Inhibicija virulencije vrste Candida albicans oleuropeinom i hidroksitirosolom

Bobnjarić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:531956

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ivan Bobnjarić

Inhibicija virulencije vrste *Candida albicans* oleuropeinom i hidroksitirosolom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Kosalca.

SADRŽAJ:

1 UVOD 1

1.1 OPORTUNISTIČKO PATOGENE VRSTE RODA CANDIDA 1

1.2 OLEUROPEIN I HIDROKSITIROSOL 9

2 OBRAZLOŽENJE TEME 13

3 MATERIJALI I METODE 14

3.1 ODABIR MIKROORGANIZAMA 14

3.2 PODLOGE 14

3.3 PRIPRAVA HIDROKSITIROSOLA I OLEUROPEINA 14

3.4 ODREĐIVANJE ERGOSTEROLA 14

3.4.1 UZGOJ VRSTE *C. ALBICANS* 14

3.4.2 MJERENJE ERGOSTEROLA 15

3.5 INHIBICIJA GERMINACIJE *CANDIDE ALBICANS* 18

3.5.1 PRIPRAVA MEDIJA ZA POKUS ISPITIVANJA INHIBICIJE GERMINACIJE *C. ALBICANS* 18

3.5.2 PRIPREMA INOKULUMA 18

3.5.3 INHIBICIJA GERMINACIJE *C.ALBICANS* 19

3.6 INHIBICIJA RASTA FILAMENATA *C.ALBICANS* 19

3.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 20

4 REZULTATI I RASPRAVA 21

4.1 UČINAK NA BIOSINTEZU ERGOSTEROLA 21

4.2 INHIBICIJA GERMINACIJE BLASTOSPORA VRSTE *C. ALBICANS* 24

4.3 INHIBICIJA RASTA FILAMENATA *C. ALBICANS* 27

5 ZAKLJUČCI 30

6 LITERATURA 31

7 SAŽETAK / SUMMARY 34

7.1 SAŽETAK 34

7.2 SUMMARY 35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

1 UVOD

1.1 OPORTUNISTIČKO PATOGENE VRSTE RODA CANDIDA

Vrste roda *Candida* uzrokuju mikoze koje se nazivaju kandidoze. Najčešći uzročnik kandidoza je vrsta *Candida albicans*. Vrsta *C. albicans* je član ljudskog mikrobioma unutar gastrointestinalnog i respiratornog sustava, te vagine. Relativno rijetko uzrokuje kliničke manifestacije, odnosno oboljenje – kandidozu. Njen rast i razmnožavanje suprimiraju drugi pripadnici ljudskog mikrobioma. Uslijed narušene homeostaze mikrobioma, vrste roda *Candida* mogu prijeći iz komenzalnog u patogeni oblik narušavajući integritet nositelja(Prescott i sur., 2007). Na nastanak bolesti utječu različita stanja (trudnoća, dijabetes), poremećaji zdravlja (endokrini poremećaji, maligne bolesti, infekcija HIV-om) te brojni ijatrogeni činitelji (antibiotici, citostatici i zračenje) (Kalenić i sur., 2005). Virulentni čimbenici *C. albicans* su polimorfizam (osim vrste *C. dublinensis*,jedino ona od svih vrsta roda *Candida* ima to svojstvo), sekrecija hidrolitičkih enzima (aspartil-proteinaza, fosfolipaza, hemolizina, lipaza), povećano lučenje tvari koje reagiraju s komplementima C3d i C3b nositelja od strane pseudohifa i drugih koje vežu fibrinogen, transferin, ekstracelularni matriks, fibrinonektin i kolagen, zatim eksprimiranje laktinu sličnih površinskih komponenata koje se vežu za ugljikohidrate nositelja, ekspresija hidrofobnih komponenti na površini(CSH) (Hentges, 1995) te tvorba biofilma (Wei i sur., 2011; Fujibayashi i sur., 2009). Navedeni činitelji virulencije vrste *C. albicans* zajednički sudjeluju u razvoju kandidoze. Kandidoze se dijele na sluzničke, kožne, sustavne i diseminirane (Kalenić i sur., 2005). Od sluzničkih česte su oralne kandidoze novorođenčadi (Hentges, 1995; Kalenić i sur., 2005; Prescott i sur., 2007) i osoba koje boluju od AIDS-a; te vaginitis koji je učestaliji kod trudnica i HIV-pozitivnih žena (Hentges, 1995). Kožne kandidoze se najčešće razviju na vlažnoj, oštećenoj koži i noktima. U novorođenčeta se zbog neredovitog mijenjanja pelena može javiti tzv. pelenski osip, a izvor infekcije je najčešće sluznica crijeva novorođenčeta ili je izvor mikoze eksterni.

Naziv sustavna kandidoza se koristi u slučaju kad je inficiran jedan unutarnji duboki organ, a diseminirana infekcija kad je riječ o najmanje dva duboka organa. U tim slučajevima dolazi do masovne invazije sluznice gastrointestinalnog sustava i prelaska *C. albicans* iz oblika jednostanične blastokonidije u pseudohife i hife koje lakše prodiru u dublja tkiva odnosno organe. Blastokonidije mogu ući u krvotok bolesnika (kandidemija) i izazvati infektivno žarište u bilo kojem organu i/ili tkivu. Najčešće su pogođeni bubrezi, srce, pluća, mozak i oči. Izvori infekcije su najčešće endogene vlastite kandide na sluznici probavnog

trakta, a rjeđe zaraženi intravenski ili urinarni kateteri ili zaražena osoba (Kalenić i sur., 2005).

Vrsta *C. albicans* je najčešći, ali ne i jedini uzročnik kandidoza čija klinička slika može varirati od blage površinske infekcije do životno ugrožavajuće sistemske bolesti (Kaleli i sur., 2007). Nakon nje u kliničkim uzorcima najučestalija je vrsta *C. glabrata*, a druge oportunističke vrste su vrste *C. tropicalis, C. krusei, C. dubliniensis* i *C. parapsilosis* (Horn i sur., 2012). Vrste *C. glabata, C. dubliniensis* i *C. krusei* su učestaliji kod HIV-pozitivnih, nego kod HIV-negativnih pacijenata (Wei i sur., 2011). Broj infekcija uzrokovanih drugim vrstama roda *Candida* je u porastu proteklih godina. Taj pomak ka ne-*Candida albicans* vrstama se pripisuje selekciji manje osjetljivih sojeva vrsta roda *Candida* širokom upotrebom flukonazola kao profilaktika i terapeutika (Kullberg i sur., 2011), ozbiljnom imunosupresijom ili bolešću, korištenjem antibiotika širokog spektra i starijih pacijenata (Horn i sur., 2009.). U Europskim zemljama analiza je pokazala da je više od pola slučajeva kandidoza uzrokovano *C. albicans* dok je postotak ostalih ne-*Candida albicans* infekcija 14% sa *C. glabrata*, 14% *C. parapsilosis*, 7% *C. tropicalis* i 2% sa *C. krusei* (Tortorano i sur., 2006.)

Vrste roda *Candida* postale su također važni bolnički patogeni. U nekim bolnicama predstavljaju 10 % svih bolničkih infekcija vaskularnog sustava (Prescott i sur., 2007). Nozokomijalne kandidoze povezane su s visokom stopom smrtnosti kod kritično bolesnih pacijenata. Porast incidencije kandidemije u razdoblju od 1999. do 2006. zabilježen je u brojnim državama a povezan je s porastom broja imunodeficijentnih osoba (Kullberg i sur., 2011) ali i osoba izloženih svakodnevnim brojnim stresorskim čimbenicima koji čine njihovu prirodnu otpornost slabijom. Pošto je jedan od načina širenja egzogeni, osim preko kontaminiranih ruku zdravstvenih djelatnika, primjećeno je povećanje infekcija materijalima korištenim u zdravstvu, ponajviše kontaminiranim kateterima i intravenoznim otopinama (Ingham i sur., 2012). Produljno zadržavanje pacijenta na intenzivnoj njezi ali i općenito hospitalizaciji također su važan faktor u nastanku infekcije kandidom. Kod pacijenata na kirurškom odjelu sa sepsom, 28,3% pacijenata imalo je invazivne gljivične infekcije; od toga *C. albicans* izolirana je u 58% slučajeva, *C. tropicalis* u 17% te *C. glabrata* u 15%. Organ najčešće zahvaćen bila su pluća (Xie i sur., 2008).

Patogeneza vrste *C. albicans* uključuje mnoge čimbenikevirulencije, od kojih su najbitniji oni koji su zaslužni za adherenciju na stanice/tkiva domaćina i medicinskih alata, stvaranje biofilma i sekrecija hidrolitičkih enzima (npr. proteinaze, fosfolipaze i hemolizini) (Silva i sur., 2011). Postupci transplantacije, imunosupresivne terapije, primjena implantata i

produljeno zadržavanje u jedinici intenzivnog liječenja predstavljaju ozbiljne prijetnje infekciji kandidom.

Inicijalno prianjanje kandida uvjetovano je nespecifičnim faktorima (hidrofobne i elektrostatske sile) i potpomognuto je specifičnim adhezinima na površini gljivičnih stanica koji prepoznaju ligande kao što su proteini, fibrinogen i fibronektin (Li i sur., 2003). Taj fenomen adhezije dokazan je specijaliziranim površinskim proteinima koje zovemo adhezini, koji se selektivno vežu za aminokiseline i šećere na površini drugih stanica ili potpomažu adherenciji na nežive podloge (Verstrepen i Klis, 2006). Pošto su vrste roda *Candida*dio ljudskog mikrobiota, često ih nalazimo na biomaterijalima, implantantima i različitim tipovima katetera (Kojic i Darouiche, 2004). Biofilmovi su specifične i organizirane zajednice stanica pod kontrolom signalnih molekula, obavijene su vanstaničnim matriksom koje same proizvode. Nakupljanje mikroorganizama u biofilm je oblik zaštite njihovog razvoju koji potiče život i simbiozi i omogućuje preživljavanje u neprijateljskom okruženju (Davey i O'toole, 2000). Biofilm se stvara na biološkim i nebiološkim podlogama, bitna im je prisutnost vlage. Općenito, matriks biofilma sastoji se od ugljikohidrata, proteina, fosfora i heksoamina, ovisno o vrsti gljivice, no faktori okoline kao što su sastav medija, pH i kisik utječu na stvaranje biofilma i kompoziciju matriksa. Biofilmovi predstavljaju ozbiljan klinički problem jer povećavaju rezistentnost prema antifungalnoj terapiji. Iako mehanizam rezistencije na antimikotike nije u potpunosti jasan jedna od hipoteza tvrdi kako prisutnost matriksa u biofilmu ograničava prodiranje lijekova formiranjem difuzijske zapreke (Kojic i Darouiche, 2004), zbog koje su samo površinski slojevi membrane u direktnom kontaktu s letalnim dozama antimikotika. Biofilmovi pomažu gljivicama zadržati patogenu ulogu izbjegavajući domaćinove imunosne odgovore, odolijevanju terapiji antimikoticima te opiranju kompetitivnom pritisku drugih organizama. Prema tome, infekcija povezana sa stavaranjem biofilma, iznimno je teška za liječenje. Kod liječenja kandidijaze povezane s upotrebom medicinskih instrumenata nužno je uklanjanje i zamjenu inficirane pomoćne sprave, primjerice katetera, sonde, umjetnog srčanog zaliska, endo- ili egzoproteze. Ukoliko se ne ukloni inficirani primjerice srčani zalistak ili proteza, kandide stvaraju biofilm čime se terapija znatno oteža (Chandra i sur., 2001; Nucci i sur., 1998). Vanstanični hidrolitički enzimi također igraju važnu ulogu kod adherencije, prodiranja u tkivo i razaranju tkiva domaćina tijekom nastanka infekcije kandidama (Silva i sur., 2011). Najznačajniji hidrolitički enzimi su proteinaze i fosfolipaze. Deset aspartinskih proteinaznih (SAP) izoenzima odgovorni su za proteinaznu aktivnost vrste *C. albicans*. To su proteini molekulske mase

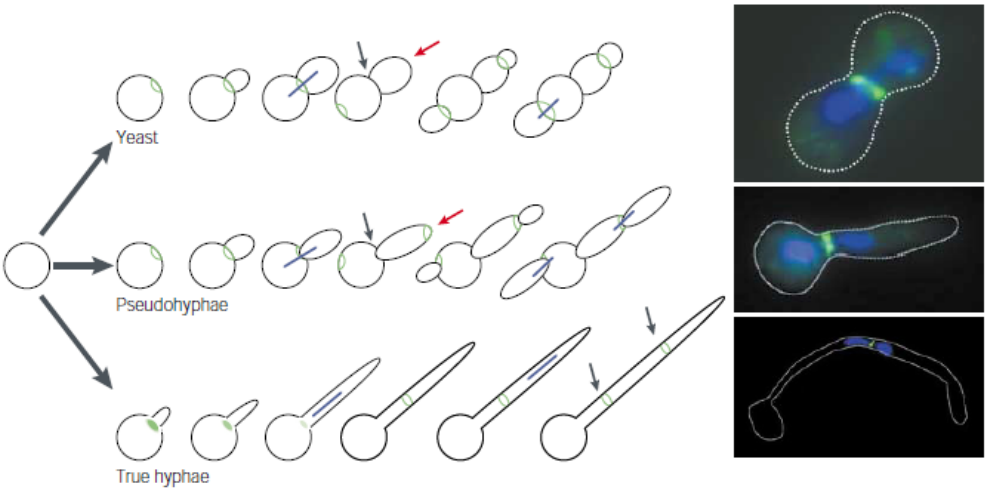
između 35 i 50 kDa i kodirane su SAP1-10 genima. Uloga SAP1-6 gena povezana je s adherencijom, oštećenjem tkiva i promjeni imunosnog odgovora. Funkcija SAP7 nije u potpunosti otkrivena, dok se za SAP9 i SAP10 smatra da nisu sekretirane proteinaze već se koriste u očuvanju ispravnosti površine gljivičnih stanica (Naglik i sur., 2003). Zanimljivo je da različiti sojevi iste vrste *C. albicans* mogu proizvoditi različite količine SAP2 i SAP3 pod istim uvjetima. Više studija prikazalo je povezanost povišene sinteze i aktivnosti ekracelularnih hidrolitičkih enzima sa povećanjem patogenog potencijala gljivica, koji dovode do kliničkih znakova kandidoze (Bramono i sur. 2006; Ingham i sur., 2012). Uloga ekstracelularnih fosfolipaza je razgradnja lipida za prehranu gljivice, adheziju na stanice i tkivo domaćina, nespecifično pokretanje upalnih procesa djelovanjem na imunosne stanice i obrana liziranjem kompetitivne mikroflore (Stehr i sur., 2004.; Gascer i sur., 2007). Gascer i sur. (2007) pokazali su da korištenjem inhibitora lipaza mogu značajno smanjiti oštećenje tijekom infekcije rekonstituiranih ljudskih tkiva. Nadalje, lipazama je inhibirano formiranje biofilma i rast gljivica u mediju bogatom lipidima. Hemolizini također imaju bitnu ulogu kod virulencije. Takvi proteini kandidama su neophodni za preživljavanje jer pomoću njih primaju željezo (Vaughn i Weinberg, 1978).

Liječenje kandidoze uključuje i antimikotike. Razlikujemo ih po mehanizmu na koji ubijaju ili inhibiraju rast gljivica. Većina lijekova koji su danas u upotrebi za liječenje kandidoza ciljno mjesto imaju prekidanje puta sinteze ergosterola (azoli, alilamini, tiokarbamati, polieni, morfolini). Istovremeno, njihova terapijska primjena je ograničena kod nekih skupina pacijenata zbog hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti (Wei i sur., 2011.; Katzung i sur., 2011), ali i porasta broja rezistentnih sojeva vrsta roda *Candida* (Wei i sur., 2011.; Kullberg i sur., 2011). Mehanizmi rezistencije klasificiraju se kao primarni ili sekundarni i povezani su sa prirođenim ili stečenim karakteristikama gljivičnog patogena, a uključuje ili ometanje samog mehanizma djelovanja antimikotika ili smanjenje razine antimikotika. Do rezistencije također može doći ako okolinski faktori dovedu do kolonizacije ili zamjene osjetljive vrste s rezistentnom.

Zbog izrazite toksičnosti postojećih lijekova, povećanja broja osoba koje obolijevaju od kandidoze, te porasta broja mikroorganizama koji su razvili multirezistenciju na klasične antimikotike, ukazala se potreba za pronalaskom jednako učinkovite no sigurne alternative njihovoj primjeni. Kroz povijest je vidljivo kako su se tradicionalno neki biljni produkti koristili u etnomedicini kao učinkovito protugljivično sredstvo, te se smatra kako su oni dio obrane same biljke na određene štetne nokse (Bakkali i sur., 2008). Od ranije je također

poznato da različiti spojevi prirodnog, posebice biljnog podrijetla imaju dobra antimikrobna svojstva, te da brojni od njih za ciljno mjesto imaju upravo biosintetske putove, prvenstveno sintezu ergosterola (Cowan, 1999). Biljke su prema tome odlična opcija za dobivanje mnoštva droga koje bi predstavljale ekonomičniju alternativu sintetskim, bile bi lako dostupne i mogle bi se primijeniti na različitim patogenima (Sardi i sur., 2011; Cruz i sur., 2007) te predstavljale izvor novim antifungalnim tvarima (Holetz i sur., 2002).

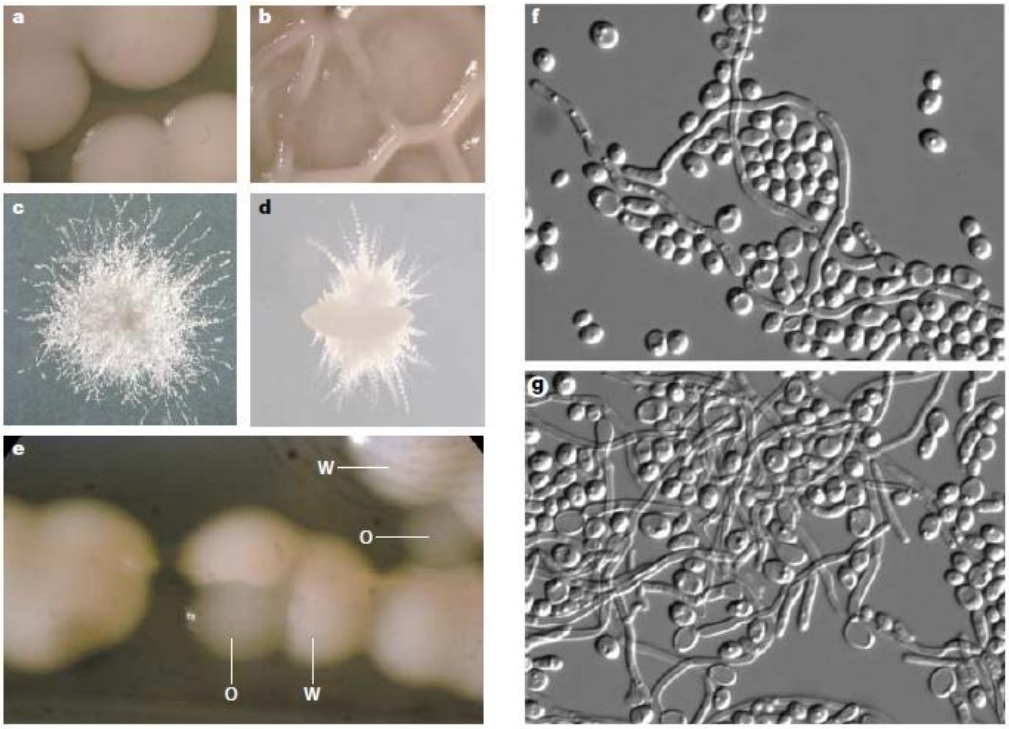
Istraživanje morfologije vrste *C. albicans* je vrlo bitno jer je utvrđeno da je njezina virulencija usko povezana sa njezinom sposobnošću (tzv. polimorfizmom) da prelazi iz oblika kvasca u oblik hife. Vrsta*C. albicans* egzistira u najmanje tri morfološke forme: kvasac (blastospora), pseudohifa i hifa. To je jednostanična gljiva koja se dijeli aseksualnim pupanjem. Ovaj proces uključuje stvaranje novog staničnog materijala od male izabrane jedinice na površini blastospore. Novonastali pup najčešće zauzima mjesto koje je distalno od ožiljka stečenih «rođenjem» i započinje fazu rasta. Nakon toga započinjedioba stanica, pregradom se odvoje «roditeljska stanica» od stanice «kćeri» (Molero i sur., 1998.). Pseudohife nalikuju produženim, eliptičnim stanicama kvasca koje ostaju priljuljene jedna uz drugu na mjestima gdje se formira pregrada. Kao rezultat toga, nastaju strukture koje se granaju, a vjerojatno je na ovaj način olakšana potraga za nutrijentima. (Berman i Sudbery, 2002.). Prave hife su dugačke i visoko polarizirane te imaju paralelne strane. Ne postoje vidljiva suženja između stanice kvasca i hife. Aktin je uvijek smješten na vrhu rastuće hife. Bazalni septin formira privremeni čvor na roditeljskoj stanici i započinje stvaranje klice. (Berman i Sudbery, 2002.). Produženje pupoljaka kod pseudohifa može biti toliko izražena da one jako podsjećaju na hife pa se zato često pseudohife i hife ubrajaju pod jedno i zajednički ih nazivamo filamenti.



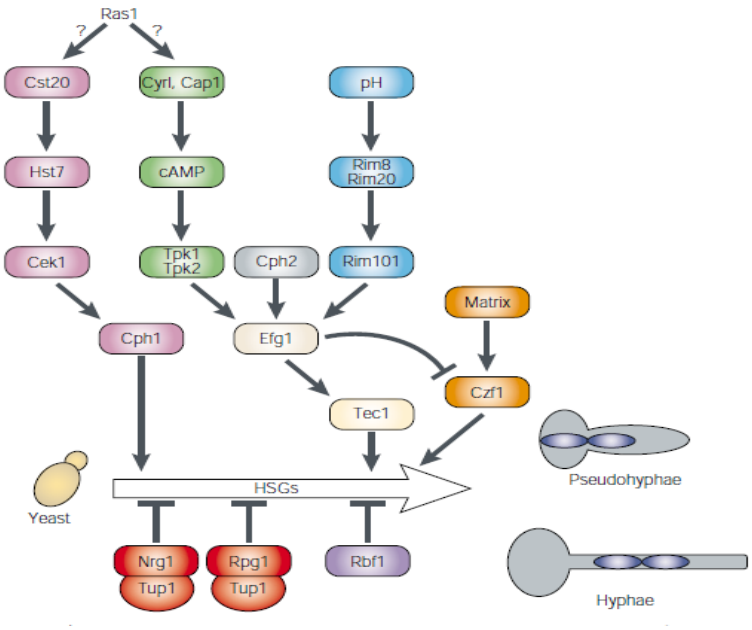
Slika 1. Razlike između blastospora, pseudohifa i pravih hifa (Berman i Sudbery, 2002)

Najčešći kriterij po kojemu razlikujemo različite forme je oblik stanice. Hife koje se razvijaju iz nepupajućeg kvasca nemaju suženja na vratu roditeljske stanice i imaju paralelne strane cijelom svojom duljinom. Formiranje filamenata kao odgovor na dodatak seruma u medij je osnova testa kojim se *Candida albicans* razlikuje od ostalih *Candida* vrsta. Pseudohife imaju suženja na vratu roditeljske stanice kao i pupoljak na svakom sljedećem čvorištu. Širina i duljina pseudohifa jako variraju pa tako u jednoj krajnosti one podsjećaju na hife, dok u drugoj krajnosti one više nalikuju na stanice kvasca sa produljenim pupovima. U svakom slučaju, karakteristično za pseudohifu je to da širina odjeljaka koji izgrađuju filamente nije konstantna. Odjeljci su širi u centru i suženi prema krajevima. Morfološki indeks (MI) je jedinica po kojoj se ocjenjuje je li filament hifa ili pseudohifa, a on uzima u obzir duljinu odjeljka te omjer njegove maksimalne i minimalne širine. Ipak, jednostavniji način razlikovanja je samo mjerenje širine odjeljka zato što čak i kada pseudohifa najviše nalikuje hifi, njezina širina je uvijek veća. Hife imaju širinu ~2.0 µm u većini medija, dok je minimalna širina pseudohifa ~2,8 µm. Bitno je naglasiti da mjerenje širine jako ovisi o kalibraciji mikroskopa, korištenoj optici te slobodnoj procjeni ruba stanice. Također, mjerenja se moraju provoditi na stanicama koje su inducirane u uvjetima sa 20% seruma te pri 37ºC. (Sudbery i sur., 2004.)

Promjena mikromorfoloških formi može biti uzrokovana različitim uvjetima okoliša. Pouzdano, stvaranje filamenata od nepupajućih blastospora može se inducirati dodatkom seruma i inkubacijom na temperaturi od 37 ºC. Ipak, do sada nije pronađen ni jedan zasebni čimbenik koji će u svim uvjetima uzrokovati stvaranje filamenata. Neki od okolišnih čimbenika koji će djelovati povoljno na stvaranje filamenata su: temperatura 37-40 ºC, pH oko 7.0 te početna koncentracija blastospora manja od 10^6/mL. Također, potrebne su pojedine tvari, kao na primjer N-acetil-D-glukozamin, aminokiseline, biotin, sulfhidrilni spojevi, hem grupa, cink serum itd. Općento, stanice će rasti u formi blastospora pri nižim temperaturama i nižem pH, dok će se filamenti stvarati pri višim temperaturama i višem pH. Točno definirani medij, kao što je sintetski Leejev medij bit će pogodan za uzgoj oba morfološka oblika pri temperaturi od 37 ºC. Blastospore će rasti pri pH 4.5, a hife će se razvijati pri pH 6.5. (Molero i sur., 1998.)



Slika 2. Različiti oblici kolonija vrste *C. albicans*: Glatke kolonije na SDC (salt-dextrose complete) mediju (a); Naborane kolonije na spider mediju (b); Kolonije nepravilnog ruba na milk-Tween agaru (c); Ispupčenekolonije suspendirane u podlozi od bogatog medija koji sadrži sukrozu (d); Bijelo-tamne (eng. white-opaque) kolonije-Morfološka promjena kolonija (e); Stanice u naboranim kolonijama, kolonijama nepravilnog ruba i ispupčenimkolonijama (f i g) (Berman i Sudbery, 2002)



Slika 3. Putevi prijenosa signala preko kojih se regulira morfogeneza (Berman i Sudbery, 2002)

Pojedini čimbenici iz okoliša induciraju stanice gljivica na formiranje hifa i pseudohifa preko nekoliko signalnih puteva (Slika 3.). Ovo odražava raznovrsnot mikrookoliša u kojem ovaj oportunist može preživjeti *in vivo.*

Najmanje dva negativna i četiri pozitivna signalna puta kontroliraju morfološke prijelaze kod *Candide albicans*. Signalni putevi koji inhibiraju ovaj proces su Tup1-Nrg1-Rpg1 signalni put (crveno) i Rbf1 signalni put (ljubičasto). HSGs označava kraticu za hifa-specifične gene (Slika 3.). Inaktivacija cAmp signalnog puta (delecijom CPH1) inhibira nastanak filamenata samo u ograničenom broju uvjeta. Mutant cph1 efg1, kojem su oba ova signalna puta inaktivirana u nemogućnosti je stvarati filamente u većini *in vitro* okolišnih uvjeta i potpunosti je avirulentan na mišjem modelu za sistemsku kandidijazu. Ovaj podatak je često citiran kao daokaz da je tvorba hifa i pseudohifa osnovni čimbenik virulencije. Međutim, ipak treba napomenuti da prethodno spomenute mutacije blokiraju ekspresiju hifa-specifičnih gena od kojih su mnogi odgovorni za virulenciju kao i to da cph1 efg1 mutanti su ipak u mogućnosti stvarati filamente pod određenim *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Putevi koji promoviraju prijelaz iz oblika kvasca u oblik pseudohife i hife su: MAP-kinaza signalni put

(ružičasto), cAMP signalni put (zeleno), Sph2 signalni put (sivo), Rim101 pH-ovisni signalni put (plavo) te Czf1 matriks signalni put (narančasto).

1.2 OLEUROPEIN I HIDROKSITIROSOL

Maslinovo ulje i i ekstrakt lista masline korišteni su u narodnoj medicini Mediteranskih otoka i država još iz davnih vremena (Medina i sur., 2007.) Maslina je jedno od najvažnijih drveta Mediterane gdje prekrivaju preko 8 milijuna hektara te su zaslužni za 98% posto svjetske proizvodnje maslinovog ulja. To predstavlja veliki ekonomski i društveni značaj biljke i mogućnost iskorištavanja njenih bioprodukata. *Olea europea L.* je široko istraživana i zbog svojih sekundarnih metabolita poput hidroksitirosola i oleouropeina. Oleuropein zbog svoje hipoglikemijske aktivnosti (Gonzales i sur. 1992). Mnogobrojni izvještaji pokazali su da ekstrakt listova masline smanjuje krvni tlak u životinja, povećavaju cirkulaciju u koronarnim arterijama i sprečavaju spazam intestinalnih mišića. Također ekstrakti mogu biti korišteni u infuzijama što omogućava značajan unos bioaktivnih produkata (Zarzuelo i sur., 1991.).

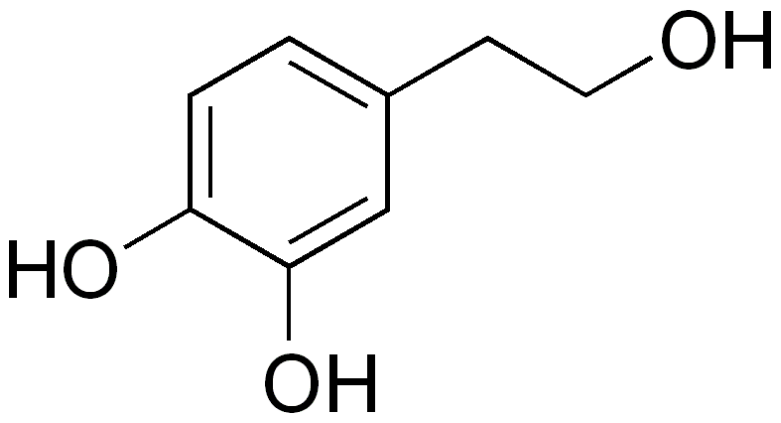
Radovi koji se bave analizom fenolnih komponenti masline se mogu naći u literaturi, no ta istraživanja su prvenstveno fokusirana na njihova antioksidativna svojstva. Istraživanja koja se bave antimkrobnim svojstvima fenolnih komponenti masline, prvenstveno hidroksitirosola i oleouropeina su puno manja.

Novija istraživanja pokazala su široku antimikrobnu aktivnost ekstrakta masline protivbakterijskih vrsta*B. cereus, B. subtilis, S. aureus,E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae,* te *C. albicans* i *C. neoformas* (gljivice). Osim kvarenja hrane, ovi mikroorganizmi mogu biti uzročnici intestinalnih infekcija u ljudi. Ekstrakt je inhibirao sve ispitivane bakterije i gljivice od čega najviše *B. cereus* (Gram pozitivna) i *C. albicans* koje su bile najosjetljivije (Pereira i sur. 2007.).

Studija (Procopio i sur., 2011.) opisala je metodu sinteze konjugata hidroksitirosola s masnim kiselinama povečavajući lipofilnost molekule bez da mjenjaju antioksidativna svojstva. *In vitro* model demonstrirao je povećanje u permeaciji masnih estera prema slobodnom hidroksitirosolu sugerirajući potencijal i za topikalnu administraciju.

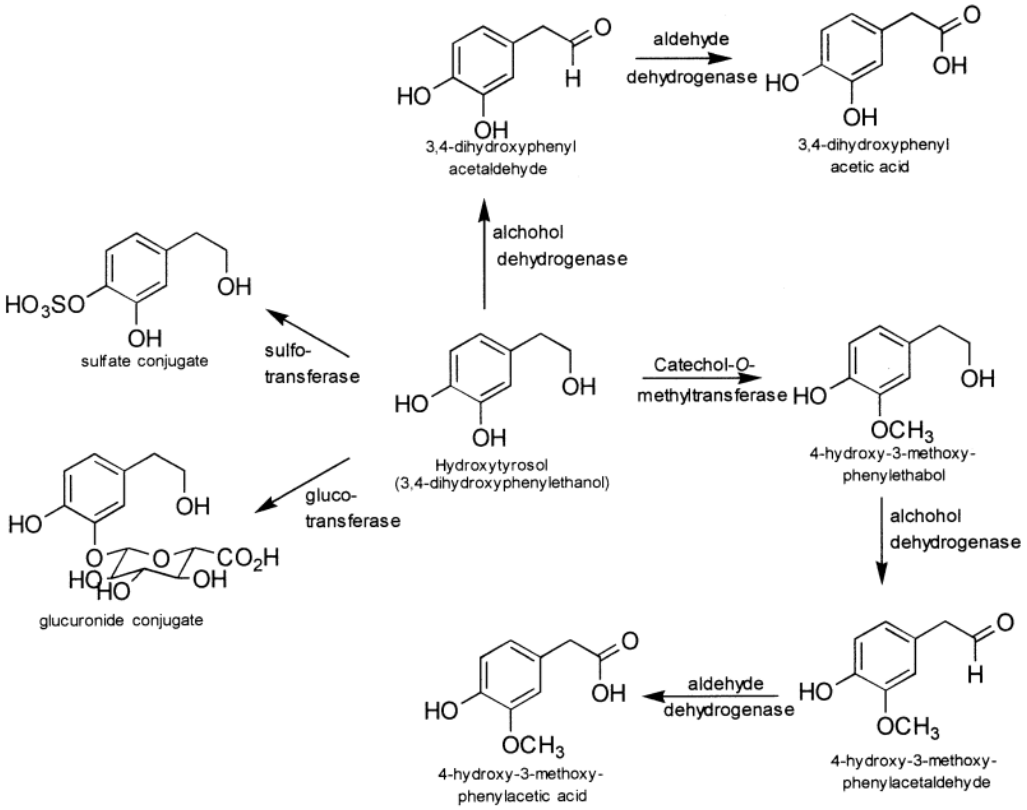
Hidroksitirosol (HT) pokazuje široku antimikrobnu aktivnost prema ATCC i klinički izoliranim patogenim sojevima bakterija s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) u intervalu 0.24 – 190 μg/ml. Hidroksitirosol inhibira rast vrsta*Leuconostoc mesenteroides,*

Enterococcis faecium i značajno smanjuje broj viabilnih stanica vrsta*Enterococcus faecalis, Enterobacter aerogenes* i *Escherichia coli.* Furnerii suradnici 2004. istraživali su *in vitro* antimikoplazmatsku aktivnost kod *M. hominis, M. fermentas* i *M. pneumoniae.* Svi sojevi pokazali su MIK raspon od 0.03 – 0.5 μg/ml. Lea-Huang i suradnici demonstrirali su anti-HIV-1 efekt hidroksitirosola pri čemu je prikazao aktivnost kod mnogobrojnih stadija ciklusa HIV-1.



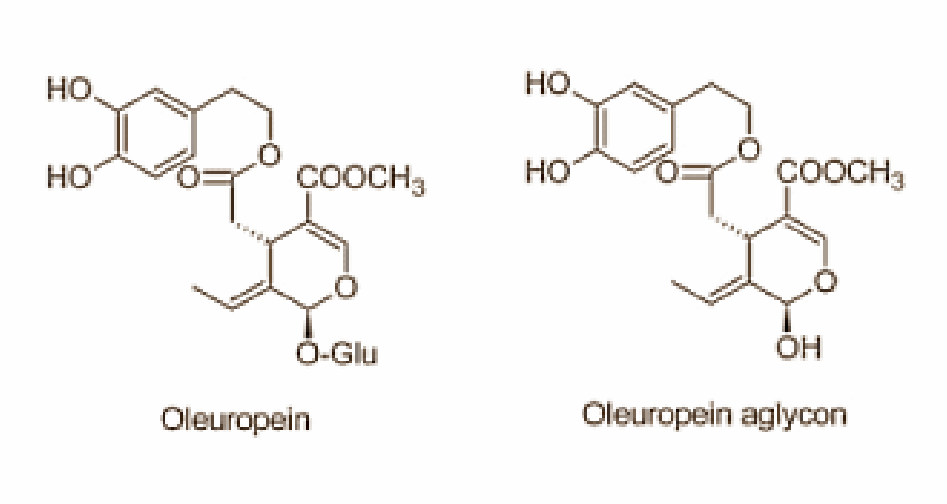
Slika 4. Struktura hidroksitirosola (HT)

Do nedavno bio je jako ograničeni broj istraživanja na apsopciju i metabolizam hidroksitirosola. Manjku podataka je vjerojatno pridonjela i činjenica da se hidroksitirosol lako oksidira i da se tek sada može komercijalno nabavljati. Bitno je da se može lako sintetizirati što značajno olakšava ispitivanje njegovih bioloških svojstava, te su time otkriveni putevi metabolizma hidroksitirosola (Slika 5.).



Slika 5. Metabolizam hidroksitirosola in vivo (D'Angelo i sur., 2001)

U 2009. Godini Procopio i suradnici razvili su novo poboljšanu metodu dobivanja oleuropeina iz listova masline s kratkim vremenom ekstrakcije izlagajući mikrovalnim zrakama i otapanjem vodom. Također su uvedeni polusintetski protokoliza dobivanjem aglikona oleuropeina, hidroksitirosola i njihovih acetiliranih lipofilnih forma te su te sastavnice ispitane zbog svojih antiinflamatornih aktivnosti te je utvrđeno da posjeduju značajnu anticiklooksigenaznu aktivnost.



Slika 6. Strukture oleuropeina i njegovog aglikona

Oleuropein inhibira rast vrsta *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* i *Pseudomonas solanecearum* te također pokazuje inhibiciju germinacije i sporulacije *Bacillus megaterium* te izdanke germinirajućih spora *Bacillus cereus* (Tassou i sur., 1991). Aktivnost oleuropeina ispitivana je u *in vitro* uvjetima kod *Mycoplasma hominis, M. fermentas, M. pneumoniae* i *M. pirum.* Oleuropein je inhibirao mikoplazme u koncentracijama od 20 do 320 mg/l (Furneri i sur., 2002).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Biljne droge i njihove iscrpine stoljećima se primjenjuju u terapiji najrazličitijih bolesti. Zbog povećanog broja pacijenta s kandidozom, kao i broja sojeva kandida koji pokazuju smanjenu osjetljivost na antimikotike (Kullberg i sur., 2011), dolazi do potrebe za istraživanjem novih tvari s antifungalnim učinkom ili povećanjem učinovitosti onih koji su već u upotrebi.

Utjecaj oleuropeina i hidroksitirosola slabo je istražen te je cilj ovog rada (odnosno nulta hipoteza ispitati da li oleuropein i hidroksitirosol modulira stjenku gljivične vrste *C. albicans.*

U svrhu postizanja ciljeva hipoteze prevest će se istraživanja u uvjetima in vitro:

a) Učinak oleuropeina i hidroksitirosola na biosintezu ergosterola na modelu vrste *C. albicans* ATCC 10231
b) Inhibicija germinacije *C. albicans* oleuropeinom i hidroksitirosolom
c) Inhibicija rasta filamenata *C. albicans* (eng. „germ tube“ growth inhibition) oleuropeinom i hidroksitirosolom

3 MATERIJALI I METODE

3.1 ODABIR MIKROORGANIZAMA

U ovom istraživanju kao mikrobni model korišten je standardni laboratorijski soj vrste *Candida albicans* ATCC 10231, izolat iz krvi (American Type Culture Collections, Rockville, SAD). Soj je pohranjen u Zbirci mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2 PODLOGE

Pripravljene mikrobiološke podloge su sterilizirane autoklaviranjem na 121°C (1,1 bar) tijekom 20 min.

3.3 PRIPRAVA HIDROKSITIROSOLA I OLEUROPEINA

Pripravljene su radne otopine hidroksola i oleuropeina otapanjem poznate mase u odvojenim odmjernim tikvicama. Koncentracijea radne (tzv. stock) otopine bile su 10 mg/mL za svaku te su se te otopine koristile u daljnjim razrjeđenjima željenih koncentracija hidroksitirosola i oleuropeina. U ovom istraživanju, vrijednost MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) oleuropeina za soj-model je iznosio 12.5 mg/mL, dok je za hidroksitirosol iznosila 6.25 mg/mL, a podatak je već dobiven u Zavodu za mikrobiologiju tijekom prijašnjih istraživanj. U našem ispitivanju koristili smo koncentracije u sub-MIK području.

3.4 ODREĐIVANJE ERGOSTEROLA

3.4.1 Uzgoj vrste *Candida albicans*

Vrstu *C. albicans* nasadili smo na 20 ploča sa Sabouraud 2 %-tnim glukoznim agarom i stavili inkubirati tijekom 24h na 37°C u aerobnim uvjetima (Sanyo MIR-553, Japan). Nakon inkubacije sterilnim brisom inokulirali smo Sabouraud 2%-tni glukozni bujon u tresilicu (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-bio, UK) te aerobno inkubirali tijekom 24h na 37°C.

Nakon inkubacije u 10 sterilnih plastičnih epruveta dodali smo 8 mL gljivične suspenzije te svakoj dodali 2 mL RPMI 1640 (Sigma Aldrich, SAD) uz miješanje na vorteksu 180 okretaja/min (Laboratory Vortex Shaker, IKA, Njemačka) te smo tako pripravljene kulture kandida koristili u daljnjim mjerenjima (određivanje sinteze ergosterola).

Koncentracije radnihotopina bile su 10 mg/mL te smo te otopinu dodavali u 6 plastičnih epruveta da dobijemo željene koncentracije hidroksitirosola te u drugih 6 plastičnih epruveta da dobijemo željene koncentracije oleuropeina. U ovom istraživanju koristili smo vrijednosti ispod MIK (minimalna inhibitorna koncentracija)i određivali djelovanje oleuropeina na sintezu ergosterola pri koncentraciji oleuropeina od 1250 μg/mL, što čini desetinu određene vrijednosti MIK-a, te pri 195.31 μg/mL(64 puta manja vrijednost od MIK-a) i 24.41 μg/mL (510x manja vrijednost od MIK-a). Djelovanje hidroksitirosola ispitivali smo u koncentracijama hidroksitirosola od 625 μg/mL (10 puta manja vrijednost od MIK-a), 97.6 μg/mL (64 puta manja vrijednost od MIK-a) i 12.21 μg/mL (510 puta manja vrijednost od MIK-a)

U svoje smo istraživanje uključili negativnu kontrolu (bez oleuropeina i hidroksitirosola) te pozitivnu kontrolu sa standardnim antimikotikom vorikonazolom (Pfizer, SAD) u koncentraciji 4 μg/mL.

Nakon što smo u ranije pripravljene falkon-epruvete s mikroorganizmom (8 mL inokuluma + 2 mL RPMI) dodali željene koncentracije oleuropeina i hidroksitirosola, tako pripravljene suspenzije inkubirane su na tresilici (180 okretaja/min) na 35°C tijekom 18h.

3.4.2 Mjerenje ergosterola

Mjerenje ergosterola u staničnoj stjenci vrste *C. albicans* provedeno je prema hodogramu prikazanom na slici 5.

Nakon inkubacije od 18 sati na tresilici pri 35°C pristupili smo sedimentaciji stanica na 2700 rpm kroz 5 minuta te ispiranju istih fiziološkom otopinom. Postupak smo ponovili dva puta. Supernatant smo uklonili i na analitičkoj vagi izvagali masu stanica prema formuli:

$m_s = m_{f+s} - m_f$
m_s – masa stanica
m_f - masa plastične epruvete sa stanicama
m_{f+s} - masa prazne plastične epruvete

Sljedeći korak pri određivanju ergosterola je kemijska liza stanica. U svaku smo plastičnu epruvetu dodali 1 ml destilirane vode i 3 mL 25%-tne otopine KOH u 96%-tnom etanolu, te, vorteksirali točno 1 minutu. Zatim smo otopinu preselili u staklene epruvete s

čepom i napravili temperaturnu lizu stanica u vodenoj kupelji na 85°C tijekom 1 sata. Epruvete smo izvadili iz vodene kupelji i ostavili ih da se ohlade na sobnu temperaturu.

Kako bi izolirali sterole, u epruvete smo dodali 1 mL destilirane vode i 3 mL heksana staklenom pipetom i snažno vorteksirali 3 minute. Gornji heksanski sloj preselili smo u sterilnu epruvetu s čepom i pohranili na -20°C. Prije samog mjerenja sterolni heksanski ekstrakt razrijedili smo 99%-tnim etanolom u omjeru 1:5 (200 µL heksana + 800 µL etanola). Zatim smo pristupili spektrofotometrijskom skeniranju između 240 i 300 nm (Cary 100 UV-visible spectrophotomer, SAD).

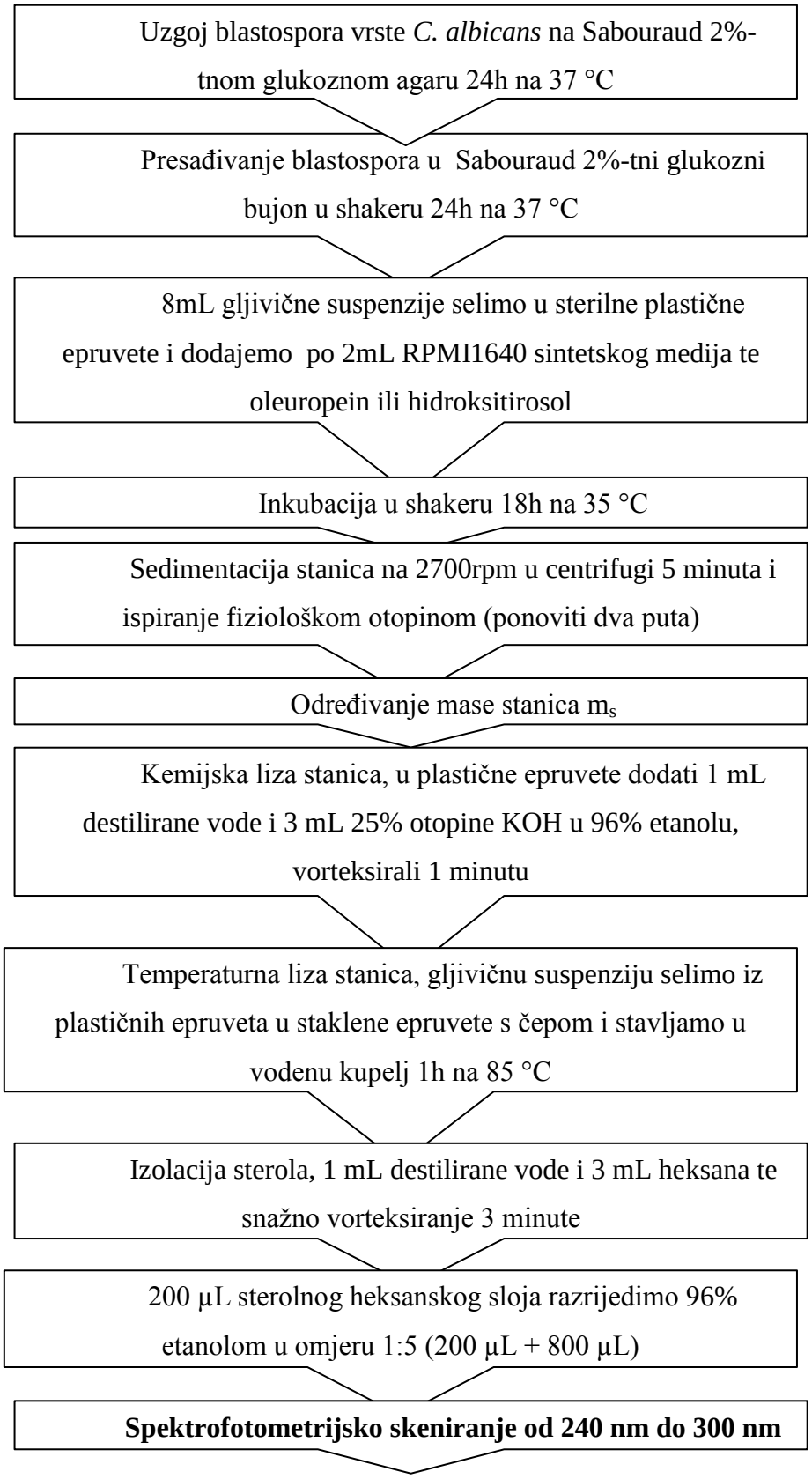
Sadržaj ergosterola izračunan je kao postotak mase stanica prema sljedećim jednadžbama:

$$\%\text{ergosterol} + \%24(28)\text{ DHE} = [(A_{281,5}/290) \times F]/\text{masa stanica}$$
$$\%24(28)\text{ DHE} = [(A_{230}/518) \times F]/\text{masa stanica}$$
$$\%\text{ergosterol} = [\%\text{ergosterol} + \%\ 24(28)\text{ DHE}] - \%\ 24(28)\text{ DHE}.$$

gdje je F faktor razrjeđenja u etanolu dok su 290 i 518 E vrijednosti (postoci po centimetru) određeni za kristalinični ergosterol i 24(28) DHE. MIK oleuropeina i hidroksitirosola definiran je kao koncentracija koja je izazvala 80%-tno smanjenje u sastavu staničnog ergosterola u usporedbi s negativnom kontrolom.

Sva mjerenja su provedena u duplikatu.

Slika 7. Hodogram za određivanje ergosterola (engl. *sterole quntification method,*SQM)



3.5 INHIBICIJA GERMINACIJE *CANDIDE ALBICANS*

3.5.1 Priprava medija za pokus ispitivanja inhibicije germinacije *Candide albicans*

Pripravljene su radne otopine na isti način kako je opisano u odjeljku 3.3 i korištena je ista gljivična kultura kao i u prethodnom pokusu (*Candida albicans* ATCC 10231).

1. Medij sa N-acetil-D-glukozaminom. 0,5% N-acetil-D-glukozamina (Sigma-Aldrich, Njemačka), 0,5% peptona (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 0,3% KH_2PO_4(Kemika, Hrvatska) otopljeno je u destiliranoj vodi (konačni volumen 100 mL) i profiltrirano preko 0,45 μm filtra.
2. Leejev medij. Otopljena je glukoza(Medikemija, Zagreb) u destiliranoj vodi (10 g/100 mL) te profiltrirana preko 0,45 μm filtra. 10 mL ove otopine dodano je u 90 mL sintetskog medija RPMI 1640 (Merck, Njemačka).
3. Spiderov medij. 1 % hranjivog bujona(Sigma-Aldrich, Njemačka), 1 % manitola (Difco Laboratories, SAD) i 0,2 % K_2HPO_4(Kemika, Hrvatska)otopljeno je u destiliranoj vodi (konačni volumen 100 mL) i sve profiltrirano preko 0,45 μm filtra.
4. YPD (yeast-potato dextrose) medij. 300 g oguljenih krumpira kuha se u 600 mL destilirane vode dok ne budu potpuno kuhani. Sadržaj se profiltrira preko filtar papira te se doda destilirane vode do konačnog volumena od 1 L. Nakon toga se doda agar (Merck, Njemačka) (15 g) te se prokuha da se on otopi. Nakon toga se doda 20 g glukoze (Medikemija, Zagreb) i 5 g ekstrakta kvasca (Sigma-Aldrich, Njemačka) te se autoklavira (121 ºC, 1.1 bar, 20 minuta).U prethodno pripravljeni YPD medij dodano je 10 % FBS (fetal bovine serum) (Gibco, SAD).

3.5.2 Priprema inokuluma

Za pripremu inokuluma, pripremljene su svježe kulture *Candida albicans*. Sa Sabouradovog 2% glukoznog agara, blastoporedekadidasu presađene u oko 5 mL YPD bujona te inkubirane na 30 ºC tijekom 18 h. Nakon toga su centrifugirane te dva puta isprane sa fiziološkom otopinom. Inokulum je pripremljen suspendiranjem ispranih kolonija u fiziološkoj otopini tako da optička gustoća konačne suspenzije bude 0,5 McFarlanda, odnosno $5x10^6$ stanica/mL.

3.5.3 Inhibicija germinacije *Candide albicans*

Korištene su mikrotitarske ploče sa 96 jažica. Prvi korak je bio staviti po 100 µL medija u jažice i to u svaki stupac jedan od četiri prethodno spravljena, različita medija. Zatim je po redu mikrotitracijske ploče dodana radna otopina oleuropeina kako bismo dobili dvije različite koncentracije oleuropeina pa se ista stvar napravila u odvojene za hidroksitirosol. Nakon toga je u svaku jažicu dodano 20 µL inokuluma te su jažice nadopunjene do 200 µL odgovarajućim medijem.

Koncentracije oleuropeina bile su 1250 µg/ml (O1) i 195.31 µg/ml (O2), a koncentracije hidroksitirosola bile su 625 µg/ml (HT1) i 97,6 µg/ml (HT2). Priređene su dvije vrste kontrole, negativnu kontrolu (NK) činio je odgovarajući medij sa inokulumom, dok je pozitivna kontrola (PK) bila priređena s amfotericinom B u koncentraciji 0.7 µg/ml. Sve je rađeno u duplikatu. Mikrotitarske pločice stavljene su na inkubiranje 3 sata pri 37 ºC. Nakon inkubacije ploče su promatrane pod mikroskopom (Olympus BX40, povećanje 800x) te je utvrđeno u kojim jažicama je došlo do inhibicije germinacije. Kvantifikacije inhibicije morfoloških prijelaza računata je brojanjem stanica i računanjem postotka germiniranih kvasaca..

3.6 INHIBICIJA RASTA FILAMENATA *CANDIDE ALBICANS*

Koristile su se mikrotitarske ploče sa 96 jažica. Jažice smo priredili i stavili inkubirati 3 sata pri 37 ºCistim postupkom kao i za metodu 3.5.3. Nakon inkubacije ploče su promatrane pod mikroskopom (Olympus BX40, povećanje 800x) te je utvrđeno u kojim jažicama je došlo do germinacije. Kvantifikacija inhibicije rasta filamenata računata je mjerenjem duljine filamenata germiniranih blastospora u pojedinom mediju i koncentraciji hidroksitirosola ili oleuropeina. Mjerenje smo izvodili pomoću računalnog programa Dino capture 2.0 i time utvrdili duljinu filamenata germiniranih kvasaca koje smo promatrali.

3.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

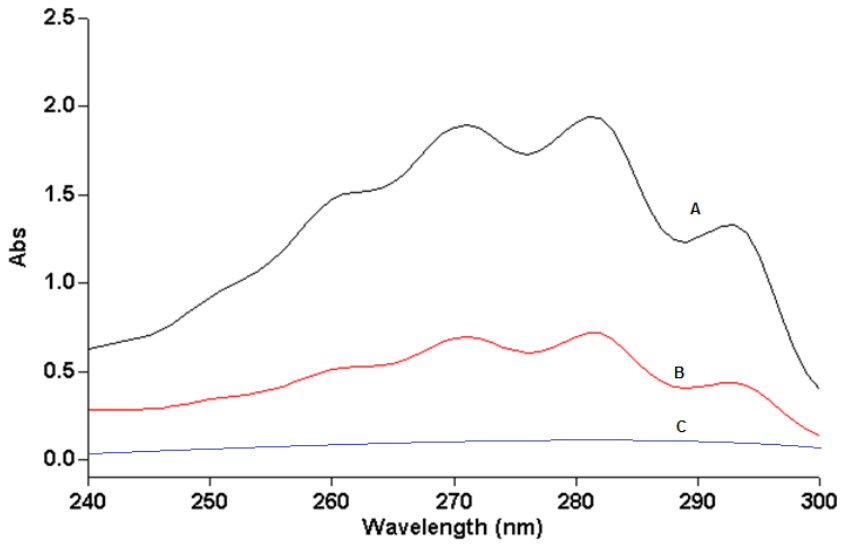
Sve vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija *n* nezavisnih mjerenja. Podaci su obrađeni primjenom testa analize varijance (ANOVA) ili studentovog t-testa uz razinu statističke značajnosti $p<0.05$. Za statističku obradu podataka korišten je programski paket Prism GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, SAD; www.graphpad.com)

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 UČINAK NA BIOSINTEZU ERGOSTEROLA

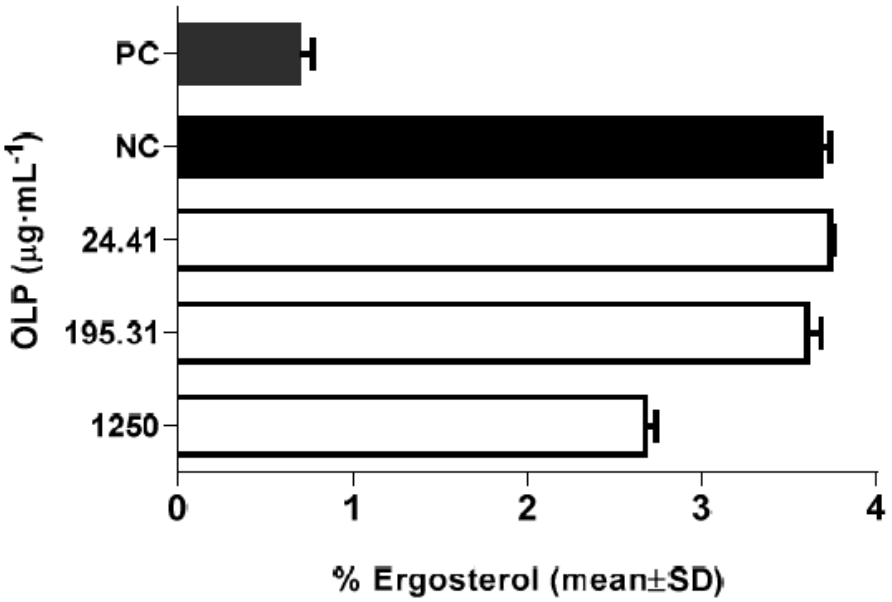
Većina terapija za gljivične infekcije ciljaju na put biosinteze ergosterola ili na završni produkt ergosterol. Taj membranski sterol je jedinstven za gljivice i potreban je za rast i normalnu funkciju membrana gljivičnih stanica. Primarni mehanizam reakcije kojim npr. azoli koji su najviše korišteni antimikotici djeluju, je inhibicija rasta staniceje remećenje puta biosinteze ergosterola što uzrokuje smanjenje u biosintezi ergosterola.

Prisutnost ergosterola i kasnog intermedijera sterola 24(28)-dehidroergosterola (DHE) u ekstrahiranom uzorku rezultiralo je karakterističnom krivuljom s 4 maksimuma između 240 i 300 nm (Slika 8.). Nedostatak detektabilnog ergosterola u ekstraktu se očituje ravnom linijom. Rezultati utjecaja oleuropeina i hidroksitirosola na biosintezu ergosterola u modelu vrste *C. albicans* ATCC 10231 pokazuju smanjenja % ergosterola sa povećanjem koncentracije oleuropeina i hidroksitirosola. Desetorostruka niža koncentracija oleuropeina od MIK vrijednosti (1250 µg/mL) značajno smanjuje biosintezu ergosterola ($p<0,05$ u odnosu na intaktne blastospore.



Slika 8. UV spektrometrijski sterolni profil *C. albicans* ATCC 10231; krivulja A je negativna kontrola bez oleuropeina, B je krivulja sa oleuropeinom u koncentraciji 10x manjoj od MIK vrijednosti, C je pozitivna kontrola kada nema detektibilnog ergosterola

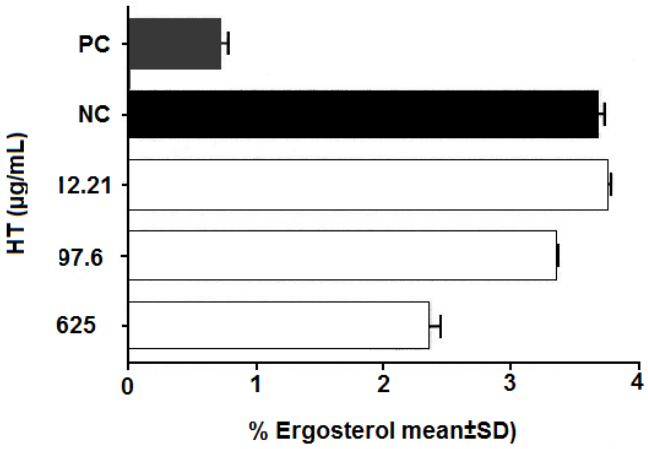
Ispitali smo učinak oleuropeina na membranu *C. albicans* testom sinteze ergosterola. Slika 9. pokazuje modulaciju biosinteze ergosterola kod različitih koncentracija oleuropeina.



Slika 9. Modulacija sadržaja ergosterola kod različitih koncentracija oleuropeina (OLP); PC – pozitivna kontrola vorikonazol 4 μg/mL; NC – negativna kontrola netretirane stanice. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri pokusa ± SD ($p < 0.05$ u usporedbi s NC)

Ispitivanje je pokazalo da u sub-MIK koncentracijama, oleuropein je promjenio sastav sterola i posljedično utjecao na staničnu membranu. Nadalje, podaci pokazuju da je oleuropein smanjio sadržaj ergosterola ovisno o dozi. Intergrupna usporedba otkrila je statistički značajnu razliku ($p < 0.05$) između ispitivanih koncentracija. Kod najveće koncentracije (1.25 mg/ml), oleuropein je uzrokovao 28% smanjenje u ukupnom sastavu sterola.

Hidroksitirosol je također pokazao učinak na membranu *Candide albicans*. (Slika 10.) pokazuje modulaciju biosinteze ergosterola kod različitih koncentracija hidroksitirosola.

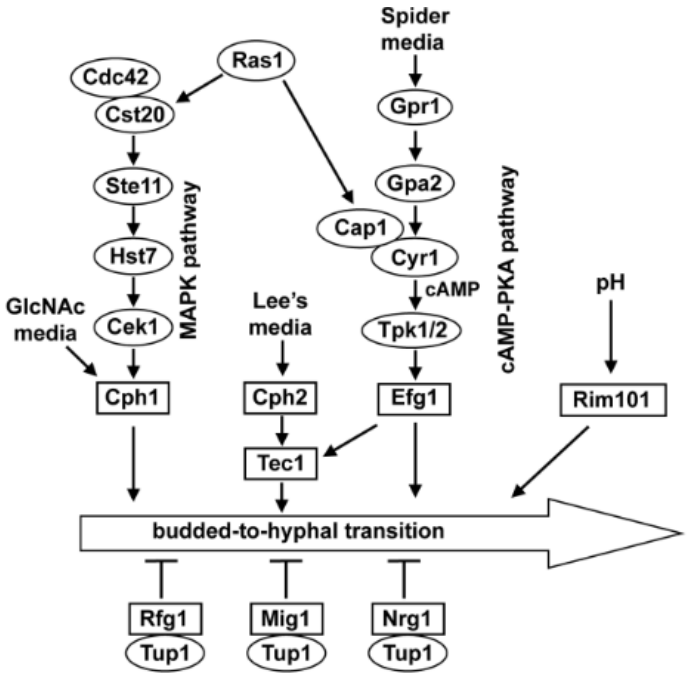


Slika 10. Modulacija sadržaja ergosterola kod raličitih koncentracija hidroksitirosola (HT); PC – pozitivna kontrola vorikonazol 4 µg/mL; NC – negativna kontrola netretirane stanice. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri pokusa ± SD ($p < 0.05$ u usporedbi s NC)

Hidroksitirosol je ispitivanjem pokazao da i on u sub-MIK koncentracijama smanjuje sadržaj ergosterola koji je ovisan o dozi sa statistički značajnom razlikom ($p < 0.05$). Kod najveće koncentracije (625 µg/mL), hidroksitirosol je uzrokovao 33% smanjenje u ukupnom sastavu sterola.

4.2 INHIBICIJA GERMINACIJE BLASTOSPORA VRSTE *CANDIDA ALBICANS*

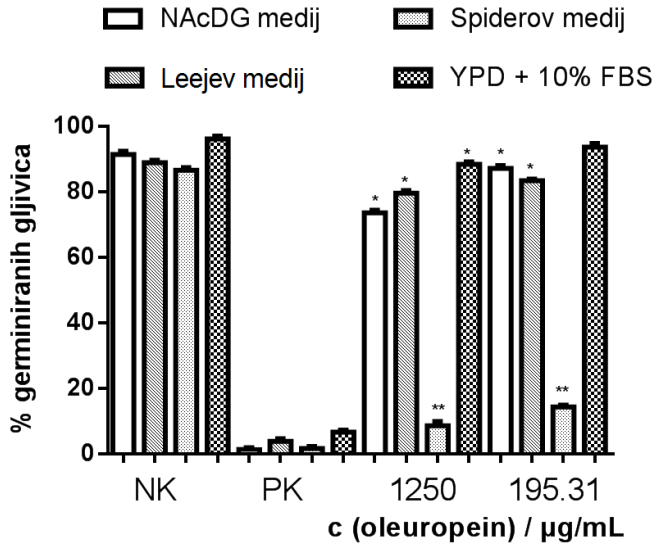
Postoje različiti morfološki oblici *Candida albicans* (blastospore, pseudohife i hife). Sposobnost prelaska iz jednog u drugi oblik ovisi o različitim signalima izvana kao što su temperatura ili pH, nedostatak dušika ili ugljika u mediju u okolini prisutnost makrofaga domaćina i sl. Najpotentniji induktor prijelaza iz blastospora u filamentozni oblik je prisutnost seruma u mediju (10%) pri temperaturi 37 ºC, iako još nije poznata točna sastavnica seruma koja inducira promjenu morfologije. Također, rast uz neke druge nutrijente kao što su N-acetilglukozamin, metionin i prolin ili rast u medijima koji su siromašni nutrijentima (Leejev medij, Spider medij i SLAD medij sa niskom koncentracijom dušika) također može inducirati ovaj prijelaz. Prijelaz između oblika također ovisi o kiselosti medija, osmotskom stresu te reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) što govori u prilog da je promjena morfologije ovisna o promjeni vanjskih uvjeta i zapravo je prilagodba na stres. Ovisno o vanjskim čimbenicima aktiviraju se ili inhibiraju različiti intracelularni signalni putevi u gljivicama, a svaki od tih signalnih puteva aktivira raličite transkripcijske faktore koji induciraju ili inhibiraju ekspresiju hifa-specifičnih gena. (Slika 13.) (Midkiff i sur., 2011.)



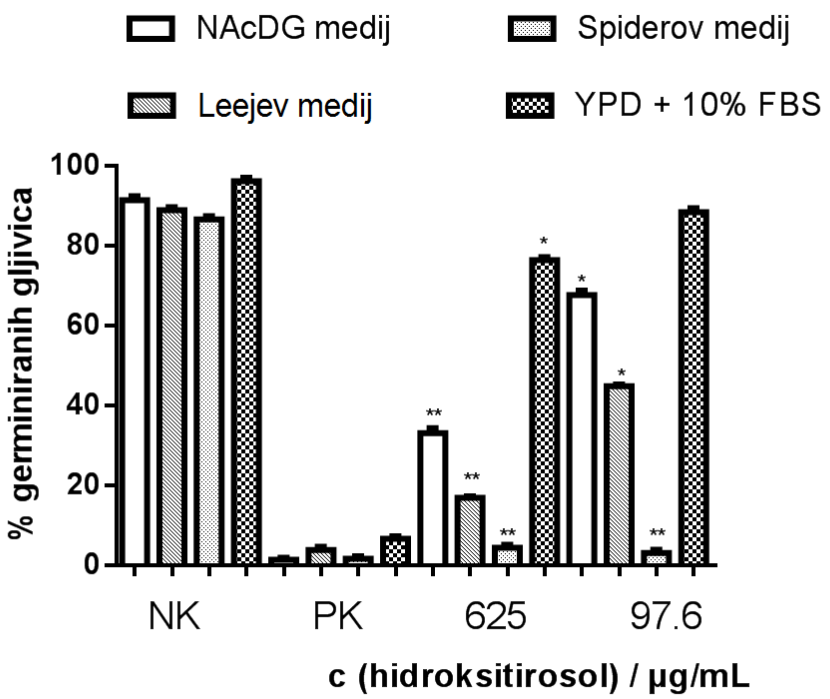
Slika 11. Utjecaj različitih medija na signalne puteve u *Candidi albicans* (Midkiff i sur., 2011)

Na osnovu ovih saznanja, *Candida albicans* je inkubirana u četiri različita medija koja bi trebala inducirati različite signalne puteve te je promatran učinak različitih koncentracija oleuropeina i hidroksitirosola na promjenu morfologije stanica.

Nakon inkubacije, mikrotitracijska ploča sa *Candida albicans* ATCC 10231 promatrana je pod mikroskopom. Kod oba spoja, kao i u sva četiri različita medija uočen je sličan trend. U Spiderovom mediju oba su spoja intenzivno inhibirala germinaciju blastospora kod obje koncentracije za koje je bitno naglasiti da su u sub-MIK vrijednostima. Smanjenjem koncentracije naših spojeva povećao se postotak germiniranog oblika *C. albicans*. U svim koncentracijama, te posebno u nižim medij sa YPD + 10% FBS gotovo u potpunosti je prevladavao micelarni oblik *C. albicans* i slika u tim kažicama nije se razlikovala od kontrole (bez oleuropeina ili hidroksitirosola). Ukupno, za svaku jažicu brojane su stanice u 10 kvadratića, a budući da je sve rađeno u duplikatu, ukupno za jednu koncentraciju (oleuropeina ili hidroksitirosola) u svakom pojedinom mediju izbrojane stanice u dvadeset takvih kvadratića. Nakon što su stanice izbrojane, računao se postotak germiniranih stanica te je za konačan rezultat uzimana srednja vrijednost svih dvadeset brojanje. Rezultati su prikazani na slikama 12. i 13.



Slika 12. Postotak germiniranih blastospora vrste *C. albicans* ATCC 10231 u četiri različita medija u ovisnosti o koncentraciji oleuropeina nakon 3 sata inkubacije na 37 °C; *p<0,05 u odnosu na NK; **p<0,01 u odnosu na NK



Slika 13. Postotak germiniranih blastospora vrste *C. albicans* ATCC 10231 u četiri različita medija u ovisnosti o koncentraciji hidroksitirosola nakon 3 sata inkubacije na 37 °C; *p<0,05 u odnosu na NK; **p<0,01 u odnosu na NK

Kod oba spoja vidi se trend povećanja postotka germiniranih blastospora *Candide albicans* smanjenjem koncentracije oleuropeina i hidroksitirosola.

Promatrajući rezultate za oleuropein zaključujemo da oleuropein pri koncentraciji 1250 µg/mL inhibira germinaciju vrste *Candida albicans* pogotovo u Spiderovom mediju. Također je vidljivo da je i pri višoj koncentraciji oleuropeina došlo do značajnije germinacije što podržava literaturni podatak da dodatak seruma u medij ima značajan utjecaj na indukciju germinacije. Pri koncentraciji oleuropeina od 97.6 µg/mL postotak germiniranih blastospora se udvostručuje u svim medijima osim u Spiderovom mediju gje je on još uvijek nizak kao na prvoj koncentraciji oleuropeina i pozitivnoj kontroli (amfotericin B u koncentraciji 0.7 µg/mL), te se uočavanastatistički značajna razlika u odnosu na druge medije.

Promatrajući rezultate za hidroksitirosol, vide se slični trendovi rasta postotka germiniranih blastospora smanjenjem koncentracije hidroksitirosola. Također, vrlo slična stvar se opaža u jažicama sa Spiderovim medijem gdje postoji statistički značajna razlika, tj. smanjen postotak germiniranih blastospora u odnosu na ostale medije pri obje koncentracije

hidroksitirosola. Slično kao i za oleuropein, postoji statistički značajna razlika za YPD medij sa 10%-tnim dodatkom FBS pri svim promatranim koncentracijama hidroksitirosola.

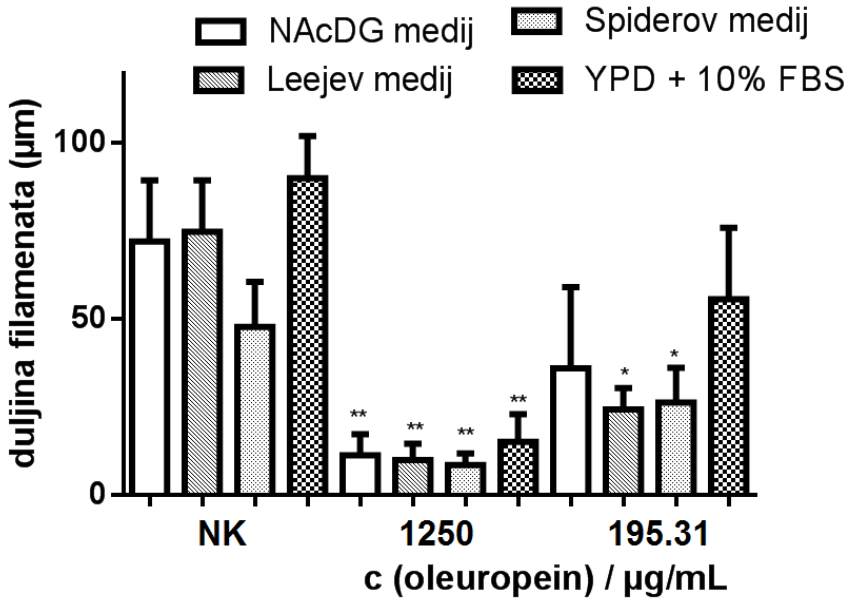
Podaci dobiveni ovim testovima definitivno upućuju na sposobnost oleuropeina i hidroksitirosola da inhibiraju germinaciju *Candide albicans* u koncentracijama koje su niže od minimalnih inhibitornih koncentracija. Istraživanje je pokazalo i to da inhibicija germinacije *Candide albicans,* osim o koncentraciji oleuropeina i hidroksitirosola ovisi i o mediju u kojem se gljivica inkubirala. Tako je potvrđen podatak da je germinacija najizraženija u mediju sa 10 %-tnim dodatkom seruma. Ono što upućuje na nova saznanja je trend koji se događa u Spiderovom mediju. Naime, za razliku od ostalih medija u ovome mediju je inhibicija germinacije jako izražena, čak i pri nižim koncentracijama i oleuropeina i hidroksitirosola što može upućivati na mogući mehanizam djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola na inhibiciju germinacije *Candide albicans.*

4.3 INHIBICIJA RASTA FILAMENATA *CANDIDE ALBICANS*

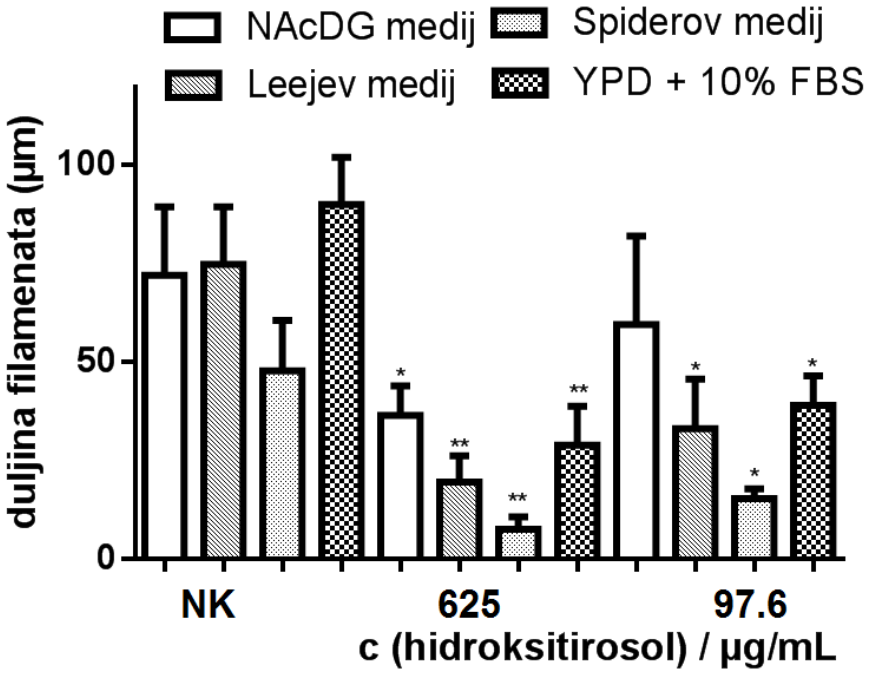
Kako bismo u potpunosti shvatili mehanizam djelovanja potencijalnog antifungalnog agensa, potrebno je istražiti utjecaj na faktore virulencije, koji su esencijalni za stvaranje infekcije u domaćinu. Glavna prednost ciljanja faktora virulencije je veći broj potencijalnih meta za nove antifungalne lijekove, očuvanje mikrobioma domaćina i smanjeni selektivni pritisak za stvaranjem antibiotske rezistencije(Clatworthy i sur. 2007.).

Candida albicans kao polimorfna gljivica ima mogućnost reverzibilnih morfoloških tranzicija između kvasca i filamentozne forme. Istraženo je da rast hifa promovira virulenciju i igra ključnu ulogu u prodiranju u tkivo i otpornosti na fagocitozu (Jayatilake, 2006.).

Blastospore *Candida albicans* stvaraju filamente (engl. „germ tubes“) unutar dva do tri sata kada se inkubiraju na 37 °C u prisutnosti seruma ili plazme izolirane iz ljudi ili životinja (Taschdjian i sur.). Ispitali smo inhibitorni učinak oleuropeina i hidroksitirosola u uvjetima koji induciraju rast filamenata, te usporedili s negativnom kontrolom.



Slika 14. Prosječna duljina filamenata germiniranih blastospora vrste *Candida albicans* ATCC 10231 u četiri različita medija u ovisnosti o koncentraciji oleuropeina nakon 3 sata inkubacije na 37 °C; *p<0,05 u odnosu na NK; **p<0,01 u odnosu na NK



Slika 15. Prosječna duljina filamenata germiniranih blastospora vrste *Candida albicans* ATCC 10231 u četiri različita medija u ovisnosti o koncentraciji hidroksitirosola nakon 3 sata inkubacije na 37 °C; *p<0,05 u odnosu na NK; **p<0,01 u odnosu na NK

Promatrajući dobivene rezultate za oleuropein zaključujemo da oleuropein u obje koncentracije značajno inhibira rast filamenata u sva četiri medija u usporedbi s negativnom kontrolom nakon 3 sata inkubacije na 37 °C.

Nadalje, hidroksitirosol također pokazuje značajnu inhibiciju rasta filamenata u sva četiri medija u usporedbi s negativnom kontrolom, te pogotovo u Spiderovom mediju, Što predstavlja mogućnost inhibicije faktora virulencije.

5 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja u uvjetima *in vitro* i diskusije može se zaključiti sljedeće:

a) da se oleuropein i hidroksitirosol upliću u biosintezu ergosterola odnosno stanične stijenke medicinski značajne gljivične vrste *C. albicans* ATCC 10231 već u sub-MIK koncentracijama u kojima značajno modulira biosintezu ergosterolana 35°C tijekom 18h
b) da oleuropein i hidroksitirosolnakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju germinaciju blastospora vrste *C. albicans* ATCC 10231 već u sub-MIK koncentracijama djelovanjem na unutarstanične signalne puteve (cAMP-PKA)
c) da oleuropein i hidroksitirosol nakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju rast filamenata germiniranih stanica vrste *C. albicans* ATCC 10231 već u sub-MIK koncentracijama djelovanjem na unutarstanične signalne puteve (cAMP-PKA)

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da oleuropein i hidroksitirosol imaju obečavajuću *in vitro* aktivnost protiv *C. albicans.* Ovi antifungalni agensi ciljano djeluju na faktore virulencije esencijalne za ostvarivanjem oportunističke infekcije. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se dublje istražio mehanizam djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola za ostvarivanje mogućnosti novog antifungalnog lijeka.

6 LITERATURA

Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan LA. Evolution of ergosterol inhibitors as fungicidal against Candida. *Microb Pathog*, 2010, 48, 35–41.

Berman J, Sudbery PE. Candida albicans: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature*, 2002, 918-930.

Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydoxytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 1999, 51: 971-4.

Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. Nat Chem Biol, 2007, 3, 541–548.

D' Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug metabolism and disposition*, 2001, 29, 1497-1498.

Furneri PM, Marino A, Saija A, Ucella N, Bisignano G. In vitro anrimyxoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 20, 293-296.

Furneri PM, Piperno A, Sajia A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48 (12): 4892-4.

Ishida K, Palazzo de Mello JC, Cortez DAG, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from Stryphnodendron adstringens on growth and virulence factors of Candida albicans. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58, 942–949.

Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of Candida albicans, and non-albicans Candida species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 2006, 35, 484–491.

Katzung BG, Trevor AJ, Masters SB. 2011. Basic and Clinical Pharmacology, 11th Edition.

Kullberg BJ, Verweij PE, Akova M, Arendrup MC, Bille J, Calandra T, Curenca – Estrella M, Herbrecht R, Jacobs F, Kalin M, Kibbler CC, Lortholary O, Martino P, Meis JF, Munoz P, Odds FC, De Pauw BE, Rex JH, Roilides E, Rogers TR, Ruhnke M, Ullmann AJ, Uzun O, Vandewoude K, Vincent JL, Donnelly JP. European expert opinion on the

management of invasive *candidiasis* in adults, *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1 – 12.

Lee-Huang PL, Zhang D. Discovery of a small molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part I. Integrase inhibition. *Biochem biophys Res Commin*, 2007, 354: 872-8.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*, *Microbiology*, 2003, 149, 353-362.

Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sanchez-Perez M, Nombela C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internatl Microbiol*, 1998, 1:95-106.

Pereira A, Ferreira I, Marcelino F, Valentao P, Andrade P, Seabra R, Bento A. Phrenolic compounds and Antimicrbial activity of Olive (*Olea europaea* L. *Cv.* Cobrancosa) *Leaves Molecules*, 2007, 1-4.

Procorpio A, Alcaro S, Nardi M. Synthesis, biological evaluation, nad molecilar modelling of oleuropein and its semisynthetic derivatives as cyclooxygenase inhibitors. J *Agric Food Chem*, 2009, 57 11161-7.

Procopio A, Celia C, Nardi M, Oliverio M, Paolino D, Sindona G. Lipophilic hydroxytyrosol esters: fatty acid conjugates for pitential topical administration. *J Nat Prod*, 2011, 74: 2377-81.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states od *Candida albicans*. *Elsevier Ltd*, 2004, 1-8.

Stupans I, Stretch G, Hayball P, Olive oil phenols inhibit human hepatic microsomal activity, *J Nutr*, 2000, 2367–2370.

Medina E, Brenes M, Romero C, Garcia A, De Castro A. ;aom amrimicrobial compounds in table olives. *K Agric Food Chem*, 2007, 55: 9817-23.

Midkiff J, Borochoff-Porte N, White D, Johnson DI. Small Molecule Inhibitors of the Candida albicans Budded-to-Hyphal Transition Act through Multiple Signaling Pathways. *PloS ONE*, 2011, 1-11.

Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med*, 1992, 58, 513-515.

Taschdjian CL, Btirchall JJ, Zinn PJ. Rapid identification of Candida albicans by filamentation on serum and serum substitutes. *A M A J Dis Child*, 1960, 99: 212.

Tassou CC, Nychas GJE, Board RG. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of Bacillus cereus T spores. *Biotechnol Appl Biochem*, 1991, 13, 231–237.

Tuck LK, Hayball. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J of nutritional biochemistry*, 2002, 10, 1016-29.

Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, Gonzales M, Utrilla Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*, 1991, 57, 417-419.

Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Kremer D, Tomić S, Kosalec I. Hydroxytyrosol Expresses Antifungal Activity In Vitro. *Current Drug Targers*, 2013, 14, 992-998.

Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Kremer D, Tomić S, Kosalec I, Bobnjarić I. Antifungal Activity of Oleuropein against Candida albicans - The In Vitro Study. *Molecules*, 2016, 21, 1631.

7 SAŽETAK / SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Candida albicans je dio ljudskog mikrobioma (endogeni oportunistički kvasac koji u zdravih osoba ne uzrokuje infekciju. No, narušavanjem ravnoteže između mikrobioma i nositelja, komenzalni oblik prelazi u infekciju s kliničkom manifestacijom. Cilj ovoga rada je utvrditi učinak oleuropeina i hidroksitirosola te njihov menhanizam djelovanja na vrstu *Candida albicans*. Određivanjem ergosterola SQM metodom utvrđeno je da oleuropein i hidroksitirosol u sub-MIK vrijednostima nakon 18 sati inkubacije na 35°Cdaju rezultate koji pokazuju njegovo uplitanje u put biosinteze ergosterola. Određivanjem učinka hidroksitirosola i oleuropeina na inhibiciju germinacije blastospora vrste *C. albicans* pokazalo se oleuropein i hidroksitirosol nakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju germinaciju blastospora već u sub-MIK koncentracijama djelovanjem na unutarstanične signalne puteve (cAMP-PKA). Ispitivanjem učinka na rast filamenata otkriveno je da oleuropein i hidroksitirosol nakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju rast filamenata germiniranih stanica vrste *C. albicans* već u sub-MIK koncentracijama. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da su oleuropein i hidroksitirosol izrazito zanimljive molekule za daljnja istraživanja mehanizama antifungalnog učinka, ali i mogućeg sinergističkog učinka s antimikoticima. Prema tome, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama djelovanja na faktore virulencije.

7.2 SUMMARY

Candida albicans is an endogenous opportunistic yeast that does not cause infections in healthy individuals. However, disruption of the balance between microbiome and microorganism, the commensal form becomes pathogenic with clinical manifestation. The aim ofthis study was to determine the effect of oleuropein and hydroxytyrosol and their mechanism of action in *C. albicansin vitro.* Using the SQM approach for modulation ofergosterol synthesiswe found that oleuropeine and hydroxytyrosol in concentrations below the MIC after 18 hours of incubation at 35 °C showed their interference in ergosterol biosynthesis pathway. The testing of the effect of hydroxytrosol and oleuropein on the inhibition of blastospore germination of *C. albicans* showed that after 3 hours of incubation at 37 °C oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the germination even in values below MIC affecting the cellular signal pathways (cAMP-PKA). The testing of inhibition of growth of filaments reveals that oleuropeine and hydroxytyrosol after 3 hours of incubation at 37 °Cinhibit the growth of filaments of *C. albicans* germinated cells even in sub-MIC concentrations. Oleuropeine and hydroxytyrosole are extremely interesting molecules for further research into mechanisms of antifungal activity, but also for possible synergistic effect with antimycotics. Therefore, further research into mechanisms of action on virulence factors is required.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za mikrobiologiju
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INHIBICIJA VIRULENCIJE VRSTE CANDIDA ALBICANS OLEUROPEINOM I HIDROKSITIROSOLOM

Ivan Bobnjarić

SAŽETAK

Candida albicans je dio ljudskog mikrobioma (endogeni oportunistički kvasac koji u zdravih osoba ne uzrokuje infekciju. No, narušavanjem ravnoteže između mikrobioma i nositelja, komenzalni oblik prelazi u infekciju s kliničkom manifestacijom. Cilj ovoga rada je utvrditi učinak oleuropeina i hidroksitirosola te njihov menhanizam djelovanja na vrstu *Candida albicans*. Određivanjem ergosterola SQM metodom utvrđeno je da oleuropein i hidroksitirosol u sub-MIK vrijednostima nakon 18 sati inkubacije na 35°Cdaju rezultate koji pokazuju njegovo uplitanje u put biosinteze ergosterola. Određivanjem učinka hidroksitirosola i oleuropeina na inhibiciju germinacije blastospora vrste *C. albicans* pokazalo se oleuropein i hidroksitirosol nakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju germinaciju blastospora već u sub-MIK koncentracijama djelovanjem na unutarstanične signalne puteve (cAMP-PKA). Ispitivanjem učinka na rast filamenata otkriveno je da oleuropein i hidroksitirosol nakon 3 sata inkubacije na 37 °C inhibiraju rast filamenata germiniranih stanica vrste *C. albicans* već u sub-MIK koncentracijama. Iz dobivenih se podataka može zaključiti da su oleuropein i hidroksitirosol izrazito zanimljive molekule za daljnja istraživanja mehanizama antifungalnog učinka, ali i mogućeg sinergističkog učinka s antimikoticima. Prema tome, potrebna su daljnja istraživanja mehanizama djelovanja na faktore virulencije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 15 grafičkih prikaza i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Antifungalni učinak, Candida albicans, oleuropein, hidroksitirosol

Mentor: **Dr. sc. Ivan kosalec**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Davor Šakić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Josipa Vlainić, *znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković.*

.

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Microbiology
Schrottova 39/I. floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INHIBITION OF CANDIDA ALBICANS VIRULATION FACTORS WITH OLEUROPEIN AND HYDROXYTYROSOL

Ivan Bobnjarić

SUMMARY

Candida albicans is an endogenous opportunistic yeast that does not cause infections in healthy individuals. However, disruption of the balance between microbiome and microorganism, the commensal form becomes pathogenic with clinical manifestation. The aim ofthis study was to determine the effect of oleuropein and hydroxytyrosol and their mechanism of action in *C. albicans in vitro.* Using the SQM approach for modulation ofergosterol synthesiswe found that oleuropein and hydroxytyrosol in concentrations below the MIC after 18 hours of incubation at 35 °C showed their interference in ergosterol biosynthesis pathway. The testing of the effect of hydroxytrosol and oleuropein on the inhibition of blastospore germination of *C. albicans* showed that after 3 hours of incubation at 37 °C oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the germination even in values below MIC affecting the cellular signal pathways (cAMP-PKA). The testing of inhibition of growth of filaments reveals that oleuropein and hydroxytyrosol after 3 hours of incubation at 37 °C inhibit the growth of filaments of *C. albicans* germinated cells even in sub-MIC concentrations. Oleuropein and hydroxytyrosol are extremely interesting molecules for further research into mechanisms of antifungal activity, but also for possible synergistic effect with antimycotics. Therefore, further research into mechanisms of action on virulence factors is required.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 15 figures and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: antifungal activity, Candida albicans, oleuropein, hydroxytyrosol

Mentor: **Ivan Kosalec**, **Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Ivan Kosalec**, **Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Davor Šakić, **Ph.D.** *Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Josipa Vlainić, **Ph.D.** *Scientific associate, Ruđer Bošković Institute*

The thesis was accepted: September 2017.