi.org/10.1093/jac/30.6.803>
- Duguid, I. G., Evans, E., Brown, M. R. W., & Gilbert, P. (1992). Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived staphylococcus epidermidis evidence for cell-cycle dependency. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30(6), 791–802. <http://doi.org/10.1093/jac/30.6.791>
- Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhäuser, J., & Rogers, P. D. (2008). A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1180–1190. <http://doi.org/10.1128/EC.00103-08>
- Edlind, T. D., & Katiyar, S. K. (2010). Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4733–4738. <http://doi.org/10.1128/AAC.00605-10>
- Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R., & Gilbert, P. (1991). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 177–184.
- Feng, L. J., Wan, Z., Wang, X. H., Li, R. Y., & Liu, W. (2010). Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. *Chinese Medical Journal*, 123(5), 544–548. <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.05.007>
- Ferreira, J. V. N., Capello, T. M., Siqueira, L. J. A., Lago, J. H. G., & Caseli, L. (2016). Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation. *Langmuir*, 32(13), 3234–3241. <http://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00600>
- Feyaerts, A. F., Mathé, L., Luyten, W., Tournu, H., Van Dyck, K., Broekx, L., & Van Dijck, P. (2017). Assay and recommendations for the detection of vapour-phase-mediated antimicrobial activities. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(5), 347–353.
- Fiori, A., Kucharíková, S., Govaert, G., Cammue, B. P. A., Thevissen, K., & Van Dijck, P. (2012). The heat-induced molecular disaggregase Hsp104 of *Candida albicans* plays a role in biofilm formation and pathogenicity in a worm infection model. *Eukaryotic Cell*, 11(8), 1012–1020. <http://doi.org/10.1128/EC.00147-12>
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1343–1349. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04102.x>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 104–113. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02275.x>
- Flowers, S. A., Colón, B., Whaley, S. G., Schuler, M. A., & David Rogers, P. (2015). Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 450–460. <http://doi.org/10.1128/AAC.03470-14>
- Franz, R., Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Ruhnke, M., & Morschhäuser, J. (1998). Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole

- resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3065–3072.
- Franz, R., Ruhnke, M., & Morschhäuser, J. (1999). Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses*, 42(7–8), 453–458. <http://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00498.x>
- Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. (2016). Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Journal de Mycologie Medicale*, 26(2), 122–132. <http://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.01.003>
- Freires, I. D. A., Murata, R. M., Furletti, V. F., Sartoratto, A., De Alencar, S. M., Figueira, G. M., Rosalen, P. L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE*, 9(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0099086>
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, 60(2), 59–84. <http://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750–5755. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5750-5755.2004>
- Goldman, G. H., Da Silva Ferreira, M. E., Dos Reis Marques, E., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Colombo, A. L. (2004). Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 50(1), 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.009>
- Haghdoust, N. S., Salehi, T. Z., Khosravi, A., & Sharifzadeh, A. (2016). Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 26(4), 298–305. <http://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.11.004>
- Haugland, R. P. (2005). *The handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Molecular probes. Invitrogen.
- Heilmann, C. J., Schneider, S., Barker, K. S., Rogers, P. D., & Morschhäuser, J. (2010). An A643T mutation in the transcription factor *Upc2p* causes constitutive *ERG11* upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 353–359. <http://doi.org/10.1128/AAC.01102-09>
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595. <http://doi.org/10.1021/jf980154m>
- Henry, K. W., Nickels, J. T., & Edlind, T. D. (2000). Upregulation of *ERG* Genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors, 44(10) 26930-2700. <http://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2693-2700.2000>.Updated
- Hope, W. W., Taberner, L., Denning, D. W., & Anderson, M. J. (2004). Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4377–4386. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4377-4386.2004>
- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., & Shimada, J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 325–331. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.049>
- Jantan, I. Bin, Karim Moharam, B. A., Santhanam, J., & Jamal, J. A. (2008). Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology*, 46(6), 406–412. <http://doi.org/10.1080/13880200802055859>
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., & Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name:

*Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*.  
<http://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.012>

- Keele, D. J., DeLallo, V. C., Lewis, R. E., Ernst, E. J., & Klepser, M. E. (2001). Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41(3), 121–126. [http://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00297-8](http://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00297-8)
- Kędzia, B. (2009). Chemical composition of polish propolis. Part I. The initial period of investigations. *Postępy Fitoterapii*, 1, 39–44.
- Kędzia, B., & Holderna-Kędzia, E. (2005). *Produkty pszczół w terapii. Zagadnienia wybrane. Fundacja Humana Divinis*. Toruń 2005.
- Kędzia, B., & Holderna-Kędzia, E. (2013). The antibiotic activity of native and european propolis. *Postępy Fitoterapii/Fitoterapii*, 2, 97–107.
- Khardori, N. M. (2010). Interactions between Human Phagocytes and *Candida albicans* Biofilms Alone and in Combination with Antifungal Agents. *Yearbook of Medicine*, 2010(12), 102–103. [http://doi.org/10.1016/S0084-3873\(10\)79666-8](http://doi.org/10.1016/S0084-3873(10)79666-8)
- Knot, P. D., Suci, P. A., Miller, R. L., Nelson, R. D., & Tyler, B. J. (2006). A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and  $\beta$ -1,6-glucan pathway genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3708–3716. <http://doi.org/10.1128/AAC.00997-06>
- Krog-Madsen, M., Arendrup, M. C., Heslet, L., & Knudsen, J. D. (2006). Amphotericin B and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Isolates Recovered from a Critically Ill Patient. *Clinical Infectious Diseases*, 42(7), 938–944. <http://doi.org/10.1086/500939>
- Kubina R.Kabała-Dzik A., W. R. (2009). Przeciwbakteryjne działanie galanginy zawartej w propolisie w stosunku do bakterii gram dodatnich. *Farm. Przegl. Nauk.*, 8, 24–26.
- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., & Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3839–3846. <http://doi.org/10.1128/AAC.00684-06>
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–62. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Leite, M. C. A., Bezerra, A. P. de B., de Sousa, J. P., Guerra, F. Q. S., Lima, E. de O., Leite, M. C. A., ... Lima, E. de O. (2014). Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2014, 378280. <http://doi.org/10.1155/2014/378280>
- Lillehoj, H. S., Kim, D. K., Bravo, D. M., & Lee, S. H. (2011). Effects of dietary plant-derived phytonutrients on the genome-wide profiles and coccidiosis resistance in the broiler chickens. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 4), S34. <http://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S4-S34>
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., & Cameán, A. M. (2015). In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*, 29(4), 647–656. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.006>
- Lo, H. J., Köhler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939–949. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80358-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80358-X)
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Tacca, M. Del, & Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*, 8(2), 76–81. [http://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02280-3](http://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02280-3)
- Maciejewicz W, Scheller S, D. M. (1983). Gas chromatography - mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of sesquiterpenes. *Acta. Polon. Pharm.*, 40, 251253.
- Maiolo, E. M., Tafin, U. F., Borens, O., & Trampuz, A. (2014). Activities of fluconazole,

- caspofungin, anidulafungin, and amphotericin b on planktonic and biofilm candida species determined by microcalorimetry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2709–2717. <http://doi.org/10.1128/AAC.00057-14>
- Mandal, A., Kumar, A., Singh, A., Lynn, A. M., Kapoor, K., & Prasad, R. (2012). A key structural domain of the *Candida albicans* Mdr1 protein. *Biochemical Journal*, 445(3), 313–322. <http://doi.org/10.1042/BJ20120190>
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99. <http://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Markowitz, K., Moynihan, M., Kim, S., & York, C. N. (1992). Biologic properties of eugenol and zinc. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 73(6), 729–737. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(92\)90020-Q](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(92)90020-Q)
- Marr, K. A., Lyons, C. N., Rustad, T., Bowden, R. A., & White, T. C. (1998). Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2584–2589.
- Martinez, L., & Falson, P. (2014). Multidrug resistance ATP-binding cassette membrane transporters as targets for improving oropharyngeal candidiasis treatment. *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology*, 2, 1–8. <http://doi.org/10.3402/acmo.v2.23955>
- Martins, M., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L., & Oliveira, R. (2012). Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*, 55(1), 80–85. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x>
- Massaro, C. F., Simpson, J. B., Powell, D., & Brooks, P. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Science of Nature*, 102(11–12), 68. <http://doi.org/10.1007/s00114-015-1318-z>
- Mateus, C., Crow, S. A., & Ahearn, D. G. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3358–3366. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3358-3366.2004>
- Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4), 251–264. <http://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>
- Matsuda, T., Yano, T., Maruyama, A., & Kumagai, H. (1994). Antimicrobial activities of organic acids determined by minimum inhibitory concentrations at different pH ranged from 4.0 to 7.0. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41(10), 687–701.
- Miron, D., Battisti, F., Silva, F. K., Lana, A. D., Pippi, B., Casanova, B., Schapoval, E. E. S. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24(6), 660–667. <http://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>
- Mishra, N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D., & Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54(3), 201–235. <http://doi.org/10.1556/AMicr.54.2007.3.1>
- Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C., & Le Pape, P. (2010). Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66(4), 373–384. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006>
- Morschhäuser, J. (2002). The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. [http://doi.org/10.1016/S0925-4439\(02\)00087-X](http://doi.org/10.1016/S0925-4439(02)00087-X)
- Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Blaß-Warmuth, J., Homayouni, R., & Rogers, P. D. (2007a). The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 3(11), 1603–1616. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030164>

- Morschhäuser, J., Barker, K. S., Liu, T. T., Blaß-Warmuth, J., Homayouni, R., & Rogers, P. D. (2007b). The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, *3*(11), 1603–1616. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030164>
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M., & Ghannoum, M. A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, *71*(8), 4333–4340. <http://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003>
- Mukherjee, P. K., Long, L., Kim, H. G., & Ghannoum, M. A. (2009). Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *33*(2), 149–153. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.030>
- Musthafa, K. S., Hmoteh, J., Thamjarungwong, B., & Voravuthikunchai, S. P. (2016). Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. *Microbial Pathogenesis*, *99*, 19–29. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.012>
- Nabili, M., Abdollahi Gohar, A., Badali, H., Mohammadi, R., & Moazeni, M. (2016). Amino acid substitutions in Erg11p of azole-resistant *Candida glabrata*: Possible effective substitutions and homology modelling. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *5*, 42–46. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.03.003>
- Nailis, H., Kucharíková, S., Řičicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiology*, *10*(1), 114. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-10-114>
- Nawrot, R., & Goździcka-Józefiak, A. (2007). Niskocząsteczkowe białka obronne roślin. *Biotechnologia*, *2*(77), 27–41.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1451–1474. <http://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K., & Andes, D. R. (2010). Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(8), 3505–3508. <http://doi.org/10.1128/AAC.00227-10>
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., & Andes, D. (2007).  $\beta$ -1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *Journal of Infectious Disease*, *195*(11), 1705–1712. [http://doi.org/JID37747 \[pii\]r10.1086/517522](http://doi.org/JID37747 [pii]r10.1086/517522)
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., Andes, D. (2007). Putative role of  $\beta$ -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(2), 510–520. <http://doi.org/10.1128/AAC.01056-06>
- Nguefack, J., Budde, B. B., & Jakobsen, M. (2004). Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: Their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Letters in Applied Microbiology*, *39*(5), 395–400. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01587.x>
- Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A. R., Lamping, E., Niimi, M., Cbs, C. (2006). Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(4), 1148–1155. <http://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1148>
- Niimi, M., Niimi, K., Takano, Y., Holmes, A. R., Fischer, F. J., Uehara, Y., & Cannon, R. D. (2004). Regulated overexpression of CDR1 in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *54*(6), 999–1006. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh456>
- Nóbrega, R. de O., Teixeira, A. P. de C., Oliveira, W. A. de, Lima, E. de O., & Lima, I. O. (2016). Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. *Pharmaceutical Biology*, *54*(11), 2591–2596.

<http://doi.org/10.3109/13880209.2016.1172319>

- O'Bryan et al. (2015). Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture - in vitro studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 1-8. <http://doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1–1. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Imanishi, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3), 207–215. <http://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00146.x>
- Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., & Balci, I. (2005). Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 140–143. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.1.140-143.2005>
- Perlin, D. S. (2015). Echinocandin resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases*, 61, S612–S617. <http://doi.org/10.1093/cid/civ791>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163. <http://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology* 50(9), 2846-2856. <http://doi.org/10.1128/JCM.00937-12>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Group, and the G. A. S. (2010). Results from the ARTEMIS DISK Global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366–1377.
- Pierce, C. G., Vila, T., Romo, J. A., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., & Lopez-Ribot, J. L. (2017). The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *Journal of Fungi*, 3(1), 14. <http://doi.org/10.3390/jof3010014>
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1), 73–78. <http://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x>
- Pina, G. D. M. S., Lia, E. N., Berretta, A. A., Nascimento, A. P., Torres, E. C., Buszinski, A. F. M., ... Martins, V. D. P. (2017). Efficacy of propolis on the denture stomatitis treatment in older adults: a multicentric randomized trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-9. <http://doi.org/10.1155/2017/8971746>
- Pippi, B., Lana, A. J. D., Moraes, R. C., Gúez, C. M., Machado, M., de Oliveira, L. F. S., Fuentefria, A. M. (2015). In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 839–850. <http://doi.org/10.1111/jam.12746>
- Pires, R. H., Lucarini, R., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2012). Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 595–597. <http://doi.org/10.1128/AAC.05348-11>
- Pires, R. H., Montanari, L. B., Martins, C. H. G., Zaia, J. E., Almeida, A. M. F., Matsumoto, M. T., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2011). Anticandidal Efficacy of Cinnamon Oil Against Planktonic and Biofilm Cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *Mycopathologia*, 172(6), 453–464. <http://doi.org/10.1007/s11046-011-9448-0>
- Pozzatti, P., Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(11), 950–956. <http://doi.org/10.1139/W08-097>



- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., & Jiang, Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 627–632. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.009>
- Prasad, R., Banerjee, A., Khandelwa, N. K., & Dhamgaye, S. (2015). The ABCs of *Candida albicans* multidrug transporter Cdr1. *Eukaryotic Cell*, 14(12), 1154–1164. <http://doi.org/10.1128/EC.00137-15>
- Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A., & Balzi, E. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Current Genetics*, 27(4), 320–329. <http://doi.org/10.1007/BF00352101>
- Ramage, G. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 973–980. <http://doi.org/10.1093/jac/dkf049>
- Revankar, S. G., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Fothergill, A. W., Redding, S. W., Rinaldi, M. G., & Patterson, T. F. (1998). Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the national committee for clinical laboratory standards method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 153–156.
- Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Arthington-Skaggs, B., Brown, S. D., Chaturvedi, V., Walsh, T. J. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Robbins, N., Uppuluri, P., Nett, J., Rajendran, R., Ramage, G., Lopez-Ribot, J. L., Cowen, L. E. (2011). Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 7(9) e1002257. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002257>
- Rocha, C. R., Schröppel, K., Harcus, D., Marcil, a, Dignard, D., Taylor, B. N., Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 12(11), 3631–3643. <http://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3631>
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(5), 673–688. <http://doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3>
- Rosana, Y., Yasmon, A., & Lestari, D. C. (2015). Overexpression and mutation as a genetic mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolated from human immunodeficiency virus patients in Indonesia. *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 1046–1052. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000123>
- Sampaio, F. C., Pereira, M. do S. V., Dias, C. S., Costa, V. C. O., Conde, N. C. O., & Buzalaf, M. A. R. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 289–294. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.034>
- Sangetha, S., Zuraini, Z., Suryani, S., & Sasidharan, S. (2009). In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron*, 40(4), 439–443. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2009.01.003>
- Sanglard, D., Ischer, F., & Bille, J. (2001). Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1174–1183. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1174-1183.2001>
- Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Micheli, M. de, & Bille, J. (1998). Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resistance Updates*, 1(4), 255–265. [http://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80006-X](http://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80006-X)
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M., & Bille, J. (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: Characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*, 143(2), 405–416. <http://doi.org/10.1099/00221287-143-2-405>
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R., & Fadda, G. (2005). Mechanisms

of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal re. *Society*, 49(2), 668–679. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.2.668>

- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58(S2), 2–13. <http://doi.org/10.1111/myc.12330>
- Saravanan, S., & Pari, L. (2015). Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *European Journal of Pharmacology*, 761, 279–287. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.034>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Seider, K., Heyken, A., Lüttich, A., Miramón, P., & Hube, B. (2010). Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: Survival, persistence and escape. *Current Opinion in Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.001>
- Shinde, R. B., Chauhan, N. M., Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2012). Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 27. <http://doi.org/10.1186/1476-0711-11-27>
- Shuford, J. A., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2005). Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(1), 473-473.. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.1.473.2005>
- Shukla, S., Saini, P., Smriti, Jha, S., Ambudkar, S. V., & Prasad, R. (2003). Functional Characterization of *Candida albicans* ABC Transporter Cdr1p. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1361–1375. <http://doi.org/10.1128/EC.2.6.1361-1375.2003>
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1650–1661. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.031>
- Sivam, G. P. (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and Other Bacterial Infections by Garlic. *The Journal of Nutrition*, 131(1985), 1106–1108.
- Stanciuc, A. M., Gaspar, A., Moldovan, L., Saviuc, C., Popa, M., & Marutescu, L. (2011). In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells. *Roumanian Archives of Microbiology Immunology*, 70(1), 11–14.
- Stead, D. A., Walker, J., Holcombe, L., Gibbs, S. R. S., Yin, Z., Selway, L., Haynes, K. (2010). Impact of the transcriptional regulator, Ace2, on the *Candida glabrata* secretome. *Proteomics*, 10(2), 212–223. <http://doi.org/10.1002/pmic.200800706>
- Suleman, T., van Vuuren, S., Sandasi, M., & Viljoen, A. M. (2015). Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 981–990. <http://doi.org/10.1111/jam.12906>
- Sung, W. S., & Lee, D. G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 219–226. <http://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-01-08>
- Szabó, M. Á., Varga, G. Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., & Molnár, J. (2010). Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*, 24(5), 782–786. <http://doi.org/10.1002/ptr.3010>
- Szweda, P., Gucwa, K., Kurzyk, E., Romanowska, E., Dzierżanowska-Fangrat, K., Zielińska Jurek, A., Milewski, S. (2015). Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical isolates. *Indian Journal of Microbiology*, 55(2), 175–183. <http://doi.org/10.1007/s12088-014-0508-2>

- Szweda, P., Gucwa, K., Romanowska, E., Dzierżanowska-Fangrat, K., Naumiuk, Łukasz, Brillowska-Dąbrowska, A., Milewski, S. (2015). Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. *Journal of Medical Microbiology*, 64(6), 610–619. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000062>
- Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10), 1325–37. <http://doi.org/10.2217/fmb.13.101>
- Thaweboon, S., & Thaweboon, B. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(5), 1025–1033.
- Thewes, S., Moran, G. P., Magee, B. B., Schaller, M., Sullivan, D. J., & Hube, B. (2008). Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, 8(1), 187. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-8-187>
- Timmerman, V., Broeckhoven, C. Van, Fay, S., Marichal, P., Bossche, H. Vanden, Odds, F. C., Mose-larsen, P. (1997). Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2229–2237.
- Tobaldini-Valerio, F. K., Bonfim-Mendonça, P. S., Rosseto, H. C., Bruschi, M. L., Henriques, M., Negri, M., Svidzinski, T. I. (2016). Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiology*, 11(8), 1035–1046. <http://doi.org/10.2217/fmb-2015-0016>
- Togashi, N., Inoue, Y., Hamashima, H., & Takano, A. (2008). Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 13(12), 3069–3076. <http://doi.org/10.3390/molecules13123069>
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Tsai, H. F., Krol, A. A., Sarti, K. E., & Bennett, J. E. (2006). *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1384–1392. <http://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006>
- Tyburski, J., Studzińska, A., Dąca, P., & Tretyn, A. (2008). PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia*, 1(1), 86–96.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Ultee, A., Kets, E. P., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606–4610.
- Uppuluri, P., Nett, J., Heitman, J., & Andes, D. (2008). Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1127–1132. <http://doi.org/10.1128/AAC.01397-07>
- Vediyappan, G., Rossignol, T., & D'Enfert, C. (2010). Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: Transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2096–2111. <http://doi.org/10.1128/AAC.01638-09>
- Vermitsky, J. P., & Edlind, T. D. (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: Coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3773–3781. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3773-3781.2004>
- Von Ahlfen, S., & Schlumpberger, M. (2010). Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *QIAGEN Gene Expression Newsletter*, 15, 6–7.
- Wang, G.-S., Deng, J.-H., Ma, Y.-H., Shi, M., & Li, B. (2012). Mechanisms, clinically curative

effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 32(1), 19–24.  
[http://doi.org/10.1016/S0254-6272\(12\)60026-0](http://doi.org/10.1016/S0254-6272(12)60026-0)

- Wang, H., Kong, F., Sorrell, T. C., Wang, B., McNicholas, P., Pantarat, N., Chen, S. C. (2009). Rapid detection of ERG11 gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiology*, 9(1), 167. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-167>
- Wang, Y.-P., & Lai, R. (2010). Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *Zoological Research*, 31(1), 27–34.  
<http://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2010.01027>
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology* 7, 2173.  
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
- White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F., & Stevens, D. A. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1704–1713. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1704-1713.2002>
- Xiang, M.-J., Liu, J.-Y., Ni, P.-H., Wang, S., Shi, C., Wei, B., Ge, H.-L. (2013). *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 13(4), 386–393. <http://doi.org/10.1111/1567-1364.12042>
- Xu, Y., Sheng, F., Zhao, J., Chen, L., & Li, C. (2015). ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Archives of Microbiology*, 197(9), 1087–1093. <http://doi.org/10.1007/s00203-015-1146-8>
- Yap, P. S. X., Krishnan, T., Yiap, B. C., Hu, C. P., Chan, K. G., & Lim, S. H. E. (2014). Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1119–1128. <http://doi.org/10.1111/jam.12444>
- You, L., Qian, W., Yang, Q., Mao, L., Zhu, L., Huang, X., Meng, H. (2017). ERG11 gene mutations and MDR1 upregulation confer pan-azole resistance in *Candida tropicalis* causing disseminated candidiasis in an acute lymphoblastic leukemia patient on posaconazole prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), e02496-16. <http://doi.org/10.1128/AAC.02496-16>
- Yu, L. H., Wei, X., Ma, M., Chen, X. J., & Xu, S. B. (2012). Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 770–775.  
<http://doi.org/10.1128/AAC.05290-11>
- Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A. de, Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*, 5(4), e01333–e01314. <http://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
- Zhou, E., Fu, Y., Wei, Z., Yu, Y., Zhang, X., & Yang, Z. (2014). Fitoterapia Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA) -induced mouse asthma. *Fitoterapia*, 96, 131–137. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.016>
- Zhou, H., Tao, N., & Jia, L. (2014). Antifungal activity of citral, octanal and  $\alpha$ -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*, 37(1), 277–283.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.057>
- Zhou, Y., Wang, G., Li, Y., Liu, Y., Song, Y., Zheng, W., Jia, J. (2012). In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3250–3260.  
<http://doi.org/10.1128/AAC.06082-11>
- Zomorodian, K., Bandegani, A., Mirhendi, H., Pakshir, K., Alinejhad, N., & Fard, A. P. (2016). In vitro susceptibility and trailing growth effect of clinical isolates of *Candida* species to azole drugs. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2), 1–6. <http://doi.org/10.5812/jjm.28666>

## WYKAZ RYSUNKÓW

Rys. 1. 1. Mechanizmy oporności drożdży z rodzaju <i>Candida</i> na azole .....	19
Rys. 1. 2. Topologia transportera Cdr1p należącego do rodziny ATP-binding Cassette [18].....	22
Rys. 1. 3. Budowa domen NBD wchodzących w skład białka Cdr1p .....	23
Rys. 1. 4. Topologia transportera Mdr1p należącego do rodziny białek MFS .....	24
Rys. 2. 1. Schemat plazmidu gamma mGFP-NAT1 .....	63
Rys. 2. 2. Schemat przedstawiający eksperyment wpływu związków pochodzenia naturalnego na nabywanie oporności .....	70
Rys. 1 Wzory strukturalne karwakrolu i p-cymenu .....	144
Rys. 2 Wzory strukturalne pinocembryny i galanginy .....	147

## WYKAZ TABEL

Tabela 1. 1. Wzory strukturalne wybranych leków przeciwgrzybowych .....	17
Tabela 1. 2. Wybrane produkty pochodzenia naturalnego wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową .....	31
Tabela 1. 3. Związki flawonoidowe oraz kwasy i estry aromatyczne najczęściej występujące w ekstraktach etanolowych propolisów pszczelich (Kędzia, 2009) .....	38
Tabela 2. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej do określania czystości RNA .....	52
Tabela 2. 2. Profil temperaturowo-czasowy reakcji zastosowanej do określania czystości RNA .....	52
Tabela 2. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej do oczyszczania RNA z DNA .....	52
Tabela 2. 4. Wykaz starterów i sond użytych do reakcji real time PCR dla gatunku <i>C. glabrata</i> .....	53
Tabela 2. 5. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real time PCR dla gatunku <i>C. glabrata</i> .....	54
Tabela 2. 6. Wykaz starterów użytych do reakcji real time PCR dla gatunku <i>C. albicans</i> .....	54
Tabela 2. 7. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real time PCR dla gatunku <i>C. albicans</i> .....	55
Tabela 2. 8. Wykaz starterów zastosowanych do amplifikacji genu <i>ERG11</i> <i>C. albicans</i> .....	55
Tabela 2. 9. Skład mieszaniny reakcyjnej amplifikacji genu <i>ERG11</i> dla gatunku <i>C. albicans</i> .....	55
Tabela 2. 10. Profil temperaturowo-czasowy reakcji amplifikacji genu <i>ERG11</i> dla gatunku <i>C. albicans</i> .....	56
Tabela 2. 11. Sekwencje nukleotydowe starterów stosowanych do transformacji i diagnostyki .....	64
Tabela 2. 12. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowany do amplifikacji genu <i>GFP</i> wraz z genem oporności na nourseotycynę zawartych na plazmidzie gamma mGFP-NAT1 .....	64
Tabela 2. 13. Profil czasowo-temperaturowy reakcji amplifikacji genu <i>GFP</i> wraz z genem oporności na nourseotycynę z plazmidu gamma mGFP-NAT1 .....	64
Tabela 2. 14. Skład mieszaniny reakcyjnej do diagnostyki poprawności insercji genu <i>GFP</i> w genie <i>CDR2</i> .....	66
Tabela 2. 15. Profil temperaturowo-czasowy diagnostycznej reakcji PCR .....	66
Tabela 2. 16. Skład mieszaniny w reakcji odwrotnej transkrypcji .....	68
Tabela 2. 17. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach qPCR zarówno do określania wydajności jak i analizy ekspresji genów .....	68
Tabela 2. 18. Profil temperaturowo-czasowy reakcji qPCR .....	69
Tabela 3. 1. Wartości stężeń CBP oraz ECV testowania lekowrażliwości <i>Candida</i> spp. w warunkach <i>in vitro</i> .....	72
Tabela 3. 2. Zestawienie wyników oceny lekowrażliwości izolatów <i>C. albicans</i> .....	73
Tabela 3. 3. Wartości MIC <sub>50</sub> (uzyskane metodą mikrorozcieńczeniową rekomendowaną przez CLSI) izolatów <i>C. albicans</i> z Warszawy zaklasyfikowanych wstępnie jako najbardziej odporne na flukonazol (MIC ≥ 256 µg/ml) testem SYO oraz w celach porównawczych MIC <sub>90</sub> . Izolaty prawdziwie odporne na flukonazol zacięniowane są na szaro .....	74
Tabela 3. 4. Wartości MIC <sub>50</sub> izolatów <i>C. albicans</i> z Wrocławia zaklasyfikowanych wstępnie jako odporne na flukonazol (MIC ≥ 256 µg/ml) testem SYO oraz w celach porównawczych MIC <sub>90</sub> . Izolaty prawdziwie odporne na flukonazol zacięniowane są na szaro .....	75
Tabela 3. 5. Zidentyfikowane mutacje w obrębie białka Erg11p w 43 izolatach <i>C. albicans</i> izolowanych od pacjentów ze szpitala „Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” oraz wrażliwości na 4 testowane azole (wg testu SYO) .....	85
Tabela 3. 6. Zidentyfikowane mutacje w obrębie białka Erg11p w 17 izolatach <i>C. albicans</i> izolowanych od pacjentów ze szpitala Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz wrażliwości na 4 testowane azole wg testu SYO .....	87

Tabela 3. 7. Liczby izolatów <i>C. albicans</i> wykazujących MIC przy określonych stężeniach wybranych olejków eterycznych.....	89
Tabela 3. 8. Liczby izolatów <i>C. albicans</i> wykazujących MIC przy określonych stężeniach olejku cynamonowego .....	90
Tabela 3. 9. Liczby izolatów <i>C. glabrata</i> wykazujących MIC przy określonych stężeniach wybranych olejków eterycznych.....	90
Tabela 3. 10. Liczby izolatów <i>C. glabrata</i> wykazujących MIC przy określonych stężeniach olejku cynamonowego .....	91
Tabela 3. 11. Procentowa zawartość żywych komórek <i>C. albicans</i> ATCC 10231 w hodowli traktowanej wybranym olejkiem eterycznym przez określony czas .....	96
Tabela 3. 12. Aktywność EEP wobec wybranych szczepów referencyjnych z rodzaju <i>Candida</i> .....	98
Tabela 3. 13. Interakcje zależne od stężenia pomiędzy worykonazolem (Vor) a EEP 18 a wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole. Rezultaty uzyskane metodą checkerboard .....	104
Tabela 3. 14. Interakcje zależne od stężenia pomiędzy flukonazolem (FI) a EEP 18 a wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole. Rezultaty uzyskane metodą checkerboard .....	105
Tabela 3. 15. Synergizm EEP 18 a z flukonazolem (FI) bądź worykonazolem (Vor) wobec izolatu klinicznego opornego krzyżowo na azole .....	105
Tabela 3. 16. Aktywność czterech EEP w eradykacji biofilmu utworzonego przez 3 gatunki <i>Candida</i> na powierzchniach cewników z PVC lub silikonu. Wyniki uzyskane metodą XTT .....	110
Tabela 3. 17. Porównanie wartości MIC olejków eterycznych w podłożach suplementowanych bądź niesuplementowanych sorbitolem lub ergosterolem .....	112
Tabela 3. 18. Porównanie wartości MIC ekstraktów propolisów w podłożach suplementowanych bądź niesuplementowanych sorbitolem lub ergosterolem .....	113
Tabela 3. 19. Relatywny poziom fluorescencji komórek <i>C. albicans</i> SC5314 po ekspozycji na EEP i wybarwianiu barwnikiem DiBAC <sub>4</sub> .....	114
Tabela 3. 20. Zawartość form mycelialnych oraz pseudomycelialnych po traktowaniu komórek <i>C. albicans</i> SC5314 ekstraktami propolisów przez 2 lub 24 h w stężeniach odpowiednio 1 × MIC oraz ½ × MIC .....	117
Tabela 3. 21. Zawartość form mycelialnych oraz pseudomycelialnych po traktowaniu komórek <i>C. albicans</i> SC5314 olejkami eterycznymi przez 2 lub 24 h w stężeniach odpowiednio 1 × MIC oraz ½ × MIC .....	117
Tabela 3. 22. Maksymalne stężenia związków umożliwiające wzrost w ciągu 48 h na podłożach stałych YPD.....	130
Tabela 3. 23. Skład chemiczny testowanych olejków eterycznych oznaczony metodą chromatografii gazowej z detekcją masową .....	133



## SPIS DOROBKU

### Publikacje w czasopismach z listy ISI

- Schiemann, M., Szweda, P., Gucwa K., Kawczyński, M., Milewska, M. J., Martynow, D., Morschhäuser J., Milewski, S. (2017). Transport deficiency is the molecular basis of *Candida albicans* resistance to antifungal oligopeptides. *Frontiers in Microbiology*. 8: 2154.
- Mania S., Tylingo R., Augustin A., Gucwa K., Szwacki J., Staroszczyk. Investigation of an elutable N-propylphosphonic acid chitosan derivative composition with a chitosan matrix prepared from carbonic acid solution. 2017. *Carbohydrate Polymers*. 179: 196-206.
- Szweda P., Gucwa K., Kurzyk E., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Naumiuk Ł., Brillowska-Dąbrowska A., Wojciechowska-Koszko I., Milewski S. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. 2015. *Journal Of Medical Microbiology*. 64(6): 610-619.
- Szweda P., Gucwa K., Kurzyk E., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Zielińska Jurek A., Milewski S. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. 2015. *Indian Journal of Microbiology*. 55(2): 175-183.
- Szweda P., Gucwa K., Naumiuk Ł., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Brillowska-Dąbrowska A., Wojciechowska-Koszko I., Milewski S. Evaluation of possibilities in identification and susceptibility testing for *Candida glabrata* clinical isolates with the Integral System Yeast Plus (ISYP). 2014. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 61(2): 161–172.
- Wolska K., Szweda P., Lada K., Rytel E., Gucwa K., Kot B., Piechota M. Motility activity, slime production, biofilm formation and genetic typing by ERIC-PCR for *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from bovine and other sources (human and environment). 2014. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 17(2):321-329.

### Publikacje w innych czasopismach recenzowanych

- Szweda P., Gucwa K., Naumiuk L., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Evaluation of possibilities of genotyping of *Candida glabrata* clinical isolates with RAPD-PCR method and microsatellite analysis. 2013 *Scientific Journal of Microbiology*. 2(10):194-200.

### Publikacje w materiałach konferencyjnych

- Gucwa K. Mechanizmy oporności na azole drożdżaków z rodzaju *Candida*. 2014. Konferencja Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki. Gdańsk 2014. *Dokonania młodych Naukowców*. 5. 283-285.
- Gucwa K., Szweda P., Milewski S. Skuteczność działania 5-fluorocytozyny w stosunku do klinicznych izolatów *Candida albicans* i *Candida glabrata* opornych na flukonazol. 2014. Konferencja Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki. Gdańsk 2014. *Dokonania młodych Naukowców*. 5. 286-289.
- Szweda P., Gucwa K., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Milewski S.: Genotyping of clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans*. 2013. *Diagmol 2013 XIV Conference on Molecular Biology in Diagnostics of Infectious Diseases and Biotechnology/ ed. M. Niemiałowski Warszawa 2013:133-136.*



### Plakaty na konferencjach:

Gucwa K., Szweda P., Łubowska N., Milewski S. Determining the ability of selected essential oils in eradication of biofilm formed by *Candida* species. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Wiedeń 2017.

Gucwa K., Szweda P. Mutacje punktowe w genie *ERG11* jako potencjalna przyczyna oporności na leki z grupy azoli. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”. Bydgoszcz 2016.

Gucwa K., Szweda P. Ocena aktywności grzybobójczej olejków eterycznych oraz ich wpływ na wybrane czynniki wirulencji. II Ogólnopolska Konferencja „*Drobnoustroje w świecie człowieka - drobnoustroje oportunistyczne*”. Bydgoszcz, 2016.

Gucwa K., Szweda P., Milewski S. Skuteczność działania 5-fluorocytozyny w stosunku do klinicznych izolatów *Candida albicans* i *Candida glabrata* opornych na flukonazol. Konferencja: W pływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki. Gdańsk 2014.

Szweda P., Gucwa K., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Milewski S. Genotyping of clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans*. Konferencja: Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii DIAGMOL 2013. Warszawa 2013