Inhibicija izvanstaničnih proteaza i lipaza vrste Candida albicans hidroksitirozolom i oleuropeinom

Banović, Franjo

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:429736

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Franjo Banović

Inhibicija izvanstaničnih proteaza i lipaza vrste *Candida albicans* hidroksitirozolom i oleuropeinom

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Kosaleca. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Ivanu Kosalecu, mag. pharm., na nesebičnoj potpori i beskrajnom razumijevanju, uloženom trudu i vremenu te obilju savjeta i konstruktivnih kritika koje mi je uputio tijekom provođenja eksperimenata i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i laboratorijskoj tehničarki, Štefici Babić, koja mi je uvelike olakšala provedbu eksperimenata budući da mi je redovito pripremala sve potrebne medije, otopine i pufere, kao i pružala potrebne informacije o svemu u laboratoriju.

Posebnu zahvalu upućujem Nataši, mojoj dragoj suradnici koja je sa mnom prošla kroz sve lijepe i manje lijepe trenutke vezane za eksperimentalni dio ovog rada. Bez njezine strpljivosti, smirenosti i upornosti ovog rada danas vjerojatno ne bi ni bilo.

Od srca sam zahvalan mojoj suvoditeljici, izv. prof. dr. sc. Jasni Hrenović, na pravovremeno i bez imalo oklijevanja pruženoj pomoći.

Duboku zahvalnost iskazujem i mojoj zaručnici Ani, čija su mi podrška i ljubav omogućili da nastavim dalje čak i kad se činilo da to više nema smisla.

Velika hvala i svim mojim prijateljima, naročito nezamjenjivom i neponovljivom Mati te trima divnim kolegicama s godine – Mihaeli, Teni i Valentini. Nije uvijek lako sa mnom, ali drago mi je da niste odustali!

Za kraj, zahvaljujem se mojoj obitelji, posebno roditeljima i sestri Ani, koji su proveli sa mnom najveći dio života i doprinijeli nastanku mene kao čovjeka, u svim pogledima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

INHIBICIJA IZVANSTANIČNIH PROTEAZA I LIPAZA VRSTE *Candida albicans* HIDROKSITIROZOLOM I OLEUROPEINOM

Franjo Banović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Gljivične Sap proteaze kao i Lip lipaze se ubrajaju u bitnije čimbenike virulencije medicinski značajnih gljivica. Stoga je inhibicija tvorbe i aktivnosti tih hidrolitičkih enzima jedan od važnijih faktora za eradikaciju mikoza. Predmet je ovog istraživanja bio je utvrditi mogućnosti modulacije aktivnosti izvanstaničnih Sap proteaza i Lip lipaza kvasca *Candida albicans* u *in vitro* uvjetima hidroksitirozolom i oleuropeinom. Prvi se korak sastojao od uzgoja kliničkih izolata vrste *C. albicans* na hranjivoj podlozi te nasađivanja i inkubacije uz indukciju proteaza odnosno lipaza u tekućem mediju a naposljetku i izolacije enzima u mediju filtracijom. Drugi korak bio je selekcija enzimatski najproduktivnijih sojeva na temelju kratke inkubacije alikvota filtrata sa odgovarajućim supstratom - BSA (goveđi serumski albumin) za proteaze, DMPTB (2,3-dimerkapto-1-propanol tributirat) za lipaze – te spektrofotometrijske analize uz pripadajuće kontrole. Treći korak sastojao se od ispitivanja utjecaja više koncentracija hidroksitirozola i oleuropeina na aktivnost ovih enzima, metodom sličnom onoj iz drugog koraka. Najproduktivnijim proizvođačem proteaza pokazao se klinički izolat sa oznakom 781, dok najproduktivnijeg proizvođača lipaza nije bilo moguće utvrditi. Obje tvari su pokazale inhibitorni učinak na Sap proteaze, s tim da je učinak hidroksitirozola bio bitno jači. Nije bilo moguće potvrditi njihov inhibitorni učinak na Lip lipaze budući da se nije uspjelo izdvojiti najproduktivniji soj, a moguće je da je i sama indukcija bila neuspješna. Pokušaj ustanovljivanja inhibitornog učinka na komercijalno nabavljenu lipazu srodne vrste, *C. rugosa*, nije polučio jasne rezultate.

(46 stranica, 12 slika, 7 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: *Candida albicans*, Sap proteaze, Lip lipaze, hidroksitirozol, oleuropein
Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ivan Kosalec, mag. pharm.
Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Jasna Hrenović
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Antun Alegro, izv. prof. dr. sc. Jasna Hrenović, doc. dr. sc. Jasna Lajtner
Zamjena: doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 18.02.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

INHIBITION OF EXTRACELLULAR PROTEASES AND LIPASES OF *Candida albicans* BY HYDROXYTYROSOL AND OLEUROPEIN

Franjo Banović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Fungal Sap proteases as well as Lip lipases are known as important virulence factors of medically important fungi. It is for this reason that the inhibition of synthesis and activity of these hydrolitic enzymes is an important target in mycosis eradication. The subject of this study was to determine the possibility of modulation of extracellular Sap proteases and Lip lipases of *Candida albicans* yeast *in vitro* by hydroxytyrosol and oleuropein. The first step consisted of the cultivation of clinical isolates of *C. albicans* on the culture medium, the inoculation and incubation followed by induction of proteases and lipases in liquid medium, and the isolation of enzymes from the medium by filtration. Subsequent step was composed of the selection of the enzymatically most productive strains based on short incubation of the filtrate aliquots with matching substrates – BSA (bovine serum albumin) for proteases, DMPTB (2,3-dimercapto-1-propanol tributyrate) for lipases – and the spectrophotometric analysis with corresponding controls. The final step was the examination of the impact that multiple concentrations of hydroxytyrosol and oleuropein have on the activity of these enzymes, by a method similar to the one from previous step. Clinical isolate designated as 781 has proven to be the most productive protease expressor, while it was not possible to determine the most productive lipase expressor. Both substances have shown inhibitory effect on Sap proteases, with the effect of hydroxytyrosol being significantly stronger. It was not possible to confirm their inhibitory effect on Lip lipases since the singling out of the most productive strain was unsuccessful, with the possibility that the induction itself was unsuccessful as well. The attempt to determine the inhibitory effect on the commercially purchased lipase of a related species, *C. rugosa*, did not yield clear results.

(46 pages, 12 figures, 7 tables, 58 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: *Candida albicans*, Sap proteases, Lip lipases, hydroxytyrosol, oleuropein
Supervisor: Dr. Ivan Kosalec, Assoc. Prof.
Cosupervisor: Dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof.
Reviewers: Dr. Antun Alegro, Assoc. Prof., Dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof., Dr. Jasna Lajtner, Asst. Prof.
Replacement: Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 18.02.2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. O kandidi (*Candida albicans* Berkhout) 1

1.1.1. Morfologija 1

1.1.2. Životni ciklus 3

1.1.3. Medicinski značaj 5

1.2. Patogeneza i faktori virulencije 6

1.2.1. Patogeneza kandidijaza 6

1.2.2. Dimorfizam kao faktor virulencije 8

1.2.3. Adhezini i invazini 9

1.2.4. Hidrolitički enzimi 9

1.2.5. Biofilm kao faktor virulencije 11

1.2.6. Mehanizmi reakcije na stres 12

1.2.7. Metabolička prilagodba 14

1.3. Liječenje kandidijaza 15

1.3.1. Uobičajena terapija 15

1.3.2. Alternativni suvremeni pristup 19

1.3.3. Antifungalne molekule prirodnog podrijetla 20

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 22

3. MATERIJALI I METODE 23

3.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hidroksitirozola i oleuropeina za *C. albicans* 23

3.2. Indukcija Sap proteaza i Lip lipaza 24

3.3. Proteaze – selekcija najproduktivnijeg soja i inhibicijski test 26

3.4. Lipaze – selekcija najproduktivnijeg soja i inhibicijski test 28

4. REZULTATI 30

4.1. MIK za hidroksitirozol i oleuropein za *C. albicans* 31

4.2. Proteazna inhibicija 32

5. RASPRAVA 34

6. ZAKLJUČAK 39

7. LITERATURA 40

ŽIVOTOPIS 46

1. UVOD

1.1. O kandidi (*Candida albicans* Berkhout)

Diploidna gljiva *Candida albicans* spada u red *Saccharomycetales* unutar koljena *Ascomycota* (Diezmann et al. 2004; Kosalec et al. 2005). Čest je komenzal na sluznicama dišnog, probavnog i genitalnog sustava kao i na koži. Po nekim procjenama, čak 50% ljudske populacije nositelj je kandide (Stehr et al. 2003). Iako je dio uobičajene mikrobne flore čovjeka, često zna djelovati kao oportunistički patogen uslijed pada imuniteta te uzrokovati lakše ili teže infekcije (kandidijaze), od lako izlječivih oralnih upala pa sve do sistemskih infekcija koje mogu zahvatiti cijele organe kod imunokompromitiranih osoba, najčešće ljudi oboljelih od AIDS-a (Höfling et al. 2011; Kosalec et al. 2005; McCullough et al. 1996).

1.1.1. Morfologija

Kod kandida nalazimo dvije različite pojave dimorfizma stanica – dimorfizam između jednostanične i višestanične forme, te dimorfizam između dva različita oblika jednostanične forme. Različite pojavne forme/oblici kandide dakako imaju različite ekspresijske obrasce kao i različite antigene na površini stanica (Mayer et al. 2013).

Kao i mnoge druge gljive koje su komenzali ili patogeni životinja i ljudi, i *C. albicans* je dimorfna, ili preciznije rečeno polifenična, te ju nalazimo primarno u dva oblika – kao jednostanični kvasac ili kao višestaničnu filamentoznu gljivu. Dok je prvi oblik onaj u kojem se obično nalazi u staničnim kulturama ili kod zdravih ljudi, u drugom se javlja prilikom infekcija, a u njega prelazi pod utjecajem vanjskih faktora, odnosno kad dobije fiziološku potvrdu da je okolina pogodna za infekciju (odgovarajuća pH, temperatura, vlažnost, itd.) (Höfling et al. 2011; Kosalec et al. 2005; Mitchell 1998). Ova je promjena reverzibilna, odnosno gljiva uz određene promjene okoline spontano prelazi iz jednog oblika u drugi ili u neki od prijelaznih oblika između ova dva.

Kandidu u formi kvasca može se dobiti uzgojem na uobičajenim hranjivim podlogama za kvasce kao što je Sabouraudov agar. Raste u pravilnim, glatkim i ispupčenim kuglastim kolonijama bijele do prljavo bijele boje te ima snažan miris po kvascu (Slika 1.) (Kosalec et al. 2005). Pod mikroskopom se može vidjeti ovalne odvojene stanice koje se dijele pupanjem.



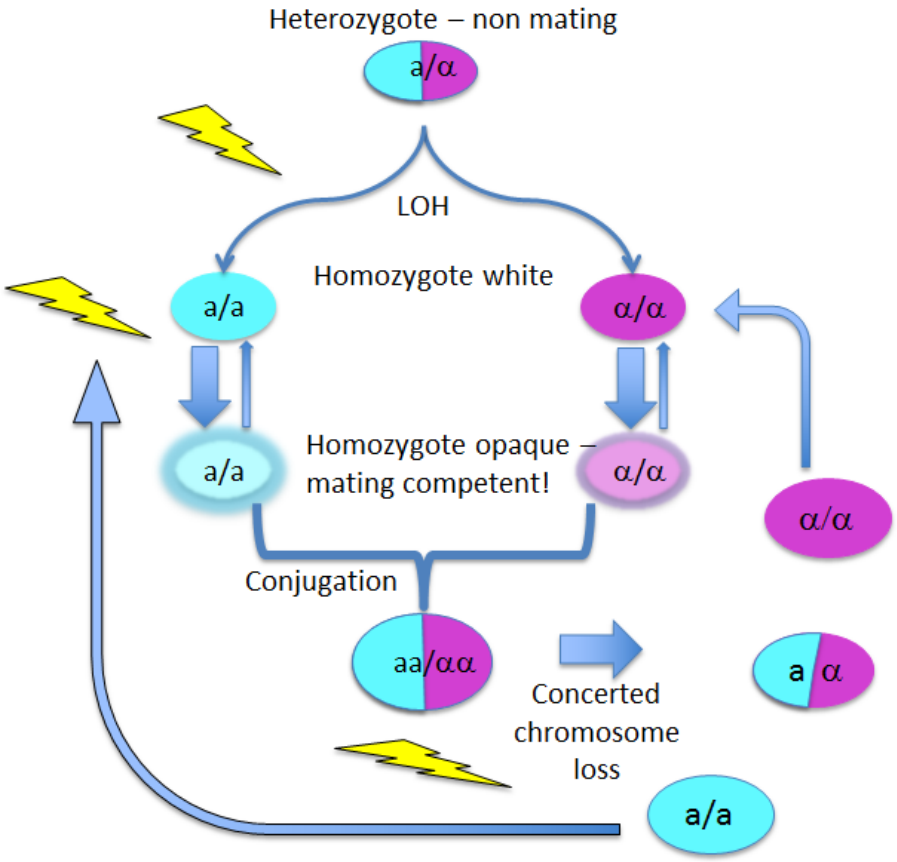
Slika 1. Kolonije kvasca *Candida albicans* na Sabouraudovom agaru (preuzeto s phil.cdc.gov)

Filamentozni oblik kandide dobiva se ili direktnim uzimanjem brisa sluznice odnosno uzorka tkiva zaraženih osoba ili uzgojem na specifičnim agarima koji simuliraju prisutnost domaćina, kao što je npr. krvni agar (Brown Jr et al. 1999). Pod mikroskopom se može vidjeti ili prave hife ili pseudohife, ovisno o uvjetima u kojima se gljiva nalazi, a ponekad i klamidospore – spore namijenjene preživljavanju nepovoljnih uvjeta – smještene na krajevima (pseudo)hifa.

Uz dimorfizam koji se odnosi na postojanje gljive u jednostaničnom ili višestaničnom obliku sa pripadajućom razlikom u obliku stanica i ponašanju organizma, *C. albicans* ima i fenotipski dimorfizam u formi kvasca vezan uz paraseksualni ciklus (Bennett & Johnson 2003; Butler et al. 2009). Osim uobičajenih okruglih stanica koje tvore bijele, ispupčene kolonije postoji i fenotip koji odlikuju izduljene, vretenaste stanice koje tvore sivkaste, niske kolonije u kojem se stanica nužno mora nalaziti kako bi mogla sudjelovati u paraseksualnom ciklusu (Bennett & Johnson 2003; Forche et al. 2008; Miller & Johnson 2002). Ove dvije forme nazivaju se „white“ (bijela) i „opaque“ (neprozirna/mutna).

1.1.2. Životni ciklus

C. albicans se primarno razmnožava pupanjem kao i većina kvasaca, a genetičku rekombinaciju ostvaruje kroz paraseksualni ciklus, s obzirom na to da nema nikakvog oblika mejotskog ciklusa (Berman & Hadany 2012; Butler et al. 2009; Forche et al. 2008). U ovaj proces drastičnog preslagivanja kromosoma koji osigurava stalno nastajanje novih sojeva unutar vrste a koji nalazimo u sličnom obliku i kod nekih drugih gljiva ulaze dvije diploidne stanice kandide čijim stapanjem nastaje tetraploid. Iz njega zatim nakon nasumičnog ali kontroliranog rearanžiranja i gubitka pojedinih kromosoma nastaju diploidne ili gotovo diploidne stanice (najčešće razlike su trisomije pojedinih kromosoma) koje su dovoljno različite od svojih „roditeljskih“ stanica da ustvari predstavljaju nove sojeve (Slika 2.) (Bennett & Johnson 2003; Berman & Hadany 2012; Butler et al. 2009; Forche et al. 2008).



Slika 2. Paraseksualni ciklus *C. albicans* (prilagođeno iz Berman & Hadany 2012)

Postoje dva uvjeta koja dvije stanice kandide moraju zadovoljiti da bi mogle ući u paraseksualni ciklus: prvo, da pripadaju različitim skupinama parenja (*mating types*), odnosno jedna skupini „a“ a druga skupini „α“, i drugo, da se nalaze u „opaque“ formi kvasca (Miller & Johnson 2002). Gljiva u „opaque“ formu prelazi posredstvom transkripcijskih regulatornih proteina koji su kodirani genima sa MTL (*mating type locus*) lokusa a do toga dolazi kada po fiziološkim parametrima okoline procijeni da su trenutak i uvjeti za rekombinaciju povoljni (Bennett & Johnson 2003; Butler et al. 2009; Forche et al. 2008; Hull et al. 2000).

Zanimljivo otkriće do kojeg se došlo istraživanjem paraseksualnog ciklusa kandide je uočavanje pojedinih proteina iz mejotskog ciklusa koji kod kandide ispunjavaju drukčije zadaće, odnosno sudjeluju u paraseksualnom ciklusu (Forche et al. 2008). To ukazuje na vjerojatnu redukciju mejotskih mehanizama u korist robusnijeg modela genomskog rearanžiranja kao prilagodbu na život u toplokrvnim životinjama u evolucijskoj povijest gljive.

1.1.3. Medicinski značaj

Iako se uglavnom radi o bezopasnom komenzalu koji po nekim procjenama naseljava gastrointestinalni trakt čak 70% zdravih ljudi, ostaje činjenica da je *C. albicans* najčešće izolirana patogena gljiva kod ljudi što joj garantira povećanu pažnju zdravstvenih djelatnika te istraživača u farmaceutskoj i medicinskoj biologiji (Calderone & Fonzi 2001; Forche et al. 2008; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013).

Dok su kod ljudi s funkcionalnim imunosnim sustavom bolesti povezane s kandidom većinom limitirane na lokalizirane mikoze a i onda uglavnom samo u slučajevima pada imuniteta ili pojačanog stresa, kod osoba kojima je iz nekog razloga snažno narušena efikasnost imunosnog sustava (oboljeli od AIDS-a, prerano rođena novorođenčad, primatelji transplantiranih organa na imunosupresivnoj terapiji) gljivične infekcije – prvenstveno one kojima su uzročnici gljive iz rodova *Aspergillus* i *Candida* – mogu predstavljati smrtnu opasnost, budući da se javljaju kao tzv. duboke mikoze (mikoze unutarnjih organa), pa čak i sistemske mikoze koje je izrazito teško liječiti konvencionalnim putem (Calderone & Fonzi 2001; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013).

Još jedna relativno česta poteškoća koju uzrokuje kandida je stvaranje biofilma, i na površini tkiva i na medicinskim implantatima u tijelu kao što su intravenozni ili urinarni kateteri. Uspješnost uklanjanja takvih biofilmova ovisi o više faktora, od imunosnog statusa oboljelog do tkiva na kojem biofilm raste, odnosno vrste implantata i materijala od kojeg je građen, s naglaskom na to da ga je u pravilu teško ukloniti bez operativnog zahvata zbog biomehaničke barijere koju lijekovima predstavljaju komponente matriksa biofilma u koji su stanice kandide uklopljene (Kumamoto 2002; Mayer et al. 2013; Mukherjee & Chandra 2004; Nobile et al. 2006).

1.2. Patogeneza i faktori virulencije

Mikoze uzrokovane kandidom nazivaju se kandidijaze. U većini slučajeva radi se o lokaliziranim infekcijama sluznice, najčešće oralne sluznice (Slika 3.), no kandidijaza se može javiti i na koži, noktima ili – u izuzetnim slučajevima – na unutarnjim organima, a onda se u pravilu ne radi o lokaliziranoj nego o sistemskoj kandidijazi. Patološko stanje u kojem nalazimo kandidu u krvi naziva se kandidemija.



Slika 3. Oralna kandidijaza (na slici se vide bjelkaste nakupine na jeziku i usnama) (preuzeto s phil.cdc.gov)

1.2.1. Patogeneza kandidijaza

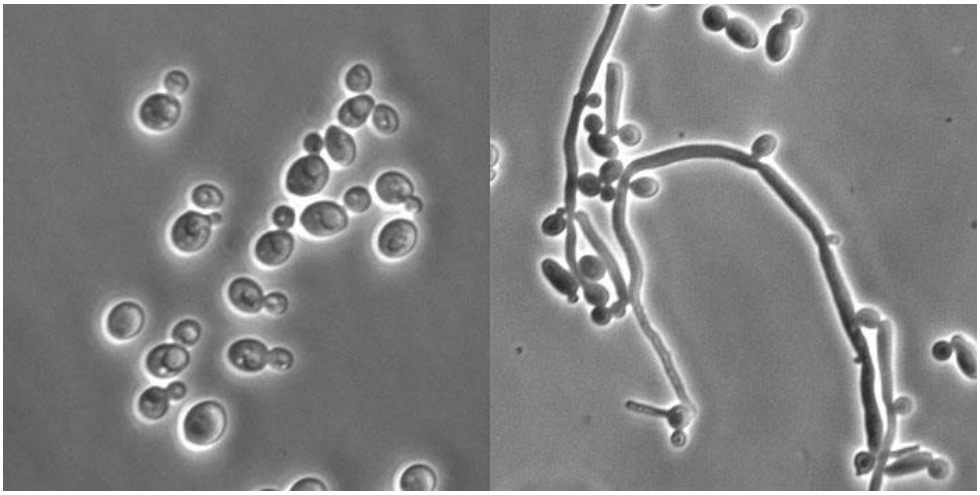
Iako se kandidijaze mogu (bar kad se radi o virulentnijim sojevima) naći i kod zdravih ljudi, *C. albicans* je ipak primarno oportunistički patogen koji uzrokuje probleme tek kad imunitet zaražene osobe oslabi, bilo uslijed bolesti, stresa, korištenja imunosupresiva ili nekog drugog razloga. Kroz naročito velike probleme s kandidom i drugim fungalnim patogenima prolaze osobe zaražene HIV-om, kod kojih su sistemske mikoze (pa prema tome i kandidijaze) zbog robusnosti patogena i dugotrajnosti liječenja jedan od najčešćih uzroka smrti (Calderone & Fonzi 2001; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013; Sangeorzan et al. 1994).

Kandidom se većina ljudi zarazi još u ranom djetinjstvu, te je ona stalno prisutna u vidu malih populacija kao komenzal i povremeni uzročnik upala na oralnoj i nešto rjeđe na gastrointestinalnoj sluznici. Opasnost koju kandida predstavlja za čovjeka temelji se na faktoru koji vrijedi za praktički sve patogene mikroorganizme – brojnosti. Bez gole sile brojeva odnosno dostatno velike populacije mikroorganizam jednostavno nije u stanju svojim metabolizmom toliko značajno utjecati na makroorganizam – u ovom slučaju čovjeka – da bi u njemu mogao stvoriti bolesno stanje. S obzirom na to da se imunosni sustav aktivno bori protiv kolonizacije i povećanja populacije patogenih mikroorganizama kao i činjenice da postoje mnoge druge barijere u tijelu koje ih otežavaju (koža, sluznice, vrlo niski pH u želucu, prisutnost populacija drugih vrsta mikroorganizama), mikroorganizmi razvijaju razne protumjere koje im omogućavaju bilo samo kolonizaciju bilo povećanje populacije (Calderone & Fonzi 2001; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013; Sangeorzan et al. 1994).

Budući da su sluznice koje kandida najčešće kolonizira zbog sloja sluzi koji prekriva njihovu površinu i stalnih gibanja vrlo turbulentna i za mikrobnu kolonizaciju ne baš pretjerano gostoljubiva područja, razvila je niz mehanizama koji joj omogućuju razgradnju sluzi te modifikaciju površine sluznice kako bi se za nju mogla prihvatiti i neometano dijeliti te stvarati kolonije. Od tih mehanizama i faktora valja spomenuti adhezine, invazine, izvanstanične enzime (proteaze, fosfolipaze i lipaze), ulogu dimorfizma kao virulentnog faktora, ulogu biofilma kao virulentnog faktora, ulogu više različitih mehanizama za reakciju na stres te naposljetku sposobnost brze metaboličke prilagodbe na promjenu okoline (Brock 2009; Calderone & Fonzi 2001; Enjalbert et al. 2003; Kosalec et al. 2005; Kumamoto 2002; Mayer et al. 2013; Mitchell 1998; Nobile et al. 2006; Phan et al. 2007).

1.2.2. Dimorfizam kao faktor virulencije

Mehanizam koji je od presudnog značaja za razvoj kandidijaze je ranije spomenuti prijelaz iz jednostanične forme kvasca u višestaničnu filamentoznu formu (Slika 4.). Iako je forma kvasca bolja za širenje po organizmu, pokazano je da su sojevi kandide kod kojih je mutacijama onemogućen prijelaz u filamentozni oblik sa pravim hifama izrazito slabo virulentni te gotovo nikad ne mogu uzrokovati oboljenje (Brown Jr et al. 1999; Lo et al. 1997; Mayer et al. 2013). Razlog je tomu činjenica da prijelaz u višestaničnu formu predstavlja svojevrsni okidač za kandidu, budući da u višestaničnoj formi započinje sa ekspresijom brojnih drugih gena koji kodiraju za proteine vezane uz virulenciju gljive, kao što su proteini hifalne stijenke Hwp, Sap proteaze i aglutininski proteini Als (Mayer et al. 2013). Postojanje hifa u invazivnoj formi gljive omogućuje i aktivni, mehanički prodor u tkivo, pa čak i bijeg iz fagosoma u fagocitima.



Slika 4. *C. albicans* u formi kvasca (lijevo) i u višestaničnoj filamentoznoj formi (desno) (preuzeto sa theamazingmedicine.blogspot.hr)

Postoji više inicijatora prijelaza stanica kandide u filamentoznu formu, a neki od njih su pH (potreban je pH 7 ili viši), temperatura (idealno oko 37 °C) te kontakt s površinom (nema prijelaza u filamentoznu formu dok je kandida primjerice u sluzi ali ne na površini sluznice ili dok je u krvotoku prilikom kandidemije) (Calderone & Fonzi 2001; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013). Na površinama koje nisu glatke nego naborane hife gljive pokazuju tigmotropizam (usmjereni rast) određen primarno kroz izvanstaničnu koncentraciju kalcija (Brand et al. 2007).

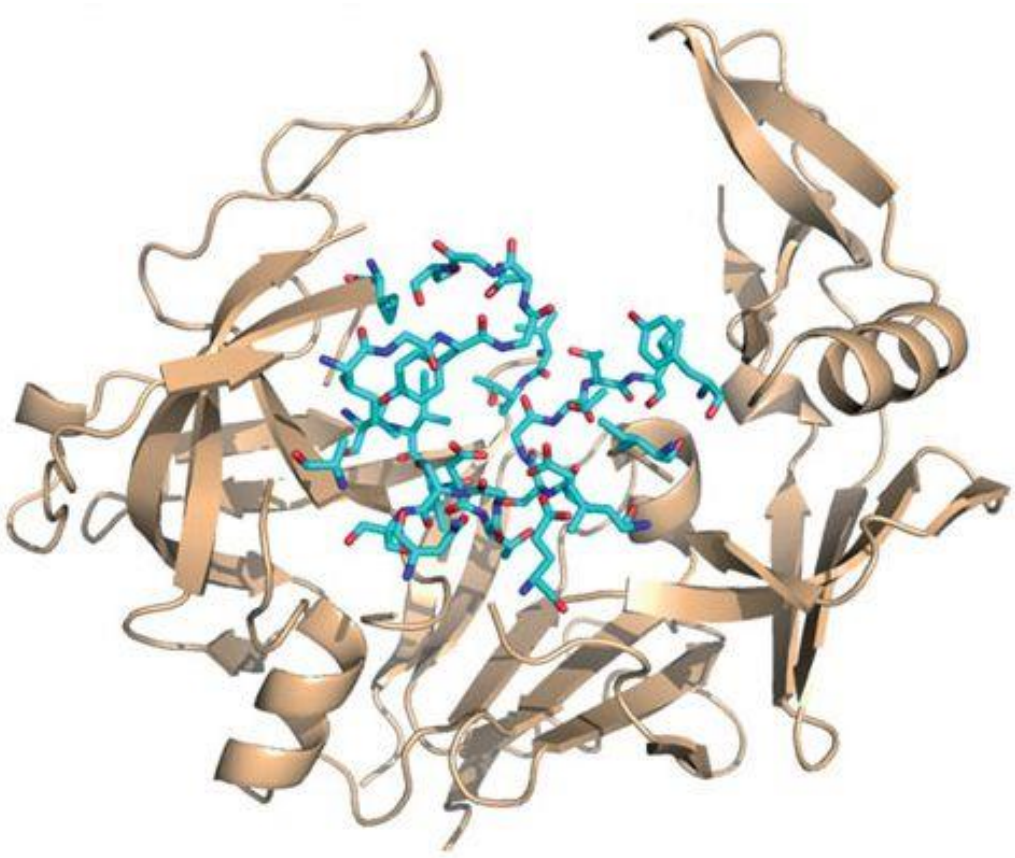
1.2.3. Adhezini i invazini

Nakon prijelaza u višestaničnu formu, važnu ulogu igraju površinski proteini adhezini koji omogućuju i pričvršćivanje na podlogu – prvenstveno na stijenku sluznice – i vezanje među stanicama kandide. Najznačajnija i najbolje istražena skupina adhezina su Als aglutininski glikoproteini, a naročito protein Als3, kojem je dokazana uloga ne samo u adheziji na oralnu i vaginalnu sluznicu nego i u formiranju biofilma te indukciji endocitoze (Mayer et al. 2013; Phan et al. 2007). U adhezine spadaju i neki proteini hifalne stijenke Hwp, kao primjerice Hwp1, koji omogućuje kovalentno vezanje za stanice budući da se radi o supstratu transglutaminaza sa površine stanica sisavaca (Mayer et al. 2013; Nobile et al. 2006).

Invazinima se naziva površinske proteine koji omogućuju prodor gljive u stanice epitela i endotela kroz indukciju endocitoze, a primarno se misli na ranije spomenuti Als3 i Ssa1, protein koji spada u proteine reakcije na toplinski stres (*heat shock proteins* - Hsp). Ovi proteini se vežu za kadherine na površini stanica i tako potiču endocitozu hife, a čak i mrtve hife potiču ovakvu reakciju (Dalle et al. 2010; Mayer et al. 2013).

1.2.4. Hidrolitički enzimi

Jedan od najznačajnijih faktora virulencije kandide jesu hidrolitički enzimi koje izlučuje u stanični okoliš uslijed i nakon adhezije za površinu sluznice. Njihove su uloge mnogobrojne – razgrađuju sluz koju luči sluznica, modificiraju površinu epitelnih i endotelnih stanica kako bi olakšali adheziju, te cijepanjem proteina i lipida u staničnom okolišu priskrbljuju stanici hranu (Höfling et al. 2011; Kosalec et al. 2005; Mayer et al. 2013; Stehr et al. 2003). Ti su enzimi s obzirom na supstrat podijeljeni na aspartil-proteaze (Sap proteaze) (Slika 5.), fosfolipaze (Pl fosfolipaze) i lipaze (Lip lipaze). Kandida eksprimira deset različitih Sap proteaza od kojih je osam (Sap 1-8) slobodno a dvije (Sap 9-10) vezane za površinu stanice, četiri različite klase Pl fosfolipaza od kojih je samo pet iz klase B (Plb 1-5) izvanstanično i značajno za virulentnost te deset Lip lipaza (Lip 1-10) (Mayer et al. 2013). Eksperimentalno je dokazano da mutacije koje čine kandidu deficijentnom u proizvodnji jedne ili više skupina hidrolitičkih enzima značajno smanjuju virulenciju soja koji nosi dotičnu mutaciju u odnosu na sojeve bez mutacije (Gácser et al. 2007; Mayer et al. 2013; Moran et al. 2012; Theiss et al. 2006).



Slika 5. Model strukture Sap2 proteaze iz *C. albicans*
(prilagođeno prema Cassone 2013)

Osim ranije navedenih zajedničkih značajki (modifikacija staničnog okoliša i pribavljanje dodatnih nutrijenata), svaka od tri skupine hidrolitičkih enzima koje kandida luči ima i neke svojstvene samo njima. Tako Sap proteaze sudjeluju i u prodiranju u tkivo budući da svojom aktivnošću direktno mogu oštećivati kolagen i ostale proteinske komponente tkiva, Pl fosfolipaze destabliziraju staničnu membranu epitelnih i endotelnih stanica, a lipaze moduliraju staničnu signalizaciju između stanica u svom okružju (Mayer et al. 2013; Tóth et al. 2014). Valja spomenuti i to da je ove enzime realnije promatrati kao dio sustava koji posjeduje sinergističke elemente koji se međusobno potpomažu nego kao zasebne faktore virulentnosti koji rade neovisno jedan o drugome.

1.2.5. Biofilm kao faktor virulencije

Tvorba biofilmova je svojstvena velikom broju mikroorganizama, bilo da se radi o homogenim ili heterogenim biofilmovima, odnosno onima u čijoj formaciji sudjeluje samo jedna ili više vrsta. Što se tiče kandide, formiranje biofilma u tijelu oboljele osobe bilo na živoj (najčešće sluznica) bilo na neživoj (medicinski implantati) podlozi predstavlja vrlo efikasnu prilagodbu na nepovoljne uvjete kojima bi mogla biti ili jest izložena.

Razvoj biofilma kandide može se izložiti na najučestalijem primjeru, a to je biofilm koji nastaje prilikom oralne kandidijaze. Nakon adhezije za sluznicu te diobi stanice kandide počinju rasti u slojevima, s time da se vanjski sloj odnosno površina biofilma u nastajanju sastoji od stanica koje su prešle u višestaničnu formu, dok se u unutrašnjosti biofilma zadržavaju stanice u formi kvasca koje se nastavljaju dijeliti. Stanice na površini biofilma luče velike količine tvari (uglavnom glikoproteina i polisaharida) gradeći tako izvanstanični matriks biofilma koji djeluje i kao dodatni fiksator i kao barijera, bilo za prilaz stanicama imunosnog sustava bilo za lijekove (Kumamoto 2002; Mayer et al. 2013). Kao zadnja faza slijedi faza tzv. zrelog biofilma, u kojoj se stanice u formi kvasca iz unutrašnjosti biofilma otpušta van kako bi se kandida raširila dalje po organizmu, a za što je značajan regulator jedan od bitnijih proteina za reakciju na toplinski stres, Hsp90 (Robbins et al. 2011).

Kao bitna komponenta matriksa biofilma naročito se ističu β-glukani. Za njih je između ostalog pokazano da ometaju neutrofilne leukocite (Xie et al. 2012). Sojevi kandide koji nisu u stanju proizvoditi β-glukane i/ili ostale komponente izvanstaničnog matriksa biofilma u pravilu su slabije virulencije i osjetljiviji na antimikotike budući da tvore nepravilne i defektne biofilmove (Mukherjee & Chandra 2004; Taff et al. 2012).

1.2.6. Mehanizmi reakcije na stres

S obzirom na veliku raznolikost životnih uvjeta u kojima se može naći unutar relativno kratkog vremena, kandida je razvila i odgovarajuće impresivan repertoar mogućnosti prilagodbe na promjene u svojoj okolini, bilo da se radi o fiziološkim šokovima kao što su nagle promjene osmotskog tlaka ili temperature ili o promjenama u dostupnosti hranjivih tvari. Na fiziološke šokove odgovara aktivacijom mehanizama reakcije na stres, a na promjenu dostupnosti hranjivih tvari prilagodbom metaboličkih puteva, a mutacije komponenti navedenih mehanizama uvelike smanjuju virulentnost gljive i sposobnost njena preživljenja (Enjalbert et al. 2003; Mayer et al. 2013).

Jedan od važnijih čimbenika koji kandida detektira i po kojem se ravna jest pH okoline, koji u ljudskom tijelu može jako varirati. Tako je pH krvi i tkiva 7.4, vagine oko 4, kože oko 5.5 a gastrointestinalnog trakta od 2 (želudac) do 8.5 (dvanaesnik) (Davis 2009). I ekstremno visoki i ekstremno niski pH za kandidu bi bio fatalan kad ne bi mogla odgovarajuće reagirati na njih, a ne smije se zaboraviti ni to da prijelaz u filamentozni oblik zahtijeva relativno lužnatu okolinu. Za detekciju pH kandida koristi primarno dva enzima u staničnoj stijenci – β- glikozidaze Phr1 i Phr2 (Fonzi 1999). Phr1 je prisutna pri neutralnom i blago lužnatom pH dok je Phr2 prisutna pri kiselom pH, pa je vodeći se ranije navedenim vrijednostima pH u različitim dijelovima ljudskog tijela vidljivo je da je Phr1 aktivan prilikom kandidemija i infekcija unutarnjih organa, dok je Phr2 aktivan prilikom kožnih i vaginalnih infekcija (Mayer et al. 2013; Mühlschlegel & Fonzi 1997).

Drugi važan mehanizam reakcije na stres jest onaj za reakciju na toplinski šok. Promjena temperature lako bi mogla uzrokovati denaturaciju i agregaciju brojnih proteina u stanici kad ne bi bilo mehanizma zaštite od takve sudbine. Mehanizam reakcije na toplinski šok velikom je većinom konzerviran kod svih živih organizama, a posredovan je chaperone proteinima skupine Hsp koji održavaju strukturu proteina uslijed temperaturne promjene a aktiviraju se i uslijed drugih oblika stresa koji bi mogli rezultirati denaturacijom proteina. Kod kandida uz klasične Hsp proteine nalazimo i tzv. male Hsp proteine (sHsp), tako nazvane zbog manje molekularne mase u odnosu na klasične Hsp proteine, a koji otežavaju agregaciju proteina uslijed temperaturnih i ostalih šokova za stanicu (Haslbeck et al. 1999; Mayer et al. 2013). Za ekspresiju Hsp proteina zadužen je transkripcijski faktor Hsf1. U održavanje nativne strukture proteina uslijed toplinskog šoka uključen je i disaharid trehaloza, koji se akumulira u stanici pri naglom porastu temperature, ali njegova uloga nije još potpuno razjašnjena (Argüelles 1997).

Promjene u koncentraciji otopljenih tvari u staničnom okolišu koje nastupaju bilo prilikom uobičajenih procesa u gastrointestinalnom traktu (nagli porast nakon hranjenja) bilo prilikom prijelaza stanica kandide u drugi okoliš (primjerice u krv ili unutrašnjost fagocita) česta su pojava, a osmotski šok kojim rezultiraju lako bi mogao dovesti do destabilizacije cijele stanice. Pretjerani unos vode u stanicu relativno je rijedak u staničnom okolišu kandide, a protiv njega je ionako dobro zaštićena staničnom stijenkom koja sprječava pucanje. S druge strane, gubitak vode uslijed više koncentracije tvari u staničnoj okolini prilično je čest i predstavljao bi velik problem kad ga stanica ne bi mogla kontrolirati. U slučaju kandide on se kompenzira unutarstaničnom proizvodnjom i akumulacijom glicerola, koji omogućava zadržavanje jednakog volumena tekućine u stanici. Za proizvodnju glicerola zaslužna su dva enzima, glicerol-3-fosfataza Gpp1 i glicerol-3-fosfat dehidrogenaza Gpd2 (Wächtler et al. 2011).

Oksidativni šok kod kandide najčešće je izazvan u kontaktima sa stanicama ljudskog imunosnog sustava koje primjenjuju reaktivne oblike kisika (ROS) kao sredstvo uništenja kandide, i to ili direktno u tkivima ili u fagosomima fagocita. Mehanizam koji kandida primjenjuje bazira se prvenstveno na aktivnoj enzimatskoj razgradnji reaktivnih oblika kisika – vodikov peroksid (H_2O_2) razgrađuje katalaza Cta1 a superoksidni ion (O_2^-) superoksid dismutaze Sod1 i Sod5 (Mayer et al. 2013). Još jedna vrsta staničnog stresa srodna oksidativnom koji se također vezuje uz djelovanje stanica ljudskog imunosnog sustava jest nitrozativni šok. Naime, neutrofili kao antimikrobno sredstvo ne sintetiziraju samo reaktivne oblike kisika nego i reaktivne oblike dušika, kojih je najznačajniji predstavnik peroksinitritni ion ($ONOO^-$). Sa reakcijom na nitrozativni šok povezuje se ponajprije flavohemoglobinski protein Yhb1 (Hromatka et al. 2005).

Unutar same stanice, mehanizme za reakciju na stresove pokreću signalni putevi. Tako reakcija na promjenu pH ide preko Rim101 signalnog puta dok detekciju i reakciju na ostale navedene oblike staničnog stresa posreduju MAP kinazni signalni putevi – Mkc1 signalni put sudjeluje u reakciji na oksidativni i osmotski šok, Hog1 signalni put pokreće sintezu glicerola uslijed osmotskog stresa a Cek1 signalni put osim signalizacije za promjenu forme (forma kvasca u filamentoznu formu odnosno „white“ forma kvasca u „opaque“ formu kvasca) sudjeluje u reakciji na toplinski šok (Monge et al. 2006). Kod kandide je prisutna i komunikacija među različitim signalnim putevima, najbolje oslikana kroz činjenicu da aktivacija pojedinog puta u pravilu aktivira u slabijoj mjeri i druge puteve, tako da reakcija na jednu vrstu stresa može pokrenuti i stanične mehanizme vezane uz druge vrste stresova.

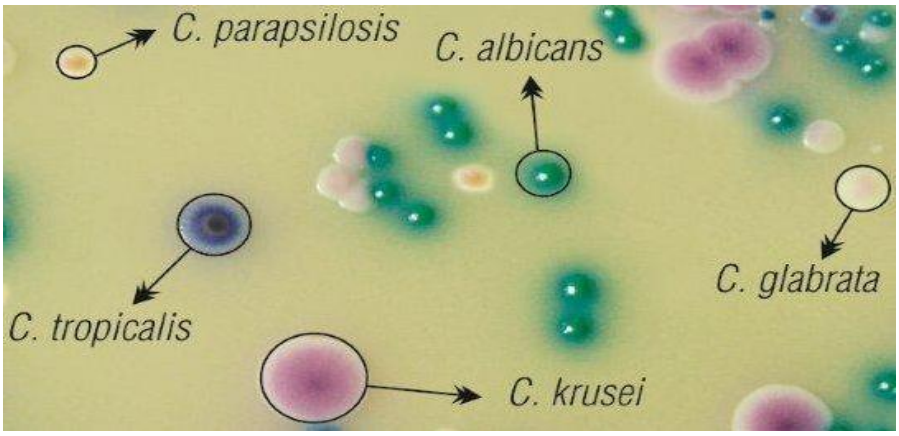
1.2.7. Metabolička prilagodba

Budući da se radi o gljivi koja većinu hrane uzima iz okoliša, dakle od zaražene osobe, apsorpcijom već dostupnih ili enzimatskim cijepanjem nedostupnih tvari, važno je primijetiti da se kandida unutar ljudskog tijela lako može iznenada naći u okolini koja nije različita samo fiziološki, nego i nutritivno, po dostupnosti hranjivih tvari. Na sluznicama gastrointestinalnog trakta koje preferira kao životni prostor dostupnost hranjivih tvari je velika (unatoč kompeticiji drugih mikroorganizama), kao i primjerice u krvotoku i mozgu (visoka koncentracija glukoze) te jetri (glikogen), no u mnogim drugim organima i tkivima u kojima bi se mogla zateći kao i u unutrašnjosti makrofaga i neutrofila (kad ju fagocitiraju) kandida je suočena sa umjerenim do izrazitim manjkom gotovo svih potrebnih nutrijenata (Mayer et al. 2013).

Kako bi izbjegla smrt izgladnjivanjem, kandida je u stanju vrlo se brzo prebaciti sa glikolitičkog na glioksilatni ciklus, odnosno ciklus glukoneogeneze, koristeći pritom lipide i aminokiseline do kojih dolazi aktivnošću svojih izvanstaničnih hidrolitičkih enzima (Brock 2009; Mayer et al. 2013). Na raspolaganju su i joj i alternativni redundantni međusobno neovisni metabolički putevi pomoću kojih može iskoristiti gotovo svaki nutrijent u okolini u kojoj se nalazi, što joj omogućuje naseljavanje i rast u praktički svim organima ljudskog tijela prilikom sistemske infekcije. Metabolička prilagodba se nadopunja sa ostalim virulentnim faktorima kandide, kao što su mehanizmi reakcije na stres, djelovanje izvanstaničnih hidrolitičkih enzima i dimorfizam (apsorpcijom aminokiselina raste pH neposredne stanične okoline što inducira formaciju hifa).

1.3. Liječenje kandidijaza

Prije započinjanja ikakvog liječenja, ključno je zadovoljiti nekoliko preduvjeta: potvrditi vrstu kandidijaze (oralna, vaginalna, sistemska, itd.); ustanoviti je li uzročnik baš *Candida albicans* a ne primjerice neki drugi pripadnik roda *Candida* (Slika 6.); provjeriti o kojem se soju kandide radi. Sva tri navedena faktora nezaobilazna su pri odabiru medikamenata koje se prepisuje, s obzirom na to da različite vrste roda *Candida*, različiti sojevi *C. albicans* pa i isti soj ali u različitom tkivu nisu svi jednako osjetljivi na iste lijekove, a korištenje krivog lijeka bi lako moglo dovesti samo do dodatne štete za tijelo (gotovo svi imaju neugodne nuspojave za čovjeka budući da je kandida eukariot) a gotovo nikakve za gljivu.

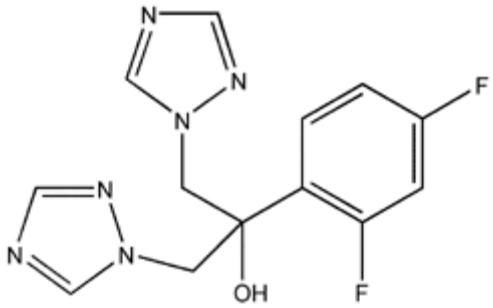


Slika 6. Različite vrste roda *Candida* na HiCrom™ diferencijalnom agaru (preuzeto sa www.ridacom.com i prilagođeno)

1.3.1. Uobičajena terapija

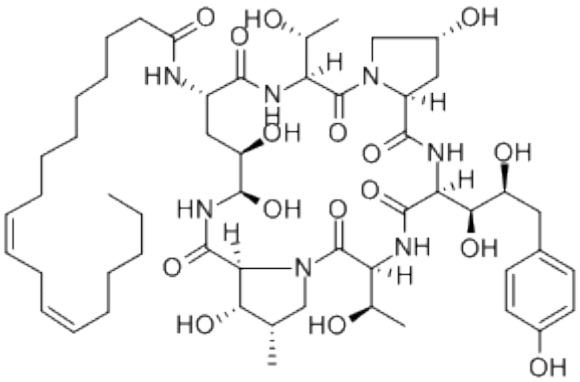
Za tretiranje kandidijaza koriste se različiti antimikotici, bilo zasebno bilo u kombinaciji, ovisno već o tome radi li se o lokaliziranoj ili sistemskoj kandidijazi, te ako je lokalizirana ovisno o lokaciji infekcije, a važan je i način primjene – dok se za lokalne infekcije koristi kreme i oralne preparate, za sistemsku kandidijazu u pravilu se lijekove daje intravenozno (Pappas et al. 2015). Iz navedenih je razloga teško govoriti o univerzalnoj terapiji za kandidijaze, makar se neke lijekove koristi bitno češće od drugih, za što je dobar primjer flukonazol. Lijekovi koji se obično koriste za tretiranje kandidijaze su azoli, ehinokandini i amfotericin B (Pappas et al. 2015).

Lijekovi na bazi azola, tj. preciznije rečeno na bazi imidazola i triazola, jedna su od najčešće primjenjivanih skupina antimikotika, koji se koriste za liječenje i lokaliziranih i sistemskih kandidijaza. U farmaceutskim laboratorijima diljem svijeta se stalno sintetiziraju i testiraju novi spojevi iz ove skupine, i kako bi se postigao maksimum učinka uz minimum nuspojava, i kako bi se ostalo ukorak sa populacijama patogenih gljiva koje pokazuju polagan ali siguran porast otpornosti na najčešće upotrebljavane azolne lijekove kao što su flukonazol (Slika 7.) i vorikonazol (Pappas et al. 2015). Dok se imidazolni derivati koriste primarno kao kreme za površinsku primjenu, triazolni lijekovi se uglavnom daju oralno i intravenozno. Mehanizam antifungalnog djelovanja ovih tvari baziran je na njihovom inhibitornom učinku na lanosterol-14α-demetilazu, jedan od enzima iz fungalne citokrom P450 skupine (Trösken et al. 2006). On se nalazi u lancu sinteze ergosterola, važne komponente stanične membrane gljiva, a prekid njegove produkcije rezultira zaustavljanjem rasta te uz veće doze lijeka i smrću stanica kandide. Nuspojave kod ljudi vezane su uz učinak na enzime iz ljudske citokrom P450 skupine (koji je puno slabiji nego na enzime iz fungalne citokrom P450 skupine), koji su uglavnom uključeni u proces biosinteze steroida i metabolizacije lijekova, te se ovisno o osobi, dozi i vremenu korištenja protežu od glavobolja i mučnina do ozbiljnih hormonalnih poremećaja (Pappas et al. 2015). Otpornost na azolne lijekove kod kandida se javlja ili u vidu mutacija u genu koji kodira za lanosterol-14α-demetilazu a rezultira povećanom ekspresijom ili promijenjenim veznim mjestom za lijek, ili u vidu povećane ekspresije membranskih transportera koji izbacuju molekule lijeka iz stanice (Spampinato & Leonardi 2013).



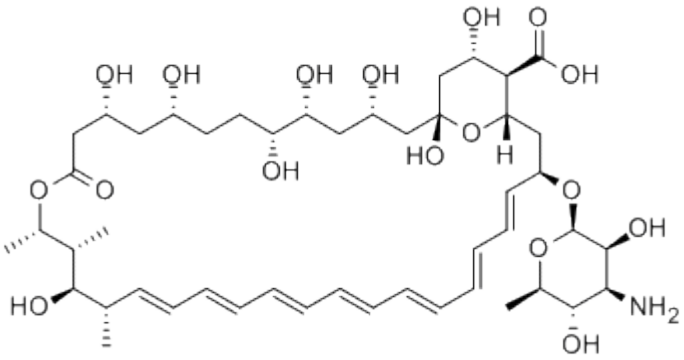
Slika 7. Struktura flukonazola, triazolnog antimikotika (preuzeto sa www.medications.li)

Ehinokandini (Slika 8.) su kompleksni polusintetski lipopeptidi vrlo privlačni kao antifungalni lijekovi budući da se rezistencija na njih javlja rijetko, razina toksičnosti za čovjeka im je slaba do nikakva, a fungicidni učinak dobar. Često se daju pacijentima sa invazivnom kandidijazom zaraženima sojem kandide rezistentnim na azolne lijekove te pacijentima kod kojih se razvio biofilm kandide, a s obzirom na kompleksnu građu molekule daju se intravenozno (Pappas et al. 2015). Mehanizam antifungalnog djelovanja ehinokandina zasniva se na njihovom inhibitornom učinku na β-1,3-glukan sintazni kompleks te tako sprječava normalnu proizvodnju glukana koji su jedan od ključnih gradivnih elemenata stanične stijenke kandide (Spampinato & Leonardi 2013). To rezultira slabljenjem stijenke i pucanjem stanice zbog nadiranja vode kao posljedice osmotskog tlaka. Nuspojave kod ljudi uglavnom su blage i ograničene na groznice, glavobolje i ponešto izmijenjenu krvnu sliku (Pappas et al. 2015). Rezistentnost na ehinokandine kod kandida je, kao što je već spomenuto ranije, poprilično rijetka, a kad je prisutna to je uvijek u vidu mutacija u genima FKS1 i FKS2 koje rezultiraju promjenom veznog mjesta za lijekove u β-1,3-glukan sintaznom kompleksu (Spampinato & Leonardi 2013).



Slika 8. Struktura ehinokandina B, kompleksnog polusintetskog lipopeptidnog antimikotika
(preuzeto sa www.chemicalbook.com)

Amfotericin B (Slika 9.) je polien kojeg sintetizira bakterija *Streptomyces nodosus*, a on i njegovi derivati su jedni od najjačih trenutno korištenih antimikotika, makar uz više doze i dulju upotrebu često imaju ozbiljne nuspojave. Danas se u pravilu koristi kod vitalno ugroženih pacijenata (npr. sistemska kandidijaza uz soj kandide rezistentan na azolne lijekove) u kombinaciji sa drugim lijekovima, najčešće ehinokandinima, a daje se intravenozno (Pappas et al. 2015). Antifungalni učinak amfotericina B bazira se na njegovom velikom afinitetu za sterole u staničnoj membrani, i to naročito ergosterol, spomenut ranije kao važan za konzistentnost stanične membrane gljiva. Vezanjem za ergosterol amfotericin B ga povlači iz membrane i ostavlja u njoj rupe kroz koje je raznim tvarima i ionima omogućen neometan ulazak u i izlazak iz stanice, što u konačnici rezultira staničnom smrću (Spampinato & Leonardi 2013). Najozbiljnije nuspojave kod ljudi vezane su uz nefrotoksičnost i hepatotoksičnost amfotericina B te gotovo redovite snažne groznice koje nastupaju nedugo nakon davanja lijeka – kao što se veže za ergosterol u staničnoj membrani gljiva amfotericin B može se vezati i za kolesterol u staničnoj membrani ljudskih stanica sa sličnim posljedicama (Pappas et al. 2015). Ipak, valja naglasiti da ima manji afinitet za kolesterol nego za ergosterol.



Slika 9. Struktura amfotericina B, polienskog antimikotika
(preuzeto sa www.chemicalbook.com)

1.3.2. Alternativni suvremeni pristup

Razvoj mikrobicidnih lijekova koji je značajna komponenta suvremene farmaceutske industrije predstavlja svojevrsnu bitku s vremenom koju je u konačnici gotovo nemoguće dobiti. Antibiotici i antimikotici sa letalnim djelovanjem istrijebit će sve patogene u populaciji osim onih koji su zbog neke mutacije rezistentni na lijek, a zbog velike brzine multiplikacije mikrobnih patogena koja je orijentirana na proizvodnju klonova – diobom kod bakterija i pupanjem kod kvasaca – ti će rezistentni mutanti, ako ih nešto drugo u međuvremenu ne ubije (primjerice stanice imunosnog sustava), ubrzo činiti novu, rezistentnu populaciju, na koju dani lijek više ne djeluje. Evolucijskim rječnikom govoreći, primjenom mikrobicidnih lijekova vrši se snažan selekcijski pritisak na populaciju mikroba koji favorizira rezistentne jedinke odnosno rezultira nastankom rezistentnih sojeva, koji se onda šire među ljudskom populacijom i predstavljaju zdravstveni problem te zahtijevaju razvoj novih lijekova (Spampinato & Leonardi 2013). Ovaj proces odnosno ciklus koji se sastoji od nekoliko koraka – primjena mikrobicidnog lijeka, selekcija rezistentnih mutanata, nastanak rezistentnog soja, razvoj novog mikrobicidnog lijeka – može teoretski ponavljati unedogled, no u nekoj daljoj ili bližoj budućnosti vrlo izvjesno završava pojavom jednog ili više sojeva jednog ili više patogenih mikroorganizama koji je rezistentan na sve dostupne lijekove a širi se vrlo brzo i vrlo je letalan.

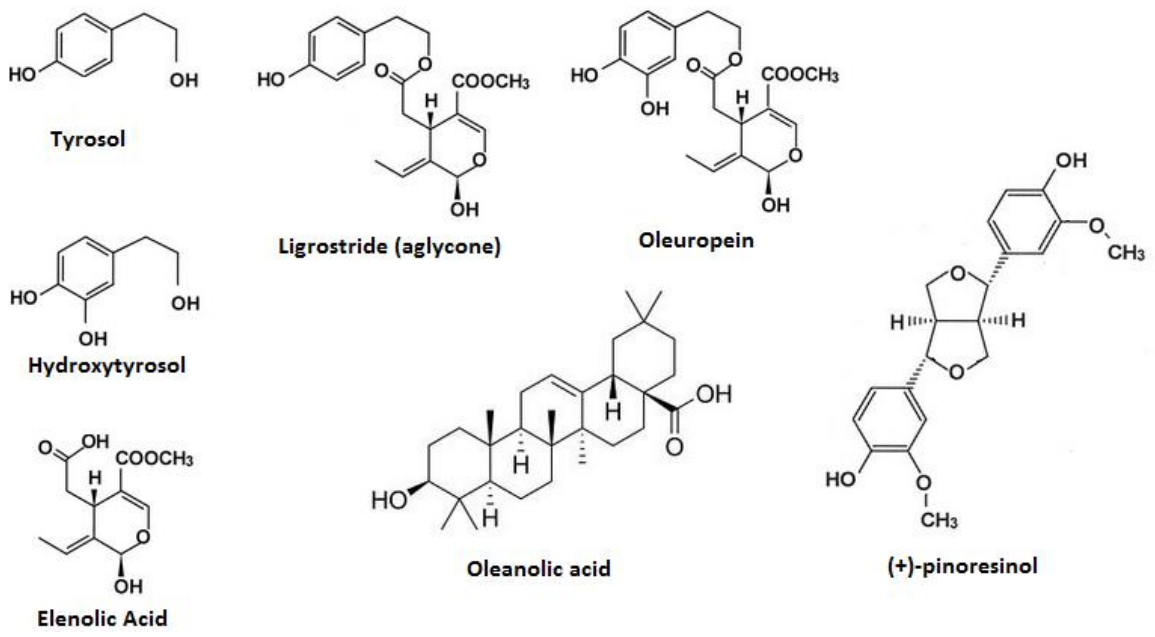
Kako bi se spriječilo ovakav razvoj događaja, problemu tretiranja zaraznih bolesti danas se sve više prilazi iz drugih smjerova. Prvi i najvažniji pristup svakako je cijepljenje protiv onih patogena za koje je to moguće, s obzirom na to da je uz odgovarajuću pripremu koju mu cijepljenje pruža ljudski imunosni sustav sasvim sposoban nositi se s njima. U slučaju bolesti koje uzrokuju mikroorganizami protiv kojih je cjepiva ili nepraktično ili besmisleno raditi (npr. zbog visoke stope mutacije), sve se više zagovara korištenje lijekova koji na njih ne djeluju letalno nego atenuirajuće, odnosno kroz blokadu njihovih virulentnih faktora (Gauwerky et al. 2009; Mayer et al. 2013). Budući da atenuacijom ne dolazi do smrti mikroorganizama, ni onih koji su rezistentni na lijek ni onih koji nisu, bitno je smanjen selektivni pritisak na populaciju te usporen porast zastupljenosti rezistentnih jedinki u njoj, što pak opet uz činjenicu da je virulencija patogena oslabljena daje imunosnom sustavu dovoljno vremena da ukloni uzročnika bolesti sam ili da se koristi kombinacija letalnog i atenuirajućeg lijeka sa poboljšanim učinkom (Gauwerky et al. 2009; Pappas et al. 2015).

1.3.3. Antifungalne molekule prirodnog podrijetla

Kao što je prethodno navedeno, patogene gljive predstavljaju veći izazov za farmakološko liječenje od bakterija budući da se radi o eukariotima, te je stoga teže protiv njih proizvesti lijek visoke specifičnosti – učinkovit i bez izraženih nuspojava odnosno relativno niske toksičnosti za čovjeka – nego je to protiv bakterija koje su prokarioti. Osim ispitivanja različitih sintetskih molekula koje bi zadovoljile ove kriterije, interes istraživača usmjerio se i prema tvarima prirodnog podrijetla (Negri et al. 2014; Spampinato & Leonardi 2013). U tradicionalnoj a u novije vrijeme i alternativnoj medicini naročito se prakticira primjena različitih ljekovitih biljaka kao sastojaka tinktura, masti, sirupa i ostalih pripravaka za liječenje brojnih bolesti, pa tako i onih koje suvremena medicina prepoznaje kao mikoze, te se stoga fokus istraživanja usmjerio prema njima (Höfling et al. 2011; Yordanov et al. 2008). To dakako ne znači da se ne istražuje i druge potencijalne izvore antimikotika, primarno bakterije, ali u manjoj mjeri nego ljekovite biljke.

Kad se govori o ljekovitim biljkama kao izvoru prirodnih tvari sa antifungalnim učinkom, misli se primarno na njihove sekundarne metabolite, odnosno tvari koje nisu izravno uključene u rast i razvoj biljke – alkaloide, fenole, flavonoide, glikozide, itd. – a koji imaju najčešće zaštitnu ulogu u životu biljke, bilo da djeluju kao repelanti za biljojede bilo da djeluju antifungalno ili antibakterijski (Holm Freiesleben & Jäger 2014). Tvari se najčešće dobiva ekstrakcijom iz biljke nakon koje slijedi razdvajanje metodama poput HPLC-a te naposljetku identifikacija u slučaju da se radi o biljci za koju aktivne tvari još nisu poznate (Holm Freiesleben & Jäger 2014; Höfling et al. 2011). Antifungalni učinak mnogih sekundarnih metabolita iz ljekovitih biljaka slabiji je od onog koji pokazuju komercijalni lijekovi (potrebna je veća koncentracija tvari kako bi se postigao isti učinak) ali u pravilu je širi spektra djelovanja, odnosno djeluje na više virulentnih faktora, a kombinirani učinak više takvih tvari iz iste vrste često je sinergistički. Ove dvije uočene pojave razlog su rjeđe pojave rezistentnosti na sekundarne metabolite biljaka u odnosu na komercijalne lijekove, makar su u pravilu neprikladni za izravno korištenje kao lijekovi.

Selekcija ljekovitih biljaka na kojima će se provoditi istraživanje vrši se kroz analizu primjene u tradicionalnoj i alternativnoj medicini. Dobar primjer za to je odabir masline (*Olea europaea*) kao potencijalnog kandidata za izvor tvari sa antifungalnim učinkom. U tradicionalnoj medicini dijelovi ove biljke često se primjenjuju za ublažavanje simptoma gljivičnih infekcija, pa se tako ulje koristi kao tinktura za dermatomikoze (npr. prhut na tjemenu) a lišće se žvače kod oralne kandidijaze – ekstrakcijom je i iz ulja i iz lišća ove biljke izoliran veći broj tvari čiji se mehanizam antifungalnog djelovanja još uvijek istražuje, a među zanimljivijima su fenolni spojevi poput oleuropeina (Slika 10.) (Hashmi et al. 2015).



Slika 10. Strukture fenolnih i polifenolnih spojeva iz ekstrakta maslinovog lista, među kojima se nalaze i oleuropein i njegov derivat, hidroksitirozol (preuzeto sa examine.com)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja ustanoviti imaju li hidroksitirozol i oleuropein, tvari izolirane iz ekstrakta maslinovog lista (*Olea europaea*), inhibitorni učinak na izvanstanične proteaze (Sap) i lipaze (Lip) gljive *Candida albicans*, koja je najniža od ispitivanih koncentracija (odgovaraju ranije eksperimentalno utvrđenim vrijednostima MIK, ½ MIK i ¼ MIK za *C. albicans* za obje tvari) pri kojoj se za pojedinu tvar može uočiti inhibitorno djelovanje, te koja od tih tvari i pri kojoj koncentraciji najjače inhibira ove enzime. Važno je i provesti statističku obradu podataka te ih usporediti sa podatcima o već poznatim inhibitorima izvanstaničnih proteaza i lipaza *C. albicans* kako bi se moglo odrediti značaj dobivenih rezultata te potencijal ove dvije tvari za daljnja istraživanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) hidroksitirozola i oleuropeina za *C. albicans*

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije hidroksitirozola (Extrasynthese, Francuska) i oleuropeina (Extrasynthese, Francuska) za *C. albicans* korištena su dva soja kandide, jedan generički soj (ATCC 10231) i jedan klinički izolat (MFBF 11103) – oba su soja uzeta iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovi sojevi nasađeni su na Sabouraudov 2%-tni glukozni agar (pH 5.6) (Tablica 1.) te ostavljeni u inkubatoru rasti dva dana na 37 °C kako bi dostigli eksponencijalnu fazu rasta, nakon čega su prebačeni u fiziološku otopinu uz gustoću standardiziranu na denzitometru (Densimat, Biomerieux, Francuska) na MacFarland 0.5 (~$5x10^6$ stanica).

Tablica 1. Sastav Sabouraudovog agara, krute hranjive podloge za uzgoj kvasaca, uz dodatak glukoze

Tvar	Koncentracija
Dekstroza	40 g/l
Pepton	10 g/l
Agar	20 g/l
Glukoza	2% (m/v)

Iz ovako dobivenih stock suspenzija za potrebe testiranja rađena su razrjeđenja sa fiziološkom otopinom u omjeru 1:10 kako bi se dobilo radne suspenzije. Samo testiranje je u potpunosti provedeno prema uputama iz dokumenta M27-A2 (National Comitee on Clinical Laboratory Standards 2002), dakle korištena je metoda dvostruke serijske mikrodilucije sa RPMI 1640 2%-tnim glukoznim medijem (Sigma-Aldrich, SAD) u mikrotitracijskim pločicama sa 96 jažica. U negativnoj kontroli je u jažice dodan RPMI 1640 2%-tni glukozni medij bez hidroksitirozola ili oleuropeina, a u pozitivnoj kontroli je u jažice dodan RPMI 1640 2%-tni glukozni medij sa amfotericinom B (Sigma-Aldrich, SAD). Kako bi se odredilo MIK za hidroksitirozol i oleuropein, nasađeno je po 10 µl iz svakog razrjeđenja na Sabouraudov 2%-tni glukozni agar i ostavljeno u inkubatoru rasti dva dana na 35 °C.

3.2. Indukcija Sap proteaza i Lip lipaza

Kao izvor stanica korišteno je više kliničkih izolata vrste *C. albicans* (Zbirka mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) (Tablica 2.), koji su bili podijeljeni na one podrijetlom iz crijeva (oznake sojeva: 351, 353, 354, 422, 424 i 425) i one podrijetlom iz rodnice (oznake sojeva: 774, 775, 781, 783, 784 i 799). Ovi su izolati nasađeni na Sabouraudov 2%-tni glukozni agar (pH 5.6) te ostavljeni u inkubatoru rasti dva dana na 37 °C kako bi dostigli eksponencijalnu fazu rasta. Porasla biomasa je potom nasađena u dva različita tekuća medija za indukciju, jedan za proteaze i drugi za lipaze, uz gustoću prethodno standardiziranu na denzitometru na MacFarland 0.5.

Tablica 2. Sojevi *C. albicans* iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korišteni za indukciju Sap proteaza i Lip lipaza. Navedeni su sojevi klinički izolati.

Sojevi iz crijeva	Sojevi iz rodnice
351	774
353	775
354	781
422	783
424	784
425	799

Postupci za indukciju proteaza i lipaza pripremljeni su po uzoru na Yordanov et al. (2008), čiji je pak postupak za indukciju proteaza prilagođena verzija onog iz Dostál et al. (2003). Za indukciju proteaza korištena je Remoldova BSA tekuća podloga (pH 5.2-5.6, bez $(NH_4)_2SO_4$ i aminokiselina) (Tablica 3.). Blastospore u mediju za indukciju proteaza inkubirane su 7 dana na orbitalnoj tresilici pri 150 rpm i temperaturi od 27 °C nakon čega su profiltrirane na nitroceluloznom membranskom filtru (0.22 µm) pa je supernatant sa enzimima zaleđen na -20 °C. Za indukciju lipaza korišten je YNB tekući medij (pH 5.2-5.6) (Tablica 2.). Blastospore u mediju za indukciju lipaza inkubirane su 1 dan na orbitalnoj tresilici pri 150 rpm i temperaturi od 37 °C.

Tablica 3. Sastavi medija za indukciju proteaza i lipaza. Legenda: *kvaščeva bazična podloga s dušikom (Sigma-Aldrich, SAD); **goveđi serumski albumin (Sigma-Aldrich, SAD); ***polisorbat 20 (Sigma-Aldrich, SAD)

Medij za indukciju proteaza (modificirani Remoldov tekući medij)		**Medij za indukciju lipaza (modificirani YNB tekući medij)**	
Tvar	**Koncentracija**	**Tvar**	**Koncentracija**
glukoza	2% (m/v)	YNB*	0,67% (m/v)
KH2PO4	0,1% (m/v)	Tween 20***	2,5% (w/v)
MgSO4	0,5% (m/v)		
YNB*	0,7% (m/v)		
BSA**	1% (m/v)		

3.3. Proteaze – selekcija najproduktivnijeg soja i inhibicijski test

Za selekciju sojeva sa najvećom produkcijom proteaza kao i za ihnibicijski test koji slijedi nakon selekcije postupak je pripremljen po uzoru na Höfling et al. (2011) i Yordanov et al. (2008). Nakon odleđivanja otopina sa enzimima u Eppendorf mikroepruvetama pripremljene su reakcijske smjese prema planu navedenom u tablici (Tablica 4.). Sve su smjese inkubirane sat vremena na 37 °C a zatim je reakcija prekinuta dodatkom 0.5 ml 20%-tne TCA (osim u one smjese u koje je TCA već dodana ranije). Potom su centrifugirane 30 min na 3000 g i izdvojeni su supernatanti, iz kojih su uzeti alikvoti od 160 µl za spektrofotometrijsku analizu. Alikvoti su naneseni u triplikatima na mikrotitracijsku pločicu te je u svaku jažicu dodano 40 µl boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, SAD), a zatim je na čitaču mikrotitracijskih pločica (Thermo Labsystems iEMS MF Type 1401) spektrofotometrijski pri 595 nm određeno koji soj ima najvišu apsorbanciju te je isti označen za sljedeću fazu eksperimenta.

Tablica 4. Plan za pripremu reakcijskih smjesa za selekciju najproduktivnijeg soja za proizvodnju proteaza. Legenda: *trikloroctena kiselina (Sigma-Aldrich, SAD)

	Uzorci (6)	**TCA kontrola (7)**	**Negativna kontrola (1)**
1,5 ml HCl/natrij-citrat pufera (0,2M, pH 4.5) sa 1% BSA	DA	DA	DA
0,5 ml supernatanta suspenzije *C. albicans*	DA	DA	NE
0,5 ml 20% TCA*	NE	DA	NE

Testiranje proteazne inhibicije izvedeno je na gotovo jednak način, uz ponešto drugačije pripremljene reakcijske smjese (Tablica 5.). Eksperimentalno određene minimalne inhibitorne koncentracije za *C. albicans* za hidroksitirozol i oleuropein iznose 6,25 mg/ml i 12,5 mg/ml, pa prema tome ½ MIK za iste tvari iznosi 3,125 mg/ml i 6,25 mg/ml a ¼ MIK 1,5625 mg/ml i 3,125 mg/ml. Za hidroksitirozol dodani su volumeni bili 125 µl (za MIK), 62.5 µl (za ½ MIK) i 31.25 µl (za ¼ MIK) a za oleuropein 250 µl (za MIK), 125 µl (za ½ MIK) i 62.5 µl (za ¼ MIK).

Tablica 5. Plan za pripremu reakcijskih smjesa za test proteazne inhibicije. Legenda: *pepstatin A otopljen u 5% DMSO (Sigma-Aldrich, SAD)

	Uzorci (6)	**TCA kontrola (8)**	**Negativna kontrola (1)**	**Pozitivna kontrola (1)**
1,5 ml HCl/natrij-citrat pufera (0,2M, pH 4.5) sa 1% BSA	DA	DA	DA (0,5 ml pufera više)	DA
0,5 ml supernatanta suspenzije C. albicans	DA	DA	DA	DA
0,5 ml 20% TCA	NE	DA	NE	NE
MIK, 1/2 MIK ili 1/4 MIK hidroksitirozol	DA (u 3 uzorka, po jedan za svaki)	DA (u 3 uzorka, po jedan za svaki)	NE	NE
MIK, 1/2 MIK ili 1/4 MIK oleuropein	DA (u 3 uzorka, po jedan za svaki)	DA (u 3 uzorka, po jedan za svaki)	NE	NE
100 µg/ml pepstatin A*	NE	NE	NE	DA

3.4. Lipaze – selekcija najproduktivnijeg soja i inhibicijski test

Za selekciju sojeva sa najvećom produkcijom lipaza postupak je pripremljen po uzoru na Choi et al. (2003). U prvom pokušaju selekcije, na mikrotitracijsku pločicu je u jažice u triplikatima stavljeno po 20 µl odleđenog supernatanta suspenzije pojedinog soja te 180 µl reakcijske smjese (Tablica 6.). Pripremljene su i kontrole bez supernatanta. Mikrotitracijska pločica je ostavljena u inkubatoru 3 sata na 37 °C a nakon toga je spektrofotometrijski očitana na čitaču mikrotitracijskih pločica pri 405 nm kako bi mogli biti određeni sojevi koji imaju najvišu apsorbanciju te i biti označeni za sljedeću fazu eksperimenta. Zbog neuspjeha ove metode, pokušana je i primjena druge, modificirane metode, a razlika u odnosu na prvu je bila povećanje volumena odleđenog supernatanta suspenzije pojedinih sojeva stavljenog u jažice mikrotitracijske pločice sa 20 na 100 µl. Zbog neuspjeha druge metode, postupak je ponovljen i treći put sa dodatno modificiranom metodom selekcije, a razlika u odnosu na drugu metodu bila je povećanje volumena i odleđenog supernatanta suspenzije pojedinih sojeva i reakcijske smjese na 500 µl, zbog čega su nastale smjese stavljene u Eppendorf mikroepruvete prilikom inkubacije (s obzirom na manji volumen jažica mikrotitracijske pločice), pa nakon inkubacije nanesene u triplikatima od po 200 µl u jažice mikrotitracijske pločice, nakon čega je opet provedeno spektrofotometrijsko očitanje.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za selekciju najproduktivnijeg soja za proizvodnju lipaza. Legenda: *2,3-dimerkapto-1-propanol tributirat (Sigma-Aldrich, SAD); **5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma-Aldrich, SAD); ***etilendiamintetraoctena kiselina (Sigma-Aldrich, SAD); ****deterdžent Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD)

Tvar	Koncentracija
DMPTB*	0,2 mM
DTNB**	0,8 mM
EDTA***	1 mM
Triton X-100****	0,05% (w/v)
Tris-Cl pufer (pH 7.5)	50 mM

Testiranje lipazne inhibicije nije bilo moguće provesti u zamišljenom obliku budući da se nije moglo selektirati najproduktivniji soj u prethodnom koraku (pa čak ni detektirati je li kod ijednog soja uopće inducirana proizvodnja lipaza), pa je pokušana provedba tog testiranja uz korištenje komercijalno nabavljene lipaze vrste *Candida rugosa* (Sigma). Testiranje lipazne inhibicije bilo je provedeno na gotovo jednak način kao i selekcija sojeva, uz razlike da je korištena samo komercijalno nabavljena lipaza vrste *Candida rugosa* pri enzimskoj aktivnosti u finalnoj otopini od 2U, te da su reakcijske smjese sastavljene tako da je u njih osim svega ranije navedenog dodan, baš kao i u testiranju proteazne inhibicije, i određeni volumen jedne od dvije testne tvari – hidroksitirozola ili oleuropeina – kako bi bila dobivena jedna od tri koncentracije – MIK, ½ MIK i ¼ MIK – a kontrolama je pridodana i negativna u koju nisu dodane testne tvari a razliku se dopunilo destiliranom vodom. Zbog neuspjeha ove metode, pokušana je i provedba druge, modificirane metode, a razlika u odnosu na prvu je bila povećanje enzimske aktivnosti lipaze vrste *Candida rugosa* u finalnoj otopini sa 2U na 4U.

4. REZULTATI

Budući da su Sap proteaze i Lip lipaze jedni od, kako je ranije navedeno, značajnijih virulentnih čimbenika *C. albicans* te bi se moduliranjem njihove aktivnosti značajno otežala adherencija kandide na sluznicu a time i nastanak kandidijaze odnosno olakšalo liječenje bolesti ako se već razvila, odlučili smo istražiti djelovanje dviju tvari s poznatim antimikrobnim i antifungalnim učinkom, hidroksitirozola i oleuropeina, na inhibiciju tih enzima.

Kako bismo dobili neke referentne vrijednosti na temelju kojih bi odredili koncentracije hidroksitirozola i oleuropeina koje ćemo upotrebljavati u inhibiciji Sap proteaza i Lip lipaza, prvo smo eksperimentalno odredili minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za hidroksitirozol i oleuropein za *C. albicans* postupkom opisanim u poglavlju Materijali i metode. Te smo vrijednosti sa još po dva razrjeđenja uzeli kao subletalne koncentracije dotičnih tvari za testiranje inhibicije hidrolitičkih enzima *C. albicans*.

Za selekciju enzimatski najproduktivnijih sojeva proveli smo postupke opisane u poglavlju Materijali i metode. Rezultati odabira enzimatski najproduktivnijih sojeva za proteaze i lipaze nisu prikazani budući da se radilo samo o selekcijskim testovima. Za proteaze se kao najproduktivniji soj pokazao klinički izolat sa oznakom 781, dok se za lipaze nije moglo utvrditi koji je soj najproduktivniji niti je li ikoji od sojeva uopće proizveo lipaze, s obzirom na rezultate selekcijskog eksperimenta u kojem se apsorbancija uzoraka nije mijenjala ni kroz dulji period inkubacije.

I za inhibiciju Sap proteaza i za inhibiciju Lip lipaza proveli smo slične postupke kao i za selekciju enzimatski najproduktivnijih sojeva, također opisane u poglavlju Materijali i metode. Dok su rezultati za proteaznu inhibiciju prikazani u nastavku, rezultate za lipaznu inhibiciju nije bilo moguće dobiti a pokušaj provedbe eksperimenta sa komercijalno nabavljenom lipazom vrste *Candida rugosa* nije dao zadovoljavajući ishod, s obzirom na vrlo nejasne i dvosmislene rezultate iz kojih se nije moglo praktički ništa iščitati.

Rezultate spektrofotometrijskih mjerenja proteazne inhibicije statistički smo obradili primjenom Student *t* testa, a izračunate su i standardne devijacije za sve uzorke.

4.1. MIK za hidroksitirozol i oleuropein za *C. albicans*

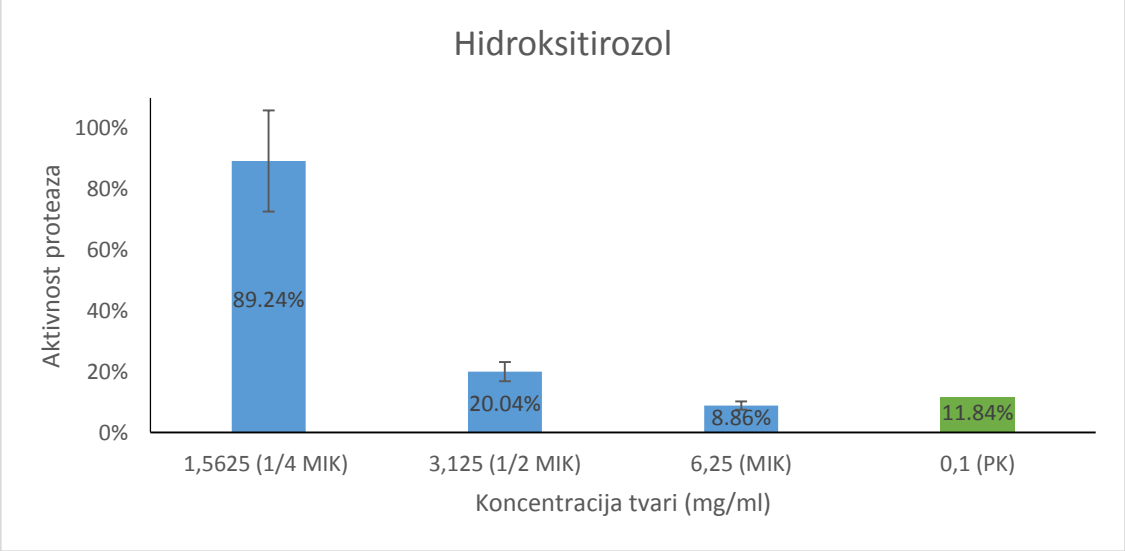
Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za hidroksitirozol i oleuropein određena je tako da se alikvote svakog razrjeđenja nasađenog na Sabouraudov 2%-tni glukozni agar i ostavljenog u inkubatoru rasti dva dana na 35 °C usporedilo sa negativnom kontrolom bez tvari (koja je uzeta kao 0% inhibicije rasta odnosno 100% rasta) te odabralo najniže koncentracije za svaku tvar pri kojima je inhibicija rasta bila 90% ili više, odnosno uz koje rast nije prelazio 10%. MIK svake tvari bila je jednaka za oba soja *C. albicans* na kojima se provodilo testiranje, i na ATCC 10231 i na MFBF 11103, a iznosila je 6,25 mg/ml za hidroksitirozol i 12,5 mg/ml za oleuropein (Tablica 7.).

Tablica 7. Minimalna inhibitorna koncentracija za hidroksitirozol i oleuropein za *C. albicans* (testirano na sojevima ATCC 10231 i MFBF 11103). Prikazana je i pozitivna kontrola, amfotericin B, za koji je MIC određen metodom dvostruke serijske mikrodilucije u µg/ml.

	Minimalna inhibitorna koncentracija		
Soj	**Hidroksitirozin**	**Oleuropein**	**Amfotericin B**
ATCC 10231	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	1 µg/ml
MFBF 11103	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	1 µg/ml

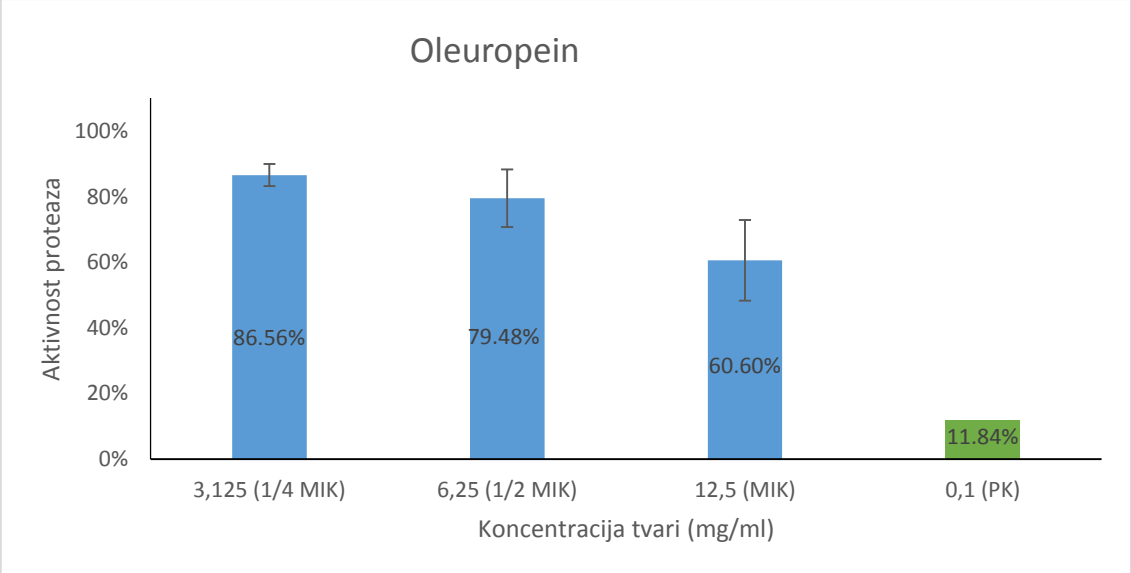
4.2. Proteazna inhibicija

Prilikom testiranja proteazne inhibicije hidroksitirozolom, pokazano je da sve tri korištene koncentracije hidroksitirozola smanjuju aktivnost Sap proteaza induciranih kod kliničkog izolata *C. albicans* označenog sa 781, te da sa porastom koncentracije hidroksitirozola aktivnost istih opada gotovo eksponencijalno (Slika 11.). Ovi rezultati pokazuju da hidroksitirozol doista inhibira Sap proteaze *C. albicans* u MIK i sub-MIK koncentracijama. Treba uočiti da su razine inhibicije znatno niže od one koju postiže pepstatin A, i to pri znatno višim koncentracijama – jedina usporediva s onom koju postiže pepstatin A ostvarena je tek pri 62.5 puta većoj koncentraciji. Ako se kao granica statističke značajnosti uzme p = 0,1 (10%), *t* test pokazuje da su dobiveni rezultati statistički značajni (p(MIK) = 0,088678, p(½ MIK) = 0,052783367, p(¼ MIK) = 0,053316179). Rezultati mjerenja bili su izraženi, s obzirom na to da se mjerenje obavilo spektrofotometrom, kao apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm, i u obliku triplikata, te su vrijednosti na prikazanom grafikonu dobivene dijeljenjem srednjih vrijednosti apsorbancija uzoraka sa srednjom vrijednosti apsorbancije negativne kontrole za koju se pretpostavilo da prikazuje 100%-tnu aktivnost enzima.



Slika 11. Pad aktivnosti Sap proteaza induciranih u kliničkog izolata označenog sa 781 uslijed povećanja koncentracije hidroksitirozola. Aktivnost enzima (%) dobivena je dijeljenjem srednje vrijednosti tri mjerenja svakog uzorka (MIK, ½ MIK i ¼ MIK) sa srednjom vrijednošću tri mjerenja negativne kontrole. Prikazane su i standardne devijacije uzoraka te pozitivna kontrola pepstatin A (PK).

Prilikom testiranja proteazne inhibicije oleuropeinom, pokazano je da sve tri korištene koncentracije oleuropeina smanjuju aktivnost Sap proteaza induciranih kod kliničkog izolata *C. albicans* označenog sa 781, te da sa porastom koncentracije oleuropeina aktivnost istih opada linearno (Slika 12.). Ovi rezultati pokazuju da oleuropein doista inhibira Sap proteaze *C. albicans* i u letalnim (MIK) i u subletalnim (½ MIK i ¼ MIK) koncentracijama, no treba uočiti da su razine inhibicije znatno niže od one koju postiže pepstatin A, i to pri znatno višim koncentracijama tvari. Ako se kao granica statističke značajnosti uzme p = 0,05 (5%), *t* test pokazuje da su dobiveni rezultati statistički značajni (p(MIK) = 0,049412883, p(½ MIK) = 0,001852916, p(¼ MIK) = 0,000188845). Rezultati mjerenja bili su izraženi, s obzirom na to da se mjerenje obavilo spektrofotometrom, kao apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm, i u obliku triplikata, te su vrijednosti na prikazanom grafikonu dobivene dijeljenjem srednjih vrijednosti apsorbancija uzoraka sa srednjom vrijednosti apsorbancije negativne kontrole za koju se pretpostavilo da prikazuje 100%-tnu aktivnost enzima.



Slika 12. Pad aktivnosti Sap proteaza induciranih u kliničkog izolata označenog sa 781 uslijed povećanja koncentracije oleuropeina. Aktivnost enzima (%) dobivena je dijeljenjem srednje vrijednosti tri mjerenja svakog uzorka (MIK, ½ MIK i ¼ MIK) sa srednjom vrijednošću tri mjerenja negativne kontrole. Prikazane su i standardne devijacije uzoraka te pozitivna kontrola pepstatin A (PK).

5. RASPRAVA

Ljekovite se biljke koriste u različitim ljudskim kulturama već stotinama pa i tisućama godina za tretiranje mnogih bolesti. Napredak znanosti u 20. stoljeću omogućio je identifikaciju spojeva koji su davali tim biljkama svojstva zbog kojih ih se koristilo u tradicionalnoj medicini. Ustanovljeno je da se većinom radi o sekundarnim metabolitima, tvarima koje biljkama – između ostalog – koriste za obranu od predatora, parazita, oksidativnog stresa, te bakterijskih, fungalnih i virusnih infekcija (Hashmi et al. 2015; Holm Freiesleben & Jäger 2014).

I maslina (*Olea europaea*), drevna europska biljna kultura, spada u ljekovite biljke, a tradicionalno se za medicinske svrhe koriste njeno lišće, kora, plodovi i ulje dobiveno od plodova. Oleuropein i njegov derivat hidroksitirozol fenolni su sekundarni metaboliti prvo pronađeni u lišću, plodovima i ulju masline – dok je hidroksitirozol bez okusa, oleuropein je jedan od glavnih izvora gorkosti plodova i ulja masline, te ga se često uklanja iz ulja (Hashmi et al. 2015). Za oba ova spoja u literaturi postoji značajna količina podataka o njihovom djelovanju, od antioksidativnog i antibakterijskog preko antiviralnog i antifungalnog pa čak i antitumorskog (Omar 2010). Za značaj ovog rada svakako je najvažnije dotaknuti se spoznaja vezanih za inhibitorno djelovanje oleuropeina i hidroksitirozola na mikroorganizme u *in vitro* uvjetima.

U istraživanjima antimikrobnog djelovanja, korišteni su i kompletni ekstrakti i pojedine izolirane tvari. Tako je pokazano da ekstrakt maslinovog lista djeluje inhibitorno na rast nekoliko patogenih mikroorganizama – IC_{25} vrijednosti bile su 0,63 mg/ml za bakteriju *Bacillus cereus*, 4,12 mg/ml za bakteriju *B. subtilis*, 2,68 mg/ml za bakteriju *Staphylococcus aureus*, 1,81 mg/ml za bakteriju *Escherichia coli*, 3,13 za bakteriju *Klebsiella pneumoniae*, 3,22 za bakteriju *Pseudomonas aeruginosa*, 0,85 mg/ml za kvasac *Candida albicans* i 3 mg/ml za kvasac *C. neoformans* – te se moglo primijetiti da je *C. albicans* od ispitanih mikroorganizama bila jedna od najosjetljivijih na testirani ekstrakt (Pereira et al. 2007). U drugom se istraživanju testiralo učinak ekstrakta maslinovog lista na rast tridesetak različitih vrsta gljiva (*Alternaria alternata*, više vrsta iz roda *Aspergillus*, *Fusarium oxysporum* i *F. semitectum*, *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*, više vrsta iz roda *Penicillium* i *Rhizopus oligosporus*) te se ustanovilo da – ovisno o otapalu korištenom za dobivanje ekstrakta i koncentraciji – ekstrakt maslinovog lista djeluje u bar nekoj mjeri inhibitorno ili čak i fungicidno na sve testirane vrste i sojeve (Korukluoglu et al. 2008).

Osim korištenja kompletnog ekstrakta, zanimljivo je vidjeti i podatke vezane za korištenje pojedinih tvari. Istraživanjem provedenim na pet uzročnika čestih bakterijskih bolesti (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*) ukazalo se na snažan inhibitorni učinak hidroksitirozola na njihov rast (MIK-ovi za ATCC sojeve 0,24-7,85 µg/ml te 0,97-31,25 µg/ml za kliničke izolate) te nešto slabiji oleuropeina (MIK-ovi za ATCC sojeve 62,5-500 µg/ml te 31,25-250 µg/ml za kliničke izolate, s tim da na *H. influenzae* i *M. catarrhalis* nema učinka) (Bisignano et al. 1999). U jednom je radu pokazano da hidroksitirozol ima izrazito jak inhibitorni učinak i na mikoplazme, pa je MIK za sojeve vrste *Mycoplasma hominis* bio 0,03-0,12 µg/ml, za sojeve vrste *M. fermentans* 0,25 µg/ml, a za sojeve vrste *M. pneumoniae* 0,5 µg/ml (Furneri et al. 2004). Osim učinka na patogene bakterije, o kojem je puno više pisano, utvrdilo se da hidroksitirozol ima i inhibitorni učinak na rast patogenih gljiva (MIK za *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* i *Saccharomyces cerevisiae* bio je 6,25 mg/ml, za *C. parapsylosis*, *C. kefyr* i *Trichophyton mentagrophytes var. mentagrophytes* 1,5625 mg/ml, za *C. curvata* 0,0976 mg/ml, za *Blastoschizomyces capitatum* 0,1953 mg/ml i za *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* 0,7812 mg/ml) (Zorić et al. 2013). U radu spomenutom u prošlom odlomku istražilo se i zasebni učinak sedam fenolnih komponenti ekstrakta maslinovog lista (vanilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina, oleuropein, siringična kiselina, kafeinska kiselina, tirozol i p-kumarinska kiselina) na spomenutih tridesetak vrsta gljiva, te je zapaženo da je među njima čak i pri najnižoj koncentraciji od 0,1% oleuropein imao najjači učinak, uz inhibitorno djelovanje na 18 od 30 sojeva u istraživanju, što se povećalo na 24 od 30 sojeva pri koncentraciji od 1% (Korukluoglu et al. 2008).

Prema svemu dosad navedenom može se uočiti da hidroksitirozol ima vrlo jak inhibitorni učinak na rast bakterija i nešto slabiji na rast gljiva, dok je utjecaj oleuropeina i na rast bakterija i na rast gljiva prisutan ali slabiji od utjecaja hidroksitirozola, što odgovara i eksperimentalno utvrđenim MIK za ove dvije tvari koje smo prikazali u prošlom poglavlju. Iz izloženog je razvidno zašto se fokus istraživanja usmjerio više na hidroksitirozol nego na oleuropein. Prilikom promatranja rezultata eksperimenata u kojima se koristilo ekstrakt maslinovog lista ne može se zanemariti vjerojatni sinergistički učinak pojedinih njegovih komponenti, kakav bi se i očekivalo u prirodi, a zbog kojega bi se moglo doći do pogrešnog zaključka da i svaka komponenta ekstrakta sama za sebe nužno ima izražena antimikrobna svojstva.

Što se tiče inhibicije pojedinih virulentnih faktora *C. albicans*, u literaturi je korištenje sekundarnih metabolita biljaka najprisutnije u smislu inhibicije izvanstaničnih hidrolitičkih enzima, prvenstveno Sap proteaza i Lip lipaza, kojima se u konačnici bavi i ovaj rad, no još nitko nije provjerio učinak hidroksitirozola i oleuropeina na njih. U jednom od provedenih istraživanja pripravilo se diklorometanske i metanolske ekstrakte više ljekovitih biljaka (listovi vrsta *Arctium lappa*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Arrabidaea chica* i *Caesaria sylvestris* te kora vrste *Tabebuia avellanedae*) u koncentraciji 2,5 mg/ml s namjerom testiranja inhibicije Sap proteaza na više kliničkih izolata *C. albicans*, a po dobivenim se rezultatima – pad aktivnosti uz ekstrakt *A. lappa* 7-8%, uz ekstrakt *M. piperita* 28-32%, uz ekstrakt *R. officinalis* 13-15%, uz ekstrakt *A. chica* 9-36%, uz ekstrakt *C. sylvestris* 19-21% i uz ekstrakt *T. avellanedae* 12-19% - može zaključiti da imaju inhibitornu aktivnost ali je ona značajno slabija od aktivnosti farmaceutika i proteaznih inhibitora kao što su pepstatin A i amprenavir (Höfling et al. 2011). Drugi rad donosi rezultate testiranja četiriju sekundarnih metabolita biljaka (apigenina, berberina, ibogaina i kaempferola) u raznim koncentracijama kao potencijalnih inhibitora Sap proteaza i Lip lipaza, a po kojima su se sve četiri tvari pokazale kao inhibitori i Sap proteaza (najviši pad aktivnosti Sap proteaza postignut je za različite tvari pri različitim koncentracijama – za apigenin je 80% pri koncentraciji 175 µg/ml, za berberin 70% pri koncentraciji 75 µg/ml, za ibogain 65% pri koncentraciji 175 µg/ml i za kaempferol 50% pri koncentraciji 75 µg/ml) i Lip lipaza (najviši pad aktivnosti Lip lipaza uz sve četiri tvari postignut je pri koncentraciji 250 µg/ml, i to 40% za apigenin, 60% za berberin, 75% za ibogain i 40% na kaempferol), uz kuriozitet da je inhibitorni efekt na Sap proteaze tvari pri višim koncentracijama počeo opadati (Yordanov et al. 2008).

Usporedbom rezultata iz prošlog poglavlja sa ovdje prikazanim rezultatima drugih istraživača koji su proučavali inhibiciju Sap proteaza *C. albicans* može se vidjeti da je inhibitorni učinak hidroksitirozola u bliskim koncentracijama sličan učinku ekstrakata ljekovitih biljaka, no slabiji od učinka ostalih testiranih sekundarnih metabolita i pepstatina A koji dostižu nešto niže vrijednosti maksimalne proteazne inhibicije no u višestruko manjim koncentracijama. Što se pak tiče oleuropeina, za njega u usporedbi s ekstraktima testiranih ljekovitih biljaka vrijedi isto kao i za hidroksitirozol, dok u usporedbi s četiri ostala ispitana sekundarna biljna metabolita i pepstatinom A čak ni njegova maksimalna vrijednost proteazne inhibicije ne dostiže one koje oni pokazuju i to pri višestruko nižim koncentracijama.

U provedbi eksperimenta sa lipaznom inhibicijom bilo je više poteškoća. Prva se javila kod selekcije najproduktivnijeg soja *C. albicans* za Lip lipaze, u kojoj ne samo da se nije moglo odrediti najproduktivniji soj ni nakon brojnih ponavljanja, nego se sudeći po očitanim mjerenjima uopće nije ni moglo detektirati lipaznu aktivnost u filtratima tekućih medija u kojima se induciralo kliničke izolate *C. albicans* iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Najizvjesnija mogućnost je ta da se radilo o sojevima sa jako smanjenom ekspresijom gena koji kodiraju za Lip lipaze kod kojih se jednostavno nije moglo inducirati lipaze ili uopće ili u dovoljnoj količini da bi se spektrofotometrijski moglo detektirati njihovu aktivnost. Uz nju dakako ostaje otvorena i opcija da je došlo do onečišćenja reakcijske smjese koje je interferiralo sa reakcijom i/ili mjerenjem, kao i opcija da se aktivnost proteaza izgubila uslijed ponovljenih odleđivanja i zaleđivanja (makar je malo vjerojatna, budući da se aktivnost nije moglo detektirati ni prilikom prvog mjerenja). Druga poteškoća nastupila je kad se krenulo u test lipazne inhibicije sa komercijalno nabavljenom lipazom vrste *C. rugosa*, a kojem se postupku pristupilo nakon neuspjeha sa filtratima induciranih sojeva *C. albicans*. U testu se nije moglo detektirati lipaznu aktivnost ili zbog premale koncentracije enzima (manje vjerojatno) ili zbog snažne interferencije testiranih tvari, hidroksitirozola i oleuropeina (vjerojatnije), s obzirom na to da su njihove otopine obojile reakcijske smjese u koje su dodane u žutozelenu boju, što je potencijalno moglo prouzrokovati značajnu smetnju očitavanju, budući da se uslijed hidrolitičke lipazne reakcije trebalo javljati žuto obojenje koje se očitava na 405 nm. Pogledom na učinak hidroksitirozola i oleuropeina te drugih sekundarnih metabolita na Sap proteaze i drugih sekundarnih metabolita na Lip lipaze, može se pretpostaviti da bi rezultati testa lipazne inhibicije bili komparativno gledano slični rezultatima testa proteazne inhibicije – i hidroksitirozol i oleuropein bi se pokazali kao slabiji inhibitori od drugih sekundarnih metabolita, a baš kao i oni bi slabije inhibirali Lip lipaze nego Sap proteaze.

Povezivanjem svih iznesenih podataka u ovom poglavlju može se zaključiti nekoliko stvari. Prvo, sekundarni metaboliti biljaka dokazano imaju širok spektar antimikrobnog djelovanja, i po broju mikroorganizama na koje djeluju i po raznolikosti virulentnih faktora tih mikroorganizama koje ometaju ili inhibiraju. Drugo, sekundarni metaboliti biljaka imaju slabiji učinak od komercijalnih lijekova i farmaceutskih pripravaka (potrebne su veće koncentracije tvari za isti ili čak slabiji učinak) te stoga uglavnom nisu prikladni za farmakološku primjenu odnosno liječenje ali jesu za prevenciju bolesti kao dio zdravog načina života. Treće, ekstrakti dijelova ljekovitih biljaka iz kojih se u pravilu izolira sekundarne metabolite često pokazuju bolji antimikrobni učinak od zasebnih komponenti koje ga čine, što ukazuje na sinergistički učinak više tvari, koji, zajedno sa širinom spektra djelovanja sekundarnih metabolita, predstavlja otežavajuću okolnost za razvoj rezistencije kod mikroorganizama. Četvrto, mnogo sekundarnih metabolita sa antimikrobnim djelovanjem potječe iz biljaka koje su u većoj ili manjoj mjeri dio ljudske prehrane, što bitno olakšava njihovu dostupnost na najjednostavniji način – hranjenjem.

Kako sve navedeno dakako vrijedi i za hidroksitirozol i oleuropein, očito je da je njihova uloga prvenstveno u sprečavanju a ne liječenju mikoza i ostalih bolesti uzrokovanih patogenim mikroorganizmima. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se moglo sastaviti potpuniju sliku i o mehanizmu njihovog djelovanja i o sinergističkom učinku sa drugim sekundarnim metabolitima maslina i ostalih ljekovitih biljaka, no već i na temelju ovih rezultata može se sa velikom sigurnošću reći da povećani unos ovih tvari, bilo kroz prehrambene proizvode koji ih sadrže (plodovi maslina, maslinovo ulje) bilo kroz dodatke prehrani (kapsule sa ekstraktom maslinovog lista), otežava infekciju i kolonizaciju mikroorganizmima te pojavu i razvoj bolesti koje oni uzrokuju.

6. ZAKLJUČAK

Nakon uzgoja svježih kultura 12 kliničkih izolata *Candide albicans* iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u njih je inducirana proizvodnja izvanstaničnih Sap proteaza i Lip lipaza. Spektrofotometrijskim se očitavanjem ustanovilo da soj označen brojem 781 proizvodi najveću količinu Sap proteaza, dok se nije uspjelo utvrditi koji je od sojeva najproduktivniji za Lip lipaze. Mogući razlozi za to su da proizvodnja lipaza uopće nije bila uspješno inducirana u kulturama, da jest inducirana ali je proizvedena količina lipaza bila premala za detekciju korištenom spektrofotometrijskom metodom, ili da iz nekog razloga nije moglo doći do reakcije DMPTB-a i produkta hidrolitičkog cijepanja DTNB-a koja daje žuto obojeni produkt na očitanju kojeg je metoda detekcije lipazne aktivnosti bila bazirana.

U testu proteazne inhibicije ustanovljeno je da obje testirane tvari, i hidroksitirozol i oleuropein, djeluju inhibitorno na Sap proteaze *C. albicans* u svim testiranim koncentracijama (MIK, ½ MIK i ¼ MIK), uz vidljiv porast inhibicije sa porastom koncentracije inhibitora, ali slabije od tvari testiranih u radovima drugih autora (apigenina, berberina, ibogaina i kaempferola). Ustanovljeno je da je hidroksitirozol snažniji inhibitor od oleuropeina, a da najveću inhibitornu aktivnost pokazuje pri najvišoj testiranoj koncentraciji (MIK, odnosno 6,25 mg/ml).

Budući da se test lipazne inhibicije nadovezivao na selekciju najproduktivnijeg soja za Lip lipaze koji nije dao nikakve konkretne rezultate, nije bilo moguće utvrditi djeluju li hidroksitirozol i oleuropein inhibitorno na njih i u kojim koncentracijama. Test je bilo pokušano provesti koristeći kao alternativu komercijalno nabavljenu lipazu srodne vrste, *C. rugosa*, no nisu dobiveni jasni rezultati, najvjerojatnije zbog interferencija između reakcijske smjese i testiranih tvari. Ako se povuče paralelu sa sekundarnim metabolitima biljaka iz radova drugih autora i to poveže sa dokazanim inhibitornim učinkom na Sap proteaze, može se pretpostaviti da bi i testirane tvari vjerojatno imale inhibitorni učinak na Lip lipaze.

S obzirom na to da su obje testirane tvari imale slabiji inhibitorni učinak od komercijalnih inhibitora korištenih u liječenju kandidijaza (npr. pepstatina) kao i to da su im djelatne koncentracije znatno više od istih, veće su šanse da bi ih se moglo koristiti – uz dodatna, detaljnija istraživanja – kao dodatke prehrani nego kao farmaceutske pripravke.

7. LITERATURA

Argüelles, J.C., 1997. Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of Candida albicans. *FEMS Microbiology Letters*, 146, pp.65–71.

Bennett, R.J. & Johnson, A.D., 2003. Completion of a parasexual cycle in Candida albicans by induced chromosome loss in tetraploid strains. *The EMBO Journal*, 22(10), pp.2505–2515.

Berman, J. & Hadany, L., 2012. Does stress induce (para)sex? Implications for Candida albicans evolution. *Trends in Genetics*, 28(5), pp.197–203.

Bisignano, G. et al., 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), pp.971–4.

Brand, A. et al., 2007. Hyphal orientation of Candida albicans is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Current Biology*, 17(4), pp.347–352.

Brock, M., 2009. Fungal metabolism in host niches. *Current Opinion in Microbiology*, 12, pp.371–376.

Brown Jr, D.H. et al., 1999. Filamentous growth of Candida albicans in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Molecular Microbiology*, 34(4), pp.651–662.

Butler, G. et al., 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. *Nature*, 459(7247), pp.657–662.

Calderone, R.A. & Fonzi, W.A., 2001. Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 9(7), pp.327–335.

Cassone, A., 2013. Development of vaccines for Candida albicans: fighting a skilled transformer. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(12), pp.884–891.

Choi, S.J., Hwang, J.M. & Kim, S. Il, 2003. A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), pp.417–420.

Dalle, F. et al., 2010. Cellular interactions of Candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, 12(2), pp.248–271.

Davis, D.A., 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), pp.365–370.

Diezmann, S. et al., 2004. Phylogeny and evolution of medical species of Candida and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp.5624–5635.

Dostál, J. et al., 2003. Simple method for screening Candida species isolates for the presence of secreted proteinases: A tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp.712–716.

Enjalbert, B., Nantel, A. & Whiteway, M., 2003. Stress-induced gene expression in Candida albicans: absence of a general stress response. *Molecular Biology of the Cell*, 14, pp.2559–2569.

Fonzi, W.A., 1999. PHR1 and PHR2 of Candida albicans encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *Journal of Bacteriology*, 181(22), pp.7070–7079.

Forche, A. et al., 2008. The parasexual cycle in Candida albicans provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biology*, 6(5), p.e110 (1084–1097).

Furneri, P.M. et al., 2004. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), pp.4892–4894.

Gácser, A. et al., 2007. Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans. *Infection and Immunity*, 75(10), pp.4710–4718.

Gauwerky, K., Borelli, C. & Korting, H.C., 2009. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today*, 14(3-4), pp.214–222.

Hashmi, M.A. et al., 2015. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of Olea europaea (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2015, p.Article ID 541591 (1–29).

Haslbeck, M. et al., 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO Journal*, 18(23), pp.6744–6751.

Höfling, J.F. et al., 2011. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral Candida albicans and proteinases. *Mycopathologia*, 172(2), pp.117–124.

Holm Freiesleben, S. & Jäger, A.K., 2014. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – a review. *Medicinal & Aromatic Plants*, 3(2), p.Article ID 1000154 (1–6).

Hromatka, B.S., Noble, S.M. & Johnson, A.D., 2005. Transcriptional response of Candida albicans to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), pp.4814–4826.

Hull, C.M., Raisner, R.M. & Johnson, A.D., 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast Candida albicans in a mammalian host. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5477), pp.307–310.

Korukluoglu, M., Sahan, Y. & Yigit, A., 2008. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of Food Safety*, 28(1), pp.76–87.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S. & Matica, B., 2005. Virulentni čimbenici gljivice vrste Candida albicans. *Farmaceutski glasnik*, 61, pp.381–396.

Kumamoto, C.A., 2002. Candida biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 5, pp.608–611.

Lo, H.-J. et al., 1997. Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), pp.939–949.

Mayer, F.L., Wilson, D. & Hube, B., 2013. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), pp.119–128.

McCullough, M.J., Ross, B.C. & Reade, P.C., 1996. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25(2), pp.136–144.

Miller, M.G. & Johnson, A.D., 2002. White-opaque switching in Candida albicans is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), pp.293–302.

Mitchell, A.P., 1998. Dimorphism and virulence in Candida albicans. *Current Opinion in Microbiology*, 1(6), pp.687–692.

Monge, R.A. et al., 2006. The MAP kinase signal transduction network in Candida albicans. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 4), pp.905–912.

Moran, G.P., Coleman, D.C. & Sullivan, D.J., 2012. Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans More Pathogenic? *International Journal of Microbiology*, 2012, p.Article ID 205921 (1–7).

Mühlschlegel, F.A. & Fonzi, W.A., 1997. PHR2 of Candida albicans encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), pp.5960–5967.

Mukherjee, P.K. & Chandra, J., 2004. Candida Biofilm Resistance. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 7(4-5), pp.301–309.

National Comitee on Clinical Laboratory Standards, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts ; approved standard — second edition. *NCCLS Document M27-A2*, 22(15), pp.1–30.

Negri, M. et al., 2014. Early state research on antifungal natural products. *Molecules*, 19(3), pp.2925–2956.

Nobile, C.J. et al., 2006. Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic Cell*, 5(10), pp.1604–1610.

Omar, S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), pp.133–154.

Pappas, P.G. et al., 2015. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, pp.1–50.

Pereira, A.P. et al., 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (Olea europaea L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), pp.1153–1162.

Phan, Q.T. et al., 2007. Als3 is a Candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biology*, 5(3), p.e64 (0543–0557).

Robbins, N. et al., 2011. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 7(9), p.e1002257 (1–18).

Sangeorzan, J.A. et al., 1994. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *American Journal of Medicine*, 97, pp.339–346.

Spampinato, C. & Leonardi, D., 2013. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, 2013, p.Article ID 204237 (1–13).

Stehr, F. et al., 2003. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), pp.347–355.

Taff, H.T. et al., 2012. A Candida biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathogens*, 8(8), p.e1002848 (1–13).

Theiss, S. et al., 2006. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type Candida albicans reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(6), pp.405–420.

Tóth, A. et al., 2014. Secreted Candida parapsilosis lipase modulates the immune response of primary human macrophages. *Virulence*, 5(4), pp.555–562.

Trösken, E.R. et al., 2006. Comparison of lanosterol-14α-demethylase (CYP51) of human and Candida albicans for inhibition by different antifungal azoles. *Toxicology*, 228(1), pp.24–32.

Wächtler, B. et al., 2011. From attachment to damage: Defined genes of Candida albicans mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS ONE*, 6(2), p.e17046 (1–14).

Xie, Z. et al., 2012. Candida albicans biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(12), pp.1936–1945.

Yordanov, M. et al., 2008. Inhibition of Candida albicans extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in Candida infection. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(6), pp.435–440.

Zorić, N. et al., 2013. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro. *Current Drug Targets*, 14(9), pp.992–998.

IZVORI SLIKA S INTERNETA

http://4.bp.blogspot.com/-oWIv2wBGEqU/UdtomrFu63I/AAAAAAAAAQg/uIITauAf1_w/s1600/candida_albicans-667.jpg (sa theamazingmedicine.blogspot.hr)

http://medications.li/static/d790ab2c69bda5d9c78c6a37d82e591f.gif

http://phil.cdc.gov/phil_images/20030115/25/PHIL_2925_lores.jpg

http://phil.cdc.gov/phil_images/20030219/4/PHIL_3192_lores.jpg

http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1397-89-3.gif

http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/54651-05-7.gif

http://www.ridacom.com/images/products/products_5016.jpg

https://2e9be637a5b4415c18c5-5ddb36df15af65ab8482e83373c53fe5.ssl.cf1.rackcdn.com/images/231.png (sa examine.com)

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 03.06.1991. godine u Zagrebu. Godine 1995. selim se na otok Rab i tamo pohađam Osnovnu školu Ivana Rabljanina koju završavam s odličnim uspjehom. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja trenirao sam karate u klubu „Enpi“ te sam nositelj plavog pojasa. Nastavio sam obrazovanje u Pazinskom kolegiju – klasičnoj gimnaziji u Pazinu, koju sam također završio sa odličnim uspjehom, te sam sve četiri godine bio primatelj srednjoškolske stipendije za darovite učenike Grada Raba. Godine 2010. upisao sam preddiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu te ga i dovršio 2013. godine sa vrlo dobrim uspjehom i stekao zvanje prvostupnika molekularne biologije uz obranu završnog rada na temu „Toksini glavonožaca“. Studiranje sam nastavio upisom diplomskog smjera molekularne biologije, a 2015. godine bio sam sudionik Noći biologije. Za vrijeme preddiplomskog kao i za vrijeme diplomskog studija bio sam primatelj stipendije za darovite studente Grada Raba.

Od djetinjstva sam bio radoznala osoba, kolekcionar informacija i činjenica koje bi uz dovoljno razumijevanja bilo moguće sastaviti u smislenu cjelinu. Relativno rano sam spoznao da je malo koja slagalica toliko kompleksna i lijepa kao mozaik života, koji me očarao povezanošću među svim razinama i unutar svih razina, te sam mu se odlučio posvetiti kroz znanost – biologiju. Tijekom akademskog obrazovanja sam i proširio i produbio svoje znanje, te su se neke biološke teme ipak počele kristalizirati u mojim mislima kao one na koje bih se želio fokusirati, dijelom iz čistog zanimanja, a dijelom iz praktičnog zaključka da se nitko ne može posvetiti apsolutno svemu. Neobična i egzotična polja, posebno ona koja su slabo istražena, privukla su istraživača u meni obećanjima o novom i nepoznatom koje se može pojaviti iza svakog ugla. U područje mog interesa tako spadaju: gljive, najbizarniji i najslabije istraženi organizmi na svijetu; glavonošci, jedini beskralješnjaci koji se po inteligenciji mogu mjeriti sa sisavcima; prirodni otrovi, zapanjujući u svojoj kompleksnosti i širini primjene; te generalno sve vezano uz mikrobiologiju što se može opisati kao egzotično ili nepoznato. Snažan sam pobornik primijenjene znanosti, te vjerujem da bi širenje fonda ljudskog znanja trebalo imati kao cilj i praktičnu primjenu istog, a ne samo enciklopedijsko gomilanje podataka.