



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET

## **UTICAJ PROBIOTSKOG KVASCA**

*Saccharomyces boulardii* NA ADHEZIJU *Candida glabrata*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Siniša Dodić

Prof. dr Peter Raspor

Kandidat:

MSc Zorica Tomičić

Novi Sad, 2018

## **Zahvalnica**

*Neizmernu zahvalnost na ukazanom poverenju, dragocenim savetima, posvećenom vremenu i razumevanju dugujem mentoru Prof. dr Peter Rasporu koji je strpljivo od prvog dana svojim znanjem i idejama usmeravao moj rad na disertaciji, kao i celokupan istraživački rad, pružajući iskrenu, prijateljsku podršku. Iskreno se zahvaljujem mentoru Prof. dr Siniši Dodić na stručnim i prijateljskim savetima, kao i na velikoj podršci i pomoći od samog početka naše saradnje.*

*Članovima komisije Prof. dr Jovani Grahovac i Prof. dr Dragiši Savić se zahvaljujem na korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Juretu Zupan na prijateljskoj i uspešnoj saradnji, zalaganju, korisnim savetima i znanju koje mi je nesebično preneo. Takođe, zahvaljujem se Prof. dr Neži Čadež za sojeve kvasaca iz Zbirke industrijskih mikroorganizama. Najlepše hvala svim kolegama na Katedri za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane Biotehničkog fakulteta u Ljubljani na prijateljskoj atmosferi i lepim trenucima.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Jovanki Lević na dragocenim savetima, ukazanom poverenju i podršci, a pre svega na izuzetnim prilikama koje mi je pružila i koje su uticale ne samo na moj profesionalni, nego i lični razvoj. Takođe se zahvaljujem svojim kolegama sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije na podršci i pomoći.*

*Svojoj porodici dugujem neizmernu zahvalnost na ljubavi, podršci i razumevanju.*

## SADRŽAJ

<b>SPISAK TABELA</b>	<b>VI</b>
<b>SPISAK SLIKA</b>	<b>VII</b>
<b>SPISAK PRILOGA</b>	<b>IX</b>
<b>SPISAK SKRAĆENICA</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Karakteristike kvasaca.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Rast.....	4
2.1.2 Struktura i funkcija ćelijskog zida.....	6
<b>2.2 Infekcije koje uzrokuje patogeni kvasac <i>Candida glabrata</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Faktori virulencije.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Adhezija.....	9
2.3.2 Hidrolitički enzimi.....	10
2.3.3 Sposobnost formiranja biofilma.....	11
<b>2.4 Mogućnosti suzbijanja rasta kvasca <i>Candida glabrata</i>.....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Konvencionalni postupci.....	13
2.4.1.1 Polieni.....	14
2.4.1.2 Azoli.....	15
2.4.1.3 Analози pirimidina.....	17
2.4.1.4 Ehinokandini.....	17
2.4.1.5 Rezistencija biofilma na antimikrobne lekove.....	17
2.4.2 Alternativni pristup.....	18
2.4.2.1 Definicija probiotika.....	18
2.4.2.2 Probiotski kvasac <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	20
2.4.2.3 Mehanizmi delovanja probiotskog kvasca <i>Saccharomyces boulardii</i> i praktična upotreba.....	22

<b>3 CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Cilj istraživanja.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Hipoteze istraživanja.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Šema rada.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Materijal.....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Kulture mikroorganizama.....	26
4.2.2 Mikrobiološki medijumi.....	27
4.2.3 Reagensi i rastvori za rad sa kvascima.....	29
4.2.4 Laboratorijski materijal i oprema.....	30
<b>4.3 Metode.....</b>	<b>32</b>
4.3.1 Revitalizacija mikroorganizama.....	32
4.3.2 Priprema inokuluma.....	32
4.3.3 Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti antimikotika <i>in vitro</i> .....	33
4.3.4 Određivanje sposobnosti adhezije sojeva kvasaca metodom kristal violet.....	34
4.3.5 Određivanje hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasca <i>Candida glabrata</i> – MATH test.....	36
4.3.6 Statistička obrada rezultata.....	37
<b>5 REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Kavantitativno određivanje adheriranih ćelija sojeva kvasca <i>Candida glabrata</i>     na polistiren površinu.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Određivanje hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasca <i>Candida glabrata</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Razvoj metode merenja adhezije ko-kulture kvasaca <i>Saccharomyces boulardii</i> i     <i>Candida glabrata</i> i njena validacija.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4 Uticaj temperature na adheziju ko-kulture kvasaca <i>Saccharomyces boulardii</i> i     <i>Candida glabrata</i> na polistiren površinu.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5 Uticaj pH na adheziju ko-kulture kvasaca <i>Saccharomyces boulardii</i> i     <i>Candida glabrata</i> na polistiren površinu.....</b>	<b>48</b>
<b>5.6 Antimikrobna aktivnost antimikotika na sojeve kvasca <i>Candida glabrata</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>5.7 Uticaj antimikotika na adheziju ko-kulture kvasaca <i>Saccharomyces boulardii</i> i     <i>Candida glabrata</i> na polistiren površinu.....</b>	<b>52</b>
<b>5.8 Interakcija kvasca <i>Candida glabrata</i> sa drugim vrstama mikroorganizmima u     ko-kulturi.....</b>	<b>54</b>

<b>6 ZAKLJUČAK.....</b>	<b>57</b>
<b>7 LITERATURA.....</b>	<b>59</b>
<b>8 PRILOZI.....</b>	<b>73</b>

## SPISAK TABELA

<b>Tabela 1.</b> Oznaka i poreklo sojeva vrste <i>C. glabrata</i> korišćenih u ispitivanju.....	27
<b>Tabela 2.</b> Čvrsti i tečni medijumi korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima i probiotskim bakterijama.....	28
<b>Tabela 3.</b> Reagensi i rastvori korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima i probiotskim bakterijama.....	29
<b>Tabela 4.</b> Laboratorijski materijal korišćen u eksperimentalnom radu.....	30
<b>Tabela 5.</b> Laboratorijska oprema korišćena u eksperimentalnom radu.....	31
<b>Tabela 6.</b> Granične vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za određene antimikotike prema kriterijumima CLSI (CLSI, 2008).....	34
<b>Tabela 7.</b> Prikaz vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) ispitivanih antimikotika u $\mu\text{g/ml}$ , određenih za 48 sojeva vrste <i>C. glabrata</i> . Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina četiri ponavljanja.....	50
<b>Tabela 8.</b> Adhezija patogenog kvasca <i>C. glabrata</i> u ko-kulturi sa drugim vrstama kvasaca i probiotskih bakterija na 37 °C. Vrednosti predstavljaju apsorbance na 584 nm nakon 24 h adhezije korišćenjem kristal violet testa. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja u ko-kulturi je iznosila $1 \times 10^7$ ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost $\pm$ standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.....	55

## SPISAK SLIKA

<b>Slika 1.</b> Kvasac (A), pseudohifalni (B), i hifalni (C) morfološki oblici vrste <i>C. albicans</i> (Sudbery i sar., 2004).....	4
<b>Slika 2.</b> Oblici rasta vrste <i>C. glabrata</i> . (A) <i>C. glabrata</i> ATCC2001 soj divljeg tipa nakon rasta na YPD pločama na 37 °C preko noći formira male, bele, sjajne kolonije koje se sastoje od pojedinačnih ćelija kvasaca. (B) Nakon rasta na SLAD pločama na 37 °C tokom pet dana, <i>C. glabrata</i> ATCC2001 soj divljeg tipa proizvodi pseudohife na obodu kolonije (Csank i Haynes, 2000).....	5
<b>Slika 3.</b> Struktura ćelijskog zida roda <i>Candida</i> (Gow i sar., 2011).....	7
<b>Slika 4.</b> Faze razvoja biofilma roda <i>Candida</i> .....	12
<b>Slika 5.</b> Prikaz formiranog biofilma vrste <i>C. glabrata</i> na plastičnim kuponima u YPD medijumu na 37 °C (A); na najvećem uvećanju, rezidualni ekstracelularni polimerni materijal je vidljiv (B) (Iraqi i sar., 2005).....	13
<b>Slika 6.</b> Strukturna formula amfotericina B, polienskog antimikotika (preuzeto sa <a href="http://www.chemicalbook.com">www.chemicalbook.com</a> ).....	14
<b>Slika 7.</b> Strukturna formula azolnih antimikotika (preuzeto sa <a href="http://www.chemicalbook.com">www.chemicalbook.com</a> ).....	16
<b>Slika 8.</b> Karakteristike probiotskih sojeva.....	19
<b>Slika 9.</b> Skening elektron mikroskopska slika probiotskog kvasca <i>S. boulardii</i> (A). Slepo crevo miša 3h nakon unosa 30 mg <i>S. boulardii</i> (B) (Czerucka i Rampal, 2002).....	21
<b>Slika 10.</b> Hodogram eksperimenata.....	25
<b>Slika 11.</b> Šematski prikaz brojanja ćelija s hemocitometrom po Bürker-Türk (Doyle i Griffiths, 1999).....	33
<b>Slika 12.</b> Mikrotitar ploča nakon dodavanja kristal violeta.....	36
<b>Slika 13.</b> Ispitivanje sposobnosti adhezije 48 sojeva vrste <i>C. glabrata</i> na polistiren površinu nakon 24 h inkubacije na 37 °C. Podaci predstavljaju srednju vrednost ± srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.....	39
<b>Slika 14.</b> Korelacija između hidrofobnosti površine ćelije (MATH test) i adhezije na polistiren (kristal violet test) sojeva vrste <i>C. glabrata</i> na 37 °C. Veličina inokuluma je $2 \times 10^7$ ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost ± srandomna devijacija tri nezavisna ponavljanja.....	40
<b>Slika 15.</b> Uticaj koncentracije inokuluma na količinu adheriranih ćelija kvasca <i>C. glabrata</i> ZIM 2369 nakon 24 h adhezije. Podaci predstavljaju srednju vrednost ± srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.....	42

- Slika 16.** Validacija testa ahezije ko-kulture patogenog kvasca *C. glabrata* i probiotskog kvasca *S. boulardii* na polistiren. Ispitivanje uticaja različitih koncentracije inokuluma probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju ko-kulture pri fiksnim koncentracijama inokuluma kvasca *C. glabrata*. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.....43
- Slika 17.** Validacija testa ahezije ko-kulture patogenog kvasca *C. glabrata* i probiotskog kvasca *S. boulardii* na polistiren. Ispitivanje uticaja različitih koncentracije inokuluma probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju ko-kulture pri recipročnim koncentracijama inokuluma kvasca *C. glabrata*. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.....45
- Slika 18.** Ispitivanje uticaja temperature rasta na adheziju ko-kulture kvasca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Zvezdica obeležava značajne razlike između adhezije pojedinačne kulture i ko-kulture za svaku temperaturu i soj, dok slova a i b označavaju značajnu razliku između adhezije ko-kultura na različitim temperaturama, posebno za svaki soj.....47
- Slika 19.** Ispitivanje uticaja pH na adheziju ko-kulture kvasca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren pri temperaturi od 37 °C. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Zvezdica obeležava značajne razlike između adhezije pojedinačne kulture i ko-kulture za svaki pH i soj, dok slova a i b označavaju značajnu razliku između adhezije ko-kultura na različitim pH vrednostima, posebno za svaki soj.....48
- Slika 20.** Ispitivanje uticaja antimikotika na adheziju ko-kulture kvasca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren pri temperturi od 37 °C. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  srandomna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Pojedinačna kultura (puna linija); ko-kultura (isprekidana linija)...52



## SPISAK PRILOGA

<b>Prilog A.</b> Optimizacija starosti kulture na MEA pločamaza test adhezije ko-kulture kvasaca <i>Saccharomyces boulardii</i> i <i>Candida glabrata</i> .....	73
<b>Prilog B1.</b> Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije antimikotika flukonazola ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	73
<b>Prilog B2.</b> Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije antimikotika amfotericina B i itrakonazola ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	74

## SPISAK SKRAĆENICA

AIDS	eng. „Acquired Immune Deficiency Syndrome“
Als	eng. „agglutinin-like sequence“
ATCC	eng. „American Type Culture Collection“
CLSI	eng. „Clinical and Laboratory Standards Institute“
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ECM	ekstracelularni matriks
EGF	eng. „Epidermal growth factor“
EPA	eng. „Epithelial Adhesin“
FAO	eng. „Food and Agriculture Organization“
FLO	eng. „flocculation“ genes
GI	gastrointestinalni trakt
GPI	glikozil-fosfatidilinozitol
HIV	eng. „Human Immunodeficiency Virus“
Hwp	eng. „Hyphal wall protein“
IgA	imunoglobulin A
MEA	čvrsti medijum Malt Extract Agar
MEB	tečni medijum Malt Extract Broth
MIC	eng. „Minimal Inhibitory Concentration“
MOPS	3-(N-Morfolino) propansulfonska kiselina
NaCl	natrijum hlorid
PBS	fiziološki rastvor puferisan fosfatom
Pir	eng. „predicted proteins with internal repeats“
RAPD	Rapid Amplified Polymorphic DNA
RNK	ribonukleinska kiselina
RPMI	tečni medijum Roswell Park Memorial Institute
Sap	eng. „aspartic proteinases“
SDA	čvrsti medijum Sabouraud dextrose broth
SLAD	tvrdi medijum Synthetic Low Ammonia Dextrose
spp.	species, vrste
SZO	Svedska Zdravstvena Organizacija
TSA	čvrsti medijum Tryptic Soy Agar
WHO	eng. „World Health Organization“
YNB	tvrdi medijum Yeast Nitrogen Base
YPD	tečni medijum Yeast Peptone Dextrose
ZIM	Zbirka Industrijskih Mikroorganizama

## 1 UVOD

Sa konstantnim rastom svetske populacije, starenjem stanovništva, povećanom upotrebom antimikrobnih terapija širokog spektra, imunosupresivnih i hemoterapeutskih agenasa se povećava incidencija infekcija uzrokovanih oportunističkim patogenima.

Vrsta *Candida albicans* je najčešći, ali ne i jedini uzročnik kandidijaza čija klinička slika može varirati od blagih površinskih infekcija do životno ugrožavajućih sistemskih bolesti. Broj infekcija uzrokovanih ne-*albicans* *Candida* vrstama je u porastu proteklih godina. Vrsta *Candida glabrata* je drugi najčešći uzročnik kandidijaza i povezana je sa visokom stopom smrtnosti kod imunokompromitovanih pacijenata. Ova pojava se prepisuje selekciji manje osetljivih sojeva kvasca *C. glabrata* širokom upotrebom flukonazola kao profilaktika i terapeutika. U lečenju infekcija uzrokovanih kvascem *C. glabrata* se koriste antimikotici iz grupe azola, ehinokandina i poliena. Njihova terapijska primena je ograničena kod nekih grupa pacijenata zbog visokog stepena toksičnosti i porasta broja rezistentnih sojeva vrste *C. glabrata*.

Jedan od najvažnijih faktora virulencije kvasca *C. glabrata* je sposobnost adherencije na tkiva domaćina i abiotičke površine, i uspostavljanje procesa kolonizacije i formiranje biofilma. Biofilmovi predstavljaju ozbiljan klinički problem jer povećavaju rezistentnost prema antifungalnoj terapiji i štite ćelije unutar biofilma od imunskog odgovora domaćina.

Povećana rezistentnost patogenih sojeva kvasca *C. glabrata* na klasične antimikotike, je stimulisala napore da se otkriju novi agensi za prevenciju i lečenje sve većeg broja infekcija izazvanih ovim patogenom. Tokom poslednjih nekoliko godina se u velikoj meri razmatra potencijalni benefit probiotskih mikroorganizama na zdravlje ljudi. Pored primene brojnih probiotskih bakterija, *Saccharomyces boulardii* je jedina vrsta kvasca za koju je dokazano da poseduje svojstva koja karakterišu probiotike. *S. boulardii* je nepatogeni, termofilni kvasac, koji se koristi u prevenciji i lečenju crevnih oboljenja, uglavnom dijareja. Ova vrsta se odlikuje sposobnošću prolaska kroz gastrointestinalni trakt i deluje inhibitorno na brojne patogene mikroorganizme. Veliki broj kliničkih studija posvećen je ispitivanju uticaja probiotskog kvasca *S. boulardii* na bakterijske patogene, međutim benefit primene *S. boulardii* u slučaju infekcija uzrokovanih patogenim kvascem *C. glabrata* još uvek nije ispitan.

## 2 PREGLED LITERATURE

Incidencija infekcija uzrokovanih vrstama roda *Candida* (kandidijaza) je u značajnom porastu proteklih godina (Silva i sar., 2012). Razlog visoke prevalencije je upotreba antibiotika šitokog spektra, imunosupresivnih i hemoterapeutskih lekova, kao i povećan broj invazivnih hiruških procedura, kao što je transplatacija organa (Silva i sar, 2011). Vrsta *C. glabrata* je drugi najčešći uzročnik kandidijaza posle *C. albicans*. Učestalost sistemskih infekcija uzrokovanih *C. glabrata* zaslužuje veliku zabrinutost zbog visoke stope smrtnosti kod imunokompromitovanih pacijenata i sklonosti ovog mikroorganizma da razvija rezistentnost na antimikotike iz grupe azola, posebno flukonazol (Fidel i sar, 1999; Sanguinetii i sar, 2005). Vrsta *C. glabrata* poseduje primarnu (genetsku) i sekundarnu (stečenu) rezistenciju na antigljivične lekove zbog sposobnosti da modifikuje biosintezu ergosterola, mitohondrijalnu funkciju, ili antigljivični efluks (Li i sar, 2007).

Patogeneza kvasca *C. glabrata* je posredovana brojnim faktorima virulencije, od kojih su najvažniji sposobnost adhezije na tkiva domaćina i medicinska sredstava, formiranje biofilma i sekrecija hidrolitičkih enzima (Silva i sar., 2011). Formiranje biofilma nosi važne kliničke posledice zbog povećane rezistentnosti na antimikotike i sposobnosti ćelija unutar biofilмова da izdrže imunski sistem domaćina (Ramage i sar., 2006). Iako mehanizam rezistencije na antimikotike nije u potpunosti jasan jedna od hipoteza tvrdi kako prisutnost matriksa u biofilmu ograničava prodiranje lekova (Al-Fattini i Douglas, 2004), zbog koje su samo površinski slojevi membrane u direktnom kontaktu s letalnim dozama antimikotika. Prema tome, infekcija povezana sa stvaranjem biofilma, izuzetno je teška za lečenje. Na formiranje biofilma utiču faktori sredine kao što su sastav medijuma, pH i temperatura. Kod mnogih patogenih gljiva, pH se smatra važnim faktorom u adheziji na tkiva domaćina. U okviru ljudskog organizma vrsta *C. glabrata* pokriva širok opseg pH vrednosti od kiselog pH u želucu i vagini kroz neutralni i blago bazni u krvotoku i mnogim organima (Bairwa i Kaur, 2011; Ullah i sar, 2013). Sposobnost rasta na temperaturama tipičnim za ljudsku groznicu (37-39 °C) je veoma važna osobina virulencije patogena.

Hidrofobnost površine ćelije igra važnu ulogu u procesu adhezije, jer površinski proteini tzv. adhezini ćelijskog zida roda *Candida* obezbeđuju neophodne interakcije za njihovo vezivanje na različite površine (Hazen i Hazen, 1988). Predhodne studije su pokazale pozitivnu korelaciju između adhezije na plastične površine i hidrofobnosti površine ćelija među vrstama roda *Candida* (Klotz i sar., 1985; Hazen, 1986).

Interes za primenu probiotskih mikroorganizama u svrhu održavanja zdravlja i prevencije bolesti ili pak lečenja je u ekspanziji tokom poslednjih nekoliko godina. Probiotici su živi mikroorganizmi koji primenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljan uticaj na zdravlje, poboljšavajući ravnotežu crevne mikroflore. Pored primene brojnih probiotskih bakterija, među kojima su najčešće korišćene vrste rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Snydman, 2008), *S. boulardii* je jedina vrsta kvasca za koju je dokazano da poseduje svojstva koja karakterišu probiotike. Probiotski kvasac *S. boulardii* je veoma efikasan kao bioterapeutski agens za prevenciju i lečenje nekoliko gastrointestinalnih poremećaja kod ljudi kao što su dijareja, infekcije izazvane *Helicobacter polyori*, Kronova bolest, ulcerozni kolitis, itd. (Zanello i sar., 2009; Penna i sar., 2000). Jedan od razloga veoma uspešne i raširene primene *S. boulardii* je pojava antimikrobne rezistencije patogenih bakterija u slučajevima terapije sa antibioticima. S tim u vezi, pripodna rezistencija kvasaca na antibiotike je jedan od glavnih argumenata za njihovu primenu u slučaju terapije pacijenata sa antibioticima (Czerucka i sar., 2007). Glavni mehanizam delovanja probiotskog kvasca *S. boulardii* je najverovatnije njegova sposobnost da ometa kolonizaciju patogena na sluzokožu i na taj način sprečava infekciju. Drugi mehanizmi obuhvataju regulaciju crevne homeostaze, modulaciju lokalnog i sistemskog imunskog odgovora, stabilizaciju funkcije crevne barijere i indukciju enzimske aktivnosti (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

Veliki broj kliničkih studija posvećen je ispitivanju uticaja probiotskog kvasca *S. boulardii* na bakterijske patogene, međutim malo je poznato o njegovom uticaju na patogene vrste roda *Candida*. Nekoliko predhodnih studija je pokazalo da prisustvo ćelija *S. boulardii* i njihov ekstrakt inhibiraju formiranje hifa, adheziju i formiranje biofilma kvasca *C. albicans* na plastične površine (Krasowska i sar., 2009; Murzyn i sar., 2010; Tomićić i sar., 2016b).

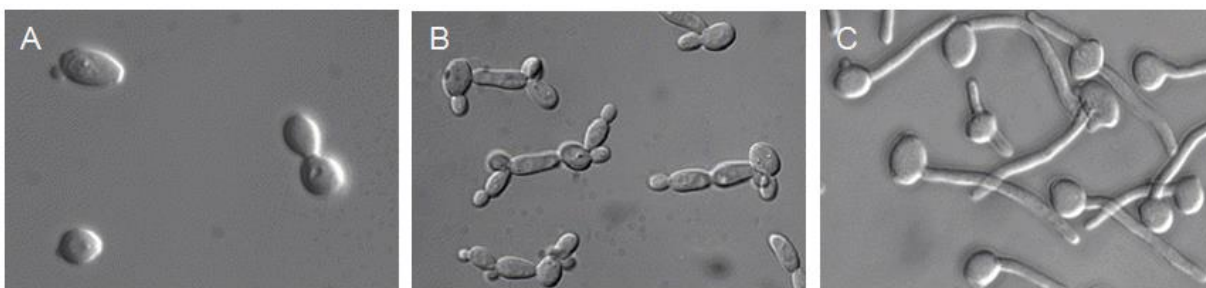
## 2.1 Karakteristike kvasaca

Kvasci predstavljaju grupu mikroorganizama koji po svojim morfološkim i fiziološkim osobinama pripadaju gljivama. Pored vrsta koje se koriste u brojnim aplikacijama u industriji, postoji broj patogenih kvasaca koji izazivaju bolesti kod ljudi, tzv. mikoze i kreću se od blagih hroničnih infekcija kože do akutnih hroničnih infekcija unutrašnjih organa i tkiva. Većina patogenih kvasaca ljudi i životinja pripada grupi "fungi imperfecti", koji se razmnožavaju bespolno pupljenjem. Važni rodovi patogenih kvasaca su *Candida*, *Cryptococcus*, *Malessezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* i u novije vreme *Saccharomyces* (Zupan, 2010). U zavisnosti od vrste i lokacije infekcije, mikoze mogu biti podeljene u 4 grupe: površinske (nokti, kosa), kožne (površina kože i sluznica), podkožne (epidermis) i sistemske (unutrašnji organi, vaskularni sistem, mozak) infekcije (Hay, 2006).

Vrste roda *Candida* sadrže polimorfne kvasce koji su taksonomski smešteni u porodicu *Saccharomycetaceae*. Rod obuhvata oko dve stotine vrsta, od kojih dvadesetak može uzrokovati infekcije kod životinja i ljudi. To su eukariotski, jednoćelijski, ovalni, izduženi ili okruglasti mikroorganizmi s blastosporama (blastokonidijama). Obično kolonizuju različita mesta na telu kao što su usna duplja, koža, gastrointestinalni i genitourinarni trakt, međutim mogu se naći i u okruženju (Fidel i sar., 1999; Wingard i Leather, 2004). Za rast ćelija kvasaca potrebni su makronutrijenti u milimolarnim količinama (izvor ugljenika, azota, kiseonika, sumpora, fosfora, kalijuma i magnezijuma), mikronutrijenti u mikromolarnim količinama (npr. Ca, Cu, Fe, Mn, Zn) kao i faktori rasta. Ovi faktori su organska jedinjenja koja su ćelijama potrebna u veoma malim koncentracijama za specifične katalitičke i strukturne potrebe, ali se ne koriste kao izvor energije. Vrste roda *Candida* rastu u širokom rasponu pH vrednosti od 2 do 8, temperature (25-37 °C) i kiseonika - aerobi do mikroaerofili (Walker, 2000).

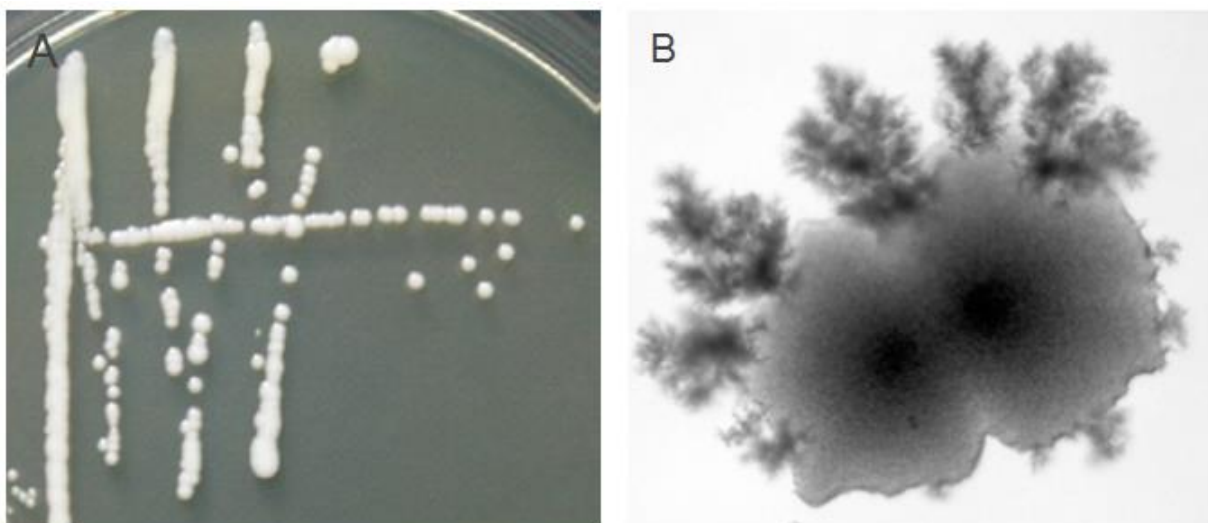
### 2.1.1 Rast

Gljivični patogeni imaju sposobnost da menjaju morfologiju ćelije. U okruženju se uglavnom nalaze u filamentoznoj formi, međutim većina patogena (*Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei* itd.) kod domaćina promeni morfologiju u oblik kvasca (Casalone i sar., 2005; Hay, 2006). Ova sposobnost konverzije morfologije naziva se dimorfizam. Vrsta *C. albicans* je gljivica koja se može razviti u nekoliko različitih morfoloških oblika (Slika 1), uključujući kvasac, pseudohife i hife. Sposobnost formiranja hifa se generalno smatra važnim faktorom virulencije zbog lakšeg prodiranja u tkivo, što *C. albicans* izdvaja među kvascima (Ahmad i sar., 2014; Gow i sar., 2002). Iako je vrsta *C. albicans* najvažniji uzročnik infekcija, druge vrste, kao što su *C. glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* i *Candida dubliniensis* su stekle klinički značaj i često se nazivaju ne-*albicans* *Candida* vrstama (Bassetti i sar., 2006; Pfaller i sar., 2010).



**Slika 1.** Kvasac (A), pseudohifalni (B), i hifalni (C) morfološki oblici vrste *C. albicans* (Sudbery i sar., 2004).

U poređenju sa drugim vrstama iz roda *Candida* koje imaju jedinstvenu sposobnost da formiraju pseudohife i samim tim pseudomicelijum pod povoljnim uslovima za rast (Bruke i Hube, 2013; Sudbery i sar., 2004), vrsta *C. glabrata* se javlja jedino u obliku kvasca i ne formira pseudohife na temperaturama iznad 37 °C, i jedina je među vrstama kvasaca koja nije dimorfna. U prošlosti je bila svrstana u rod *Torulopsis* upravo zbog tih svojstava. Od ostalih vrsta roda *Candida* se takođe razlikuje po tome, što se u prirodi nalazi samo u haploidnom obliku, dok je većina ostalih diploidna. Pod standardnim laboratorijskim uslovima (npr. na YPD, YNB ili Sabouraud pločama inkubiranim na 30 °C ili 37 °C) formira sjajne, glatke, bele do krem boje kolonije koje se relativno ne razlikuju od drugih vrsta roda *Candida* osim po veličini, koja je znatno manja. Blastokonidije su ovalne, 1-4 µm u prečniku, i nema razlike između komensalnih i patogenih oblika ove vrste kvasca. Međutim, kada se uzgaja na SLAD (*synthetic low ammonia dextrose*) pločama usled nedostatka azota, gljivica je sposobna da formira pseudohife (Slika 2) (Fidel i sar., 1999; Csank i Haynes, 2000).



**Slika 2.** Oblici rasta vrste *C. glabrata*. (A) *C. glabrata* ATCC2001 soj divljeg tipa nakon rasta na YPD pločama na 37 °C preko noći formira male, sjajne kolonije koje se sastoje od pojedinačnih ćelija kvasaca. (B) Nakon rasta na SLAD pločama na 37 °C tokom pet dana, *C. glabrata* ATCC2001 soj divljeg tipa proizvodi pseudohife na obodu kolonije (Csank i Haynes, 2000).

Kultivacija na posebnim medijumima koji sadrže hromogeni supstrat omogućava razlikovanje vrste *C. glabrata* od drugih vrsta kvasaca u mešovitoj kulturi izolovanoj iz kliničkih uzoraka na osnovu boje i površine rastućih kolonija. Na CHROMagar, agar za identifikaciju različitih

vrsta roda *Candida* po boji kao rezultat biohemijskih reakcija, kolonije *C. glabrata* su roze do ljubičaste boje, u odnosu na kolonije *C. albicans* koje su zelene do plavo-zelene (Freydiere i sar., 2003). Kolonije *C. glabrata* su slične kolonijama mnogih drugih vrsta iz roda *Candida*, stoga je za identifikaciju potrebno uraditi dodatne biohemijske testove.

U mnogim laboratorijama za takvu namenu se često koriste dva takva testa: API Candida i ID 32C (bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France). Oba testa su pouzdana pri identifikaciji relativno često izolovanih gljiva iz kliničkih uzoraka. Procenat ispravnosti identifikacije se kreće od 68 % do 98 % (Fricker-Hidalgo i sar., 1996; Ramani i sar., 1998). Ovaj procenat može biti veći, ukoliko u identifikaciju uključimo i dodatne testove kao što je na primer posmatranje morfologije na kukuruznom agaru. Na kukuruznom agaru posmatramo prisustvo micelijuma, pseudomicelijuma, formiranje hlamidospora i drugih struktura, koje su specifične za određenu gljivičnu vrstu (Pincus i sar., 2007).

### 2.1.2 Struktura i funkcija ćelijskog zida

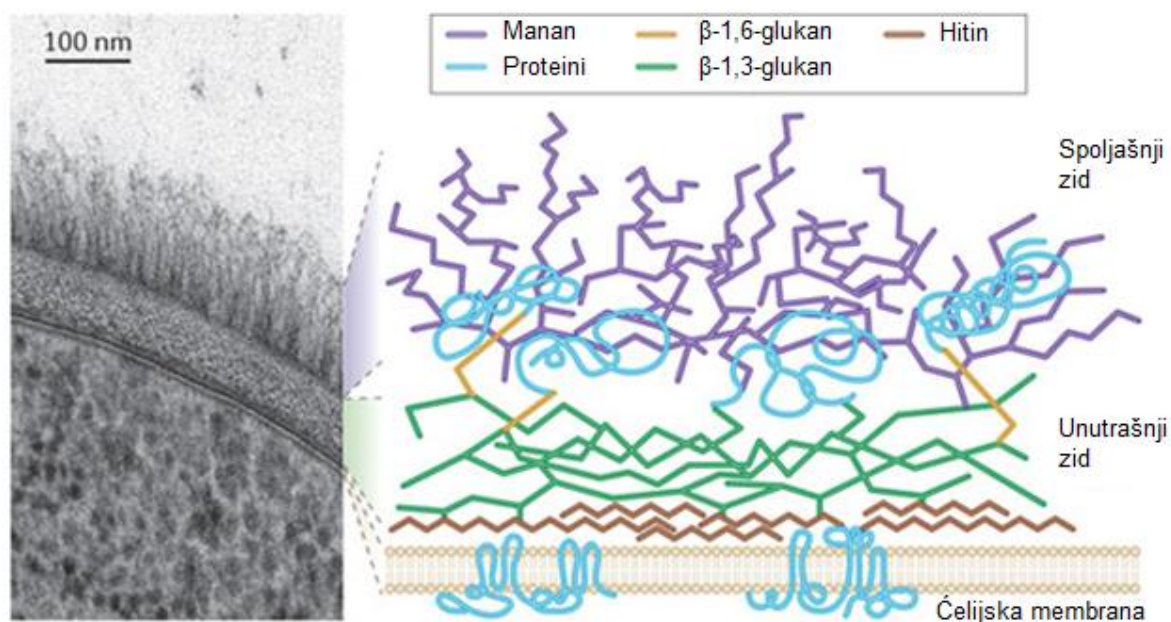
Ćelijski zid kvasaca (Slika 3) je dinamična struktura, koja kvascu omogućuje preživljavanje u stresnim uslovima, daje mu čvrstoću i određuje oblik, te osigurava osmotsku stabilnost budući da predstavlja selektivnu barijeru kroz koju različiti molekuli ulaze i izlaze iz ćelije (Gow i sar., 2011). To je višeslojna struktura, 100-400 nm debljine, što predstavlja četvrtinu suve mase ćelije. Glavne komponente ćelijskog zida su ugljeni hidrati od 80 do 90 %, proteini od 6 do 25 % i lipidi od 1 do 7 % (Chaffin i sar., 2008; Kollar i sar., 1997). Mehaničku i osmotsku stabilnost mu daje unutrašnji sloj koji je građen od polisaharida  $\beta$ -1,3-glukana (50 %),  $\beta$ -1,6-glukana (5 %), i iz hitina (1-2 %).

$\beta$ -1,3-glukan je dugolančani polimer glukoze koji nastaje povezivanjem oko 1500 glukoznih jedinica u lance. Sintetiše se prvi prilikom sinteze ćelijskog zida nakon čega se, na formirani glukanski sloj, kovalentno vežu  $\beta$ -1,6-glukan i hitin. Lanci  $\beta$ -1,3-glukana formiraju helikoidnu strukturu čime se osigurava čvrstoća i osmotska stabilnost ćelijskog zida (Gow i sar., 2011). Na spoljašnjoj strani mreže  $\beta$ -1,3-glukana su pronađeni visoko razgranati, u vodi rastvorljivi lanci  $\beta$ -1,6-glukana na koje mogu biti kovalentno vezani i manoproteini preko ostatka glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) sidra.  $\beta$ -1,6-glukan iako ga ima malo je vrlo važan zbog unakrsnog povezivanja komponentata ćelijskog zida. Na unutrašnjoj strani  $\beta$ -1,3-glukanske mreže vežu se hitinski lanci, ali tek nakon citokineze. Isto tako, hitin može biti vezan i na  $\beta$ -1,6-glukanske lance, pogotovo kao odgovor na mehanički stres kojem je podvrgnut ćelijski zid. Hitin je linearni polimer N-acetil-D-glukozamina koji pokriva ćelijsku membranu. Na mestu pupljenja



a naročito u ćelijskom zidu filamentoznih gljiva je prisutan u znatno većem udelu (Klis i sar., 2001; Ruiz-Herrera i sar., 2006).

Manan je razgranati polisaharid manoze koji čini ugljenohidratni deo manoproteina smeštenih u spoljašnjem sloju ćelijskog zida (Chaffin i sar., 2008; Klis i sar., 2006). Manoproteini su proteini na koje su kovalentno vezani ugljenohidratni lanci u procesu postsintetske glikozilacije. Razlikuju se po tipu glikozilacije pa tako mogu imati N-glikozilirane asparaginske ostatake ili O-glikozilirane serinske i/ili treoninske ostatake. Oba tipa glikozilacije su neophodna za rast ćelija kvasca jer poremećaji u procesima glikozilacije deluju letalno na ćeliju (Ruiz-Herrera i sar., 2006; Klis i sar., 2001).



**Slika 3.** Struktura ćelijskog zida roda *Candida* (Gow i sar., 2011).

Spoljašnji sloj ćelijskog zida je uglavnom građen od manoproteina koji zauzimaju 35 % suve mase zida, a u zidu se mogu vezati kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama. Do sada je otkriveno više od 30 proteina za koje je pokazano da njihovo pojedinačno uklanjanje iz ćelijskog zida nema veliki uticaj na osmotsku stabilnost niti promenu oblika ćelije (Klis i sar., 2006). Poznato je da određuju površinska svojstva ćelije kao što su hidrofobnost i električni naboj i imaju brojne veoma značajne funkcije, neki omogućuju komunikaciju između ćelije i molekula u okolini, snabdevanje nutrijentima, te pomažu vezanje na druge ćelije kao u

procesima flokulacije, formiranja biofilma i aglutinacije. Drugi imaju strukturalnu ulogu, omogućuju unakrsno povezivanje jer se mogu vezati i na glukane i na manane (Ruiz-Herrera i sar., 2006; Klis i sar., 2001). Osim toga, neki od manoproteina su i adhezini, proteini bitni za kontakt između ćelija tokom formiranja biofilma.

Analizom manoproteina ustanovljene su razlike u vezivanju na glukanski sloj ćelijskog zida pa se prema tome dele u dve grupe. Prvu grupu čine proteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj, to su: i) GPI proteini koji se preko glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) ostatka vežu za  $\beta$ -1,6-glukan i ii) Pir proteini (*predicted proteins with internal repeats*) koji se s  $\beta$ -1,3-glukanom povezuju preko specifičnog glutaminskog ostatka unutar karakteristične ponavljajuće sekvence. Drugu grupu proteina čine nekovalentno vezani proteini i mogu biti vezani sa drugim proteinima disulfidnim mostovima (De Groot, 2008; Klis i sar., 2006).

## 2.2 Infekcije koje uzrokuje patogeni kvasac *Candida glabrata*

Vrste roda *Candida* su sposobne da izazivaju brojne infekcije, od površinskih do opasnih po život sistemskih infekcija. Sistemske infekcije izazvane oportunističkim patogenima se najčešće javljaju kod ljudi sa oslabljenim imunskim sistemom, koji su zbog toga podložniji infekcijama. Primeri takvih stanja su pacijenti oboleli od AIDS-a, oni koji su na terapiji imunosupresivima, te oboleli od karcinoma. Kvasac *C. glabrata* je oportunistički ljudski patogen od velikog značaja i drugi najčešći uzročnik kandidijaze posle *C. albicans*. Učestalost sistemskih infekcija uzrokovanih vrstom *C. glabrata* zaslužuje veliku zabrinutost zbog visoke stope smrtnosti kod imunokompromitovanih pacijenata i sklonosti ovog mikroorganizma da razvija rezistentnost na antimikotike iz grupe azola, posebno flukonazol (Kaur i sar., 2016; Malani i sar., 2005; Sanguineti i sar., 2005). Do sada, malo je poznato o virulenciji kvasca *C. glabrata* i mehanizmima odbrane domaćina protiv ovog patogena.

Često se smatra da infekcije uzrokovane vrstom *C. glabrata* proizilaze iz endogene mikroflore domaćina kao odgovor na bolest ili oslabljeni imunski sistem (Fidel i sar., 1999). Uprkos tome što se filogenetski razlikuju, kvasci *C. glabrata* i *C. albicans* izazivaju sličan opseg mikozijskih infekcija kao što je vaginitis kod inače zdravih žena, i teže površinske orofaringealne i ezofagusne kandidijaze kod HIV pacijenata. Nakon ulaska u krvotok javljaju se teške životno ugrožavajuće sistemske infekcije posebno među pacijentima na intenzivnoj nezi, naročito onih koji se podvrgavaju hemoterapiji i imunosupresivnoj terapiji nakon transplatacije organa i koštane srži (Fidel i sar., 1999; Sudbery i sar., 2004; Kaur i sar., 2005). Osim toga, mnoge infekcije vrsta roda *Candida* uključuju formiranje biofilmova na medicinskim implantantima

kao što su veštački srčani zalisci (valvule) i posebno kateteri, pa su stoga gotovo sigurno agenti nozokomijalne infekcije (Cauda, 2009; Ramage i sar., 2006).

## 2.3 Faktori virulencije

Zbog značajnog povećanja mikoza uzrokovanih vrstama roda *Candida*, istraživanja su usmerena prema utvrđivanju virulentnih faktora koji utiču na patogenost *Candida*. Naime, ta istraživanja bi pomogla u pronalasku novih metoda lečenja, odnosno pronalaženju novih antimikotika. To je važno i zbog sve veće pojave rezistentnih sojeva vrsta roda *Candida* u populaciji imunokompromitovanih pacijenata.

Patogeneza roda *Candida* uključuje mnoge faktore virulencije, od kojih su najbitniji oni koji su zaslužni za adherenciju na tkivo domaćina i medicinskih sredstava, formiranje biofilma i sekrecija hidrolitičkih enzima (npr. proteinaze, fosfolipaze i lipaze) (Silva i sar., 2011). Postupci transplantacije, imunosupresivne terapije, primena implantata i produženo zadržavanje u jedinici intenzivnog lečenja predstavljaju ozbiljne pretnje infekciji kandidom.

### 2.3.1 Adhezija

Jedan od najvažnijih faktora virulencije vrsta roda *Candida* je njihova sposobnost da adheriraju na tkiva domaćina kao i abiotičke površine, i uspostave proces kolonizacije i formiranje biofilma. Stoga adhezija je prvi bitan korak u procesu infekcije. Inicijalno prijanjanje kandidate uslovljeno je nespecifičnim faktorima (hidrofobne i elektrostatske sile) i potpomognuto je specifičnim adhezinama na površini gljivičnih ćelija koji prepoznaju ligande kao što su proteini, fibrinogen i fibronektin (Brugnoli i sar., 2007; Chaffin i sar., 2008). Adhezini kvasaca su glikoproteini površine ćelije bogati aminokiselinama kao što su serin i treonin. Najznačajnija i najbolje istražena grupa 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 i indukciji endocitoze (Nobile i Mitchell, 2006). U adhezine spadaju i neki proteini hifalnog zida Hwp, kao na primer Hwp1, koji omogućuje kovalentno vezanje za ćelije budući da se radi o supstratu transglutaminaza sa površine ćelija sisara (Mayer i sar., 2013; Nobile i sar., 2006). Glavna grupa adhezina vrste *C. glabrata* je kodirana od strane *EPA* (epitelni adhezini) genske familije. Uprkos velikom broju *EPA* gena, pokazano je da brisanje samo *EPAl* smanjuje adherenciju *in vitro*. Međutim, iako *EPA6* nije izražena *in vitro*, njeno ispoljavanje se povećava tokom *in vivo* urinarne infekcije, ukazujući

na to da je vrsta *C. glabrata* sposobna da se prilagodi različitim uslovima životne sredine. Celokupna struktura Epa proteina je slična Als (aglutinin – kao sekvenca) proteinima vrste *C. albicans* (Bruke i Hube, 2013; De Las Panas i sar., 2003; Iraqui i sar., 2005). Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* takođe kodira niz GPI adhezina kao što je *FLO* genska familija koja je zaslužna za ćelijsku adheziju (flokulacija) i adheziju na abiotičke površine (Verstrepen i Klis, 2006).

Količina gljivične adhezije može zavisiti i od površinskih svojstava mikroorganizma i abiotičkih površina, kao što je hidrofobnost, zeta potencijal i površinska hrapavost. Površinska hrapavost je u pozitivnoj korelaciji sa stopom gljivične kolonizacije biomaterijala, tako da neravna površina može da bude faktor rizika za adheziju mikroorganizama i formiranje biofilma (Ramage i sar., 2006).

### 2.3.2 Hidrolitički enzimi

Jedan od najznačajnijih faktora virulencije kandidate jesu hidrolitički enzimi koje izlučuje u ćelijsku okolinu usled i nakon adhezije za površinu sluznice. Njihove su uloge mnogobrojne – razgrađuju sluz koju luči sluznica, modifikuju površinu epitelnih i endotelih ćelija kako bi olakšali adheziju, te cepanjem proteina i lipida u ćelijskom okruženju obezbeđuju ćeliji hranu (Mayer i sar., 2013; Silva i sar., 2011). Najznačajnije su tri grupe hidrolitičkih enzima: aspartil-proteinaze (Sap proteinaze), fosfolipaze (PI fosfolipaze) i lipaze (Lip lipaze).

Deset aspartil proteinaza (Sap) su odgovorni za proteinaznu aktivnost vrste *C. albicans* i kodirane su *SAP1-10* genima. Prisustvo *SAP* gena je dokazano i kod drugih patogenih vrsta roda *Candida*, uključujući *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, i *C. guilliermondii*. Sap-ovi koje luče kandidate hidroliziraju *in vivo* kolagen, keratin, mucin, antitela i citokine, i na taj način učestvuju kao faktori virulencije vrsta roda *Candida*. Uloga *SAP1-6* gena povezana je s adherencijom, oštećenjem tkiva i promenom imunskog 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 ćelija (Naglik i sar., 2003).

Fosfolipaze (PI) su heterogena grupa enzima kojima je zajednička karakteristika hidroliza jedne ili više estarskih veza u glicerofosfolipidima. Prema mestima delovanja na molekulu fosfolipida kao supstrata, razlikujemo četiri klase PI fosfolipaza koje označavamo slovima (A, B, C i D), od kojih je samo pet iz klase B (PIb 1-5) vanćelijsko i značajno za virulentnost. Uloga ekstracelularnih fosfolipaza je razgradnja lipida za ishranu gljivica, adheziju na ćelije i tkivo domaćina, nespecifično pokretanje upalnih procesa delovanjem na imunske ćelije i

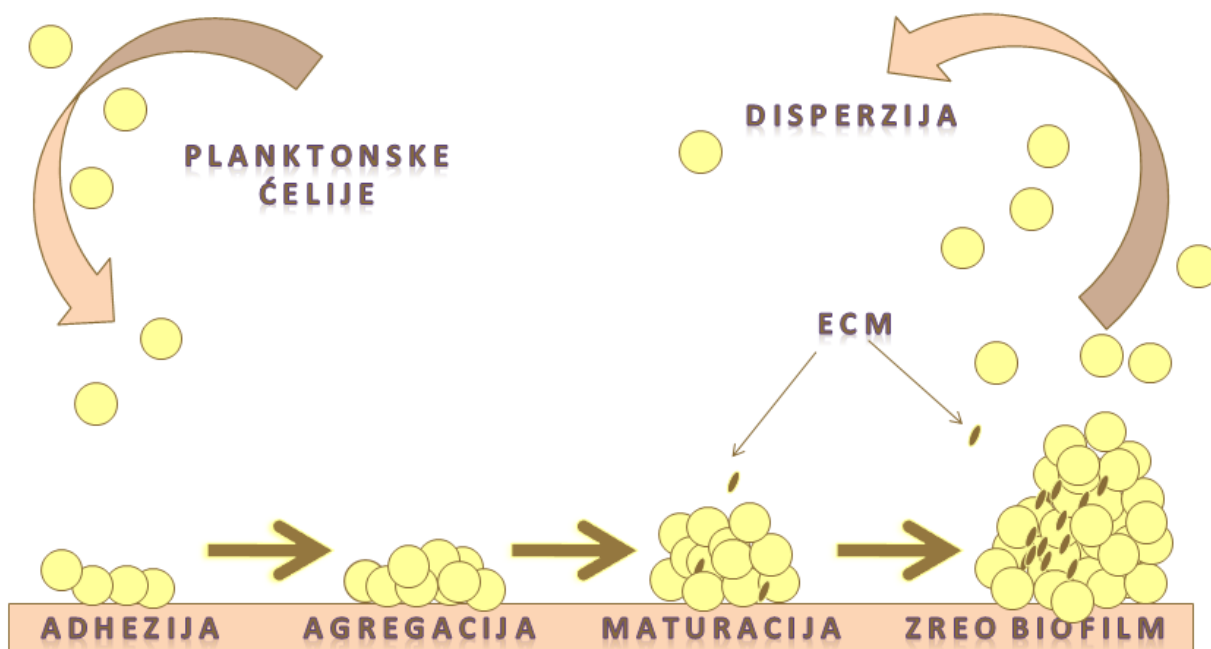
obrana liziranjem kompetitivne mikroflore (Schaller i sar., 2005). Lipaze karakteriše njihova sposobnost da katalizuju hidrolizu estarskih veza mono-, di- i triacilglicerola ili čak fosfolipida. Inhibitor lipaze značajno smanjuje oštećenje tokom infekcije rekonstituisanih ljudskih tkiva. Lipazama je takođe inhibirano formiranje biofilma i rast gljivica u medijumu bogatom lipidima (Gascer i sar., 2007).

### 2.3.3 Sposobnost formiranja biofilma

Biofilm je najčešći oblik mikrobnog rasta u prirodi, pruža zaštitu ćelijama od fizičkih faktora, promene pH, hemijskih napada, i nudi veće šanse za opstanak u okruženju nisko-hranljivih materija. Biofilm je danas definisan kao strukturna zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za supstrat i uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstance koju sami produkuju, a koji pokazuju izmenjeni fenotip usled promene brzine rasta i transkripcije gena koje ne uočavamo kod planktonskih organizama. Oko 80 % mikroorganizama živi u zajednici biofilma i 65-80 % ljudskih infekcija su vezane za biofilm (Donlan i Costerton, 2002; Douglas, 2003). Biofilm se često formira na biotičkim i abiotičkim površinama i u njegovom formiranju može učestvovati jedna ili više vrsta mikroorganizama. Većinski sastojak biofilma je voda (95 %), a ostatak predstavlja ekstracelularni matriks (ECM) (1-2 %) i mikroorganizmi (2-5 %). Ekstracelularni matriks, koji je u vidu gela, sastoji se od polisaharida, enzima, proteina i DNK i RNK molekula (Donlan i Costerton, 2002).

Razvoj biofilma roda *Candida* se odvija u četiri faze (Slika 4). Nakon početnog, reverzibilnog vezivanja planktonskih ćelija za površinu supstrata, sledi stvaranje stabilne veze posredovane adhezina, a potom proliferacija i kolonizacija površine u agregatima. Ćelije kandidate počinju rasti u slojevima, s tim da se spoljašnji sloj odnosno površina biofilma u nastajanju sastoji od ćelija koje su prešle u višecelijsku formu, dok se u unutrašnjosti biofilma zadržavaju ćelije u formi kvasca koje se nastavljaju deliti. Ćelije na površini biofilma luče velike količine materija (uglavnom glikoproteina i polisaharida) gradeći tako ekstracelularni matriks (ECM) biofilma koji deluje i kao dodatni fiksator i kao barijera, bilo za prilaz ćelijama imunskog sistema bilo za lekove, i stvara rezervoar za hranljive materije i otpadne produkte (Finkel i sar., 2011; Ramage i sar., 2006; Seneviratne i sar., 2008). Sistem odgovoran za maturaciju biofilma je sistem međućelijskih komunikacija takozvani "quorum sensing". Do sada su identifikovana dva quorum sensing molekula roda *Candida*, farnezol i tirozol (Alem i sar., 2006; Ramage i sar., 2002). Ova strategija međućelijske "cell-to-cell" komunikacije daje dobrobit biofilmu sprečavajući nepotrebnu prenaseljenost i kontroliše konkurenciju za hranljivim materijama; takođe ima značajne implikacije u procesu infekcije, posebno za širenje i uspostavljanje distalnih mesta infekcije (Nickerson i sar., 2006; Ramage i sar., 2002). „Quorum sensing“

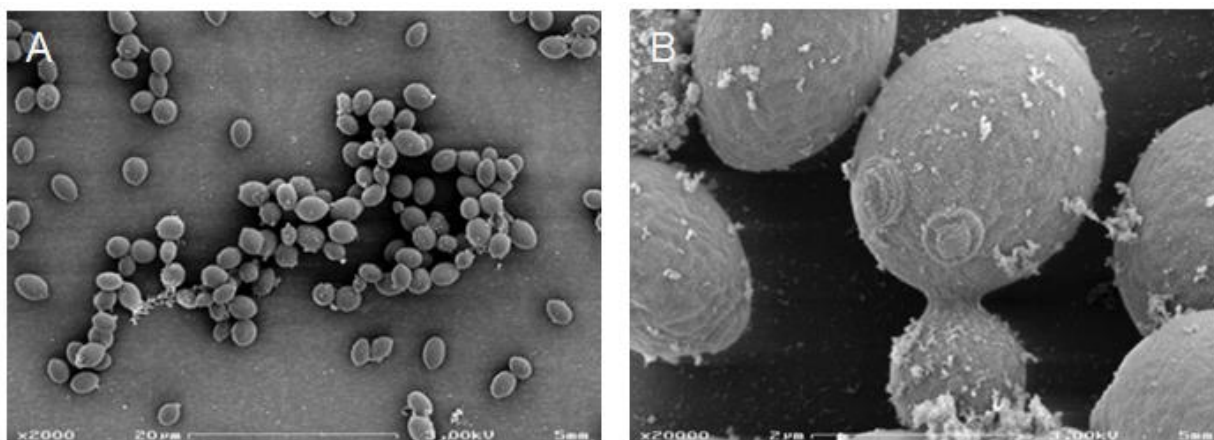
sistemi mogu regulisati aktivno odvajanje ćelija produkujući enzime koji raskidaju ekstracelularni polimerni matriks biofilma (Kruppa, 2009). U poslednjem koraku, ćelije disperguju iz biofilma sa mogućnošću da zaraze različite lokacije kod domaćina kao planktonske ćelije ili formiraju novi biofilm na nekoj drugoj lokaciji (Finkel i sar., 2011; Sadekuzzaman i sar., 2015).



**Slika 4.** Faze razvoja biofilma roda *Candida*.

U potpunoj suprotnosti sa biofilmovima formiranim kod većine vrsta roda *Candida*, biofilm vrste *C. glabrata* (Slika 5) se javlja samo kao zajednica površinski vezanih ćelija kvasaca zbog nesposobnosti *C. glabrata* da formira hife (Iraqi i sar., 2005). Abiotske površine u ljudskom telu kolonizovane kandidom uključuju centralne venske katetere, razne proteze i zubne implantate (Andes i sar., 2004, Nett i sar., 2010). Vrste roda *Candida* često formiraju biofilm na biotskim površinama u ljudskom telu, posebno na sluzokoži gastrointestinalnog trakta i vaginalnom epitelu (Dongari-Bagtzoglou i sar., 2009). 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 lekova (Kojic i Darouiche, 2004), zbog koje su

samo površinski slojevi membrane u direktnom kontaktu s letalnim dozama antimikotika. Biofilmovi pomažu gljivicama da zadrže patogenu ulogu izbegavajući imunske odgovore domaćina, odolevanju terapiji antimikoticima te opiranju kompetitivnom pritisku drugih organizama. Prema tome, infekcija povezana sa stvaranjem biofilma, izuzetno je teška za lečenje (Chandra i sar., 2001; Samaranyake, 2005).



**Slika 5.** Prikaz formiranog biofilma vrste *C. glabrata* na plastičnim kuponima u YPD medijumu na 37 °C (A); na najvećem uvećanju, rezidualni ekstracelularni polimerni materijal je vidljiv (B) (Iraqi i sar., 2005).

## 2.4 Mogućnosti suzbijanja rasta kvasca *Candida glabrata*

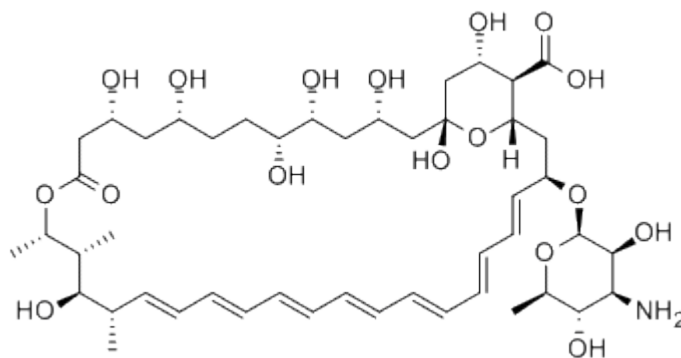
### 2.4.1 Konvencionalni postupci

Antigljivična sredstva koja su trenutno dostupna za lečenje sistemskih gljivičnih infekcija su grupisana, prema njihovom mestu delovanja u gljivičnim ćelijama, u četiri glavne klase: polieni, azoli, analozi pirimidina i najnovija klasa ehinokandina. Azoli, inače najčešći primenjivani u tretmanu kandidijaze, imaju fungistatično, ali ne i fungicidno dejstvo. U poslednjoj deceniji, povećan je broj kliničkih izolata otpornih na širok spektar antigljivičnih sredstava uglavnom izolovanih iz imunokompromitovanih i neutropenih pacijenata nakon produženog lečenja. Ovaj fenomen je postao ozbiljan medicinski problem sa širokim uticajem na društvo (Ashley i sar., 2006).

Rezistencija gljiva na antimikotike dovodi do neuspešnog lečenja gljivične infekcije, može da bude primarna (genetska) i sekundarna (stečena). Pod primarnom rezistencijom se podrazumeva otpornost koja je postojala i pre izlaganja gljive dejstvu određenog antimikotika, genetski je predodređena, a najčešće je posledica spontanijh mutacija. Sekundarna rezistencija gljiva se razvija tokom ili posle primene antimikotika, a rezultat je genotipskih i fenotipskih promena sastojaka gljiva pod dejstvom ovih lekova (Ghannoum i Rice, 1999; Kontoyiannis i Lewis, 2002).

### 2.4.1.1 Polieni

Polieni imaju u svojoj strukturi veliki makrolidni prsten sastavljen od ugljenikovih atoma. Amfotericin B (AmB) (Slika 6) je glavni predstavnik polienskih antimikotika. Otkriven je 50-ih godina prošlog veka i predstavlja prvi antigljivični lek koji je uveden u terapiju. Amfotericin B je makrolidni antibiotik - metabolički produkt *Streptomyces nodosus* (Jabra-Rizk i sar., 2004; Wingard i Leather, 2004). Ima kompleksnu hemijsku strukturu koju karakteriše veliki broj ugljenikovih atoma vezanih u prstenove. Mehanizam selektivnog delovanja amfotericina zasniva se na sposobnosti da veže ergosterol, glavni sterol u membrani gljivične ćelije, što dovodi do stvaranja pora u membrani kroz koje je raznim materijama i jonima omogućen neometan ulazak u i izlazak iz ćelije, krajnji efekat je fungicidan (Wingard i Leather, 2004). Najefikasniji je lek u terapiji teških sistemskih mikoza i predstavlja "zlatni standard" u odnosu na koji se poredi aktivnost drugih antigljivičnih lekova. Rezistencija se retko javlja. Međutim, izvestan stepen rezistencije na ovaj polien mogu da imaju ne-*albicans* *Candida* vrste, od kojih su najčešće vrste *C. glabrata* i *C. krusei* (Pfaller i sar., 2010). Česta toksičnost amfotericina B je glavno ograničenje u kliničkoj upotrebi. Lipidna formulacija amfotericina B je razvijena kako bi se obezbedila manja toksičnost (Wingard i Leather, 2004).



**Slika 6.** Strukturna formula amfotericina B, polienskog antimikotika (preuzeto sa [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com)).

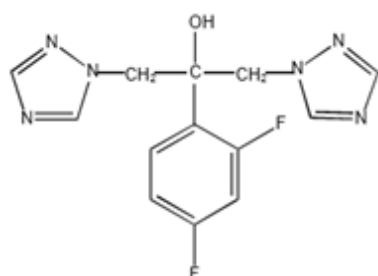


Nistatin je polienski makrolidni antibiotik strukturno sličan amfotericinu i sa istim mehanizmom delovanja na gljivičnu ćeliju. Izolovan je kao metabolički produkt iz *Streptomyces noursei*. Koristi se u lokalnoj terapiji gljivičnih infekcija kože, gastrointestinalnog (oralna kandidijaza) i genitalnog trakta (vaginalna kandidijaza) (Tevyashova i sar., 2013).

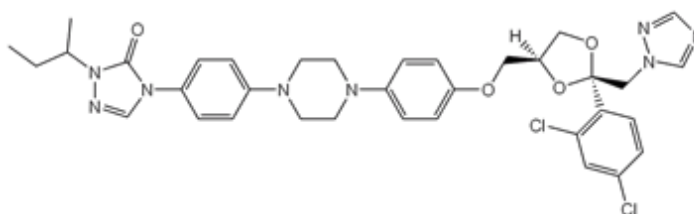
Mehanizam rezistencije gljiva na amfotericin B zasad nije detaljno proučen. Podaci se najčešće odnose na sojeve kvasaca *Candida* i *S. cerevisiae*, gde se kao glavni mehanizam rezistencije na amfotericin B, ali i na nistatin, navodi promena u satavu, odnosno količini membranskog ergosterola. Ove promene nastaju kao sekundarne posledice mutacija u putevima biosinteze ergosterola u ćelijama gljiva (Ghannoum i Rice, 1999).

#### 2.4.1.2 Azoli

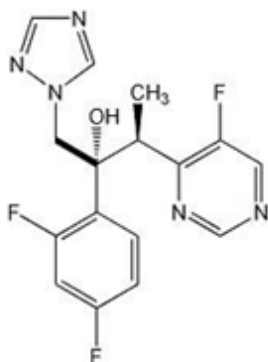
Azoli su najčešće korišćeni antimikotici za lečenje gljivičnih infekcija, to su sintetski antigljivični lekovi sa širokim spektrom dejstva. Otkriveni su 40-ih godina prošlog veka i prvi azol je bio benzimidazol koji je pokazao svoju potentnost protiv kvasaca i nekoliko bakterijskih vrsta. Derivati azola su klasifikovani kao imidazoli ili triazoli na osnovu prisustva dva odnosno tri atoma azota u petočlanom azolnom prstenu. Prvi sistemski antimikotik, ketokonazol, je uveden 1979. godine. Lekovi novije generacije koji se primenjuju u terapiji sistemskih gljivičnih infekcija su: flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol (Slika 7). Mehanizam delovanja azola se zasniva na inhibiciji lanozin-14 $\alpha$ -demetilaza, jedan od enzima citohrom P450 grupe, lanozin-14 $\alpha$ -demetilaza, koji je odgovoran za konverziju lanosterola u ergosterol (Lupetti i sar., 2002). Kao posledica blokiranja biosinteze ergosterola, glavnog sterola u citoplazmatskoj membrani gljivica, dolazi do nagomilavanja toksičnih intermedijernih produkata, i promene permeabilnosti plazma membrane što dovodi do inhibicije rasta, i smrti ćelije u nekim slučajevima (Wingard i Leather, 2004). U *in vitro* uslovima inhibiraju rast većine vrsta iz roda *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus* kao i dermatofita. Primenjuju se u terapiji lokalnih i sistemskih gljivičnih infekcija. Za sve azole je zajedničko da mogu inhibirati i enzimski sistem citohrom P450 u ćelijama sisara.



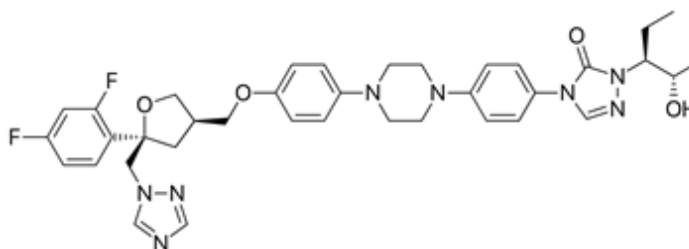
Flukonazol



Itrakonazol



Vorikonazol



Posakonazol

**Slika 7.** Strukturna formula azolnih antimikotika (preuzeto sa [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com)).

Rezistencija na azole je najčešća. Uvođenjem flukonazola u profilaksu ranih devedesetih godina prošlog veka kod trećine bolesnika sa sidom došlo je do infekcija kandidom rezistentnih na flukonazol (Ghannoum i Rice, 1999; Kontoyiannis i Lewis, 2002). Primarna otpornost na flukonazol javlja se kod ne-*albicans* *Candida* vrsta, najčešće *C. glabrata* i *C. krusei*, dok sekundarna otpornost nastaje kako kod *C. albicans*, tako i kod vrsta koje nisu *albicans* (Pfaller i sar., 2010). Smatra se da su glavni faktori rizika za nastanak kandidemije izazvane ne-*albicans* *Candida* vrstama dugotrajna izloženost azolima, lokalni epidemiološki faktori i teška imunosupresija (Kontoyiannis i Lewis, 2002).

### 2.4.1.3 Analози pirimidina

5-flucitozin (5-FC) je analog pirimidina koji je prvobitno razvijen 1950. godine kao potencijalni antineoplastični agent i kasnije je ustanovljeno da ima antigljivičnu aktivnost. Nakon njegovog transporta u gljivičnu ćeliju, on je deaminovan u aktivnu formu, 5-fluorouracil (5-FU), i na kraju dovodi do prekida DNA i sinteze proteina. Flucitozin ima uzak spektar aktivnosti protiv rodova *Candida* i *Cryptococcus*. Većina plesni uključujući vrste roda *Aspergillus* su rezistentni (Bondaryk i sar., 2013; Wingard i Leather, 2004).

### 2.4.1.4 Ehinokandini

Ehinokandini su nova klasa antifungalnih lekova. Najvažniji predstavnici su: kaspofungin, anidulafungin, i mikafungin. Ehinokandini inhibiraju sintezu 1,3  $\beta$ -glukana, glukoznog polimera važnog sastojka ćelijskog zida gljiva. U odsustvu ovog polimera brzo nastaje liza ćelije. Ehinokandini pokazuju fungicidno dejstvo protiv mnogih vrsta roda *Candida*, čineći ovu klasu leka poželjnom alternativom u odnosu na azole, koji pokazuju samo statičku aktivnost protiv kvasaca (Chen i sar., 2011; Eschenauer i sar., 2007).

### 2.4.1.5 Rezistencija biofilma na antimikrobne lekove

Formiranje biofilma donosi mikroorganizmima koji se nalaze u njegovoj strukturi povećanje otpornosti na antimikrobne lekove. Poznato je da su ćelije biofilma otpornije i do 1000 puta u odnosu na planktonske (Bink i sar., 2011; Kojic i Darouiche, 2004). Diferencijalni rast u okviru biofilma ukazuje na postojanje određenih područja unutar biofilma čije ćelije su u stacionarnoj ili čak latentnoj fazi. Spoljašnji sloj biofilma sadrži eksponencijalno rastuće ćelije koje su osetljive na antimikrobna sredstva, dok se u centru nalaze ćelije sa usporenim metabolizmom koje su sposobne da razviju rezistenciju. Različiti mehanizmi mogu biti odgovorni za rezistenciju biofilma (Lewis, 2005; Silva i sar., 2017; Taff i sar., 2013):

- velika gustina ćelija unutar biofilma
- sposobnost ekstracelularnog matriksa da uspori ili onemogući penetraciju supstance u biofilm
- usporen rast i razmnožavanje zbog ograničenih koncentracija kiseonika i hranljivih materija
- prisustvo tzv. “persister” ćelija. Samo mala frakcija ćelija 0.1-10 % duboko unutar biofilma je neosetljiva na produženu izloženost ili veće koncentracije antimikrobnih

lekova, te perzistira usprkos terapiji. Za sada je poznato da perzisteri nisu mutanti, već su fenotipske varijante ćelija divljeg tipa

- ekspresija gena rezistencije, posebno one koje kodiraju efluks pumpe. Poznato je da aktivnost efluksnih pumpi na ćelijskoj membrani bakterija i gljiva koje se nalaze bliže površini biofilma utiče na izbacivanje antimikrobnih sredstava u spoljašnju sredinu i time dodatno štiti ćelije u centru.

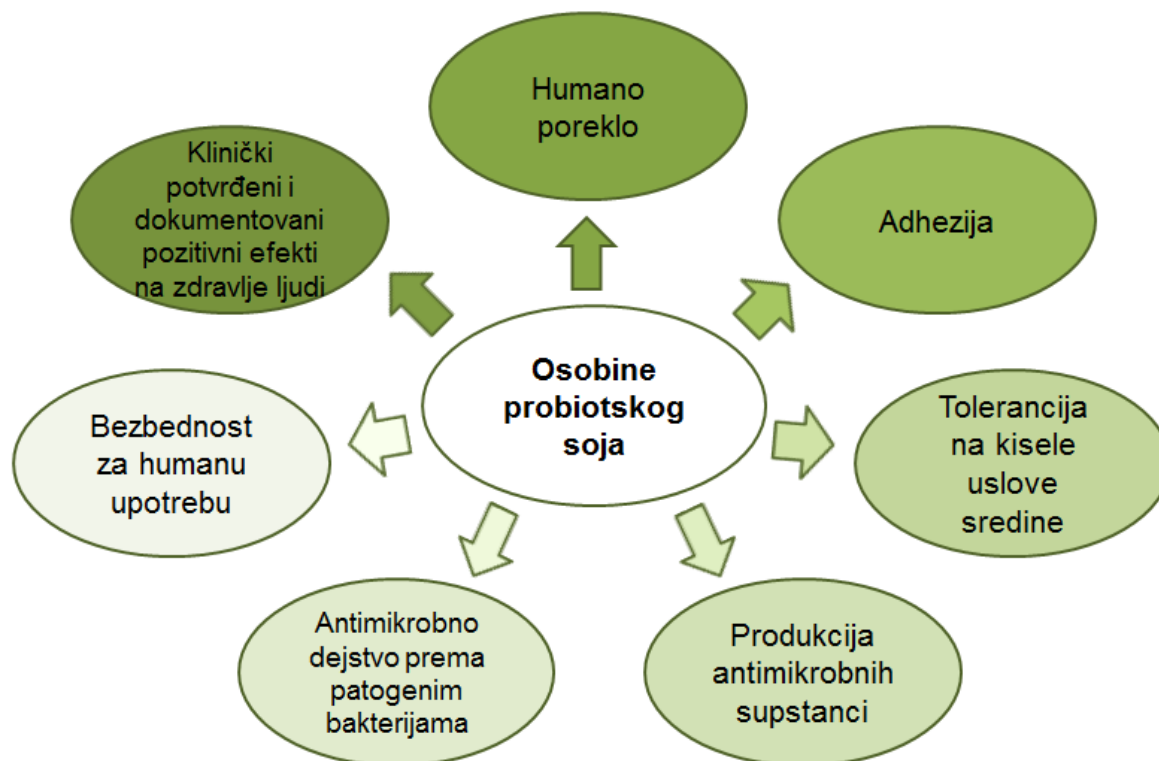
## 2.4.2 Alternativni pristup

Interes za primenu živih mikroorganizama u svrhu održavanja zdravlja i prevencije bolesti ili pak lečenja je u ekspanziji tokom poslednjih nekoliko godina. Mnogi od tih mikroorganizama pod nazivom probiotici, odbreni su od Svedske Zdravstvene Organizacije (SZO) i predlažu se u terapiji kao lekovi za široki broj gastrointestinalnih i drugih sistemskih bolesti kao što su dijareja, alergija i prevencija raka.

### 2.4.2.1 Definicija probiotika

Termin *probiotik* je prvobitno korišćen kao suprotnost terminu *antibiotik*. Reč je izvedena iz grčkih reči *pro* i *bios*, što bi u bukvalnom prevodu značilo "za život" (Markowiak i Slizewska, 2017; Vasiljevic i Shah, 2008). Različite definicije probiotika su davane sve do 2002. godine, kada je radna grupa FAO/WHO, koja je radila na evaluaciji probiotika, dala definiciju koja se danas koristi. Prema definiciji FAO/WHO (2002), probiotici su živi mikroorganizmi, koji primenjeni u adekvatnoj količini, ispoljavaju pozitivne efekte na zdravlje domaćina. Probiotski sojevi se mogu upotrebljavati i efiksano ispoljavati pozitivne uticaje u organizmu domaćina samo ukoliko ispunjavaju određene kriterijume (Slika 8) (Markowiak i Slizewska, 2017; Saarela, 2000):

- pripadnost vrsti ili soju koji se normalno nalazi u intestinalnom traktu
- sposobnost adhezije za ćelije crevnog epitela i kolonizacija creva sprečavajući vezivanje patogena
- rezistencija na nizak pH želudačnog soka i na žučne soli
- sposobnost produkcije antimikrobnih supstanci
- visok nivo bezbednosti po zdravlje čoveka: nepatogeni, netoksični, antialergijski, antimutageni
- klinički potvrđeni i dokumentovani uticaji na zdravlje.



**Slika 8.** Karakteristike probiotičkih sojeva.

Najčešći probiotici su bakterije mlečne kiseline (BMK) iz roda *Lactobacillus*, kao i neki sojevi vrsta roda *Bifidobacterium* koje su ujedno i najviše korišćene i ispitane probiotičke bakterije danas. Pored navedenih mikroorganizama probiotička svojstva pripisuju se i određenim streptokokama, enterokokama, bakterijama propionske kiseline, kao i nekim kvascima i plesnima (Holzapfel i sar., 2001; Tomičić i sar., 2016a).

Probiotici imaju ulogu u jačanju imunskog sistema, prevenciji kancera, metaboličkih poremećaja, poseduju antioksidativno, antihipertenzivno delovanje, ublažavaju simptome dermatitisa, artritisa, i alergijski reakcija. Mehanizam delovanja probiotika može varirati u zavisnosti od vrste, pa čak i soja probiotičkih bakterija, njihove vijabilnosti, količine i načina unosa, kao i od zdravstvenog stanja domaćina (Ng i sar., 2009; Wohlgemuth i sar., 2010). Iako je precizan mehanizam delovanja nepoznat, pretpostavlja se da svoje pozitivne efekte na zdravlje domaćina ispoljavaju različitim mehanizmima (Butel, 2013; Sanders, 2013):

- inhibicija rasta i delovanja patogenih mikroorganizama u GI traktu (promenom pH vrednosti, proizvodnjom bakteriocina, kiselina i dr. komponenata, kompeticijom za

hranljive materije, posebno ugljene hidrate, potom faktore rasta i mesta za vezivanje na crevnom epitelu) (Butel, 2013);

- modulacija metaboličkih procesa u GI traktu (bilo povećanjem aktivnosti nekih enzima kao što je  $\beta$ -galaktozidaza, koji je deficitaran kod osoba koje su osetljive na laktozu, bilo smanjenjem aktivnosti određenih bakterijskih enzima koji učestvuju u kancerogenim procesima) (FAO/WHO, 2002);
- stimulacija imunskog sistema domaćina (povećavanjem nivoa antitela i prenošenjem imuno-odgovora preko imunskog sistema sluzokože creva na druga mesta u organizmu prekrivena sluzokožom, pre svega respiratorni i urogenitalni sistem) (Butel, 2013);
- regulacija funkcije crevnog epitela (obnavljanjem oštećene crevne barijere i sprečavanje oštećenja epitela uzrokovanog citokinima, blokiranje proinflamatornih odgovora patogenih bakterija) (Sanders, 2013).

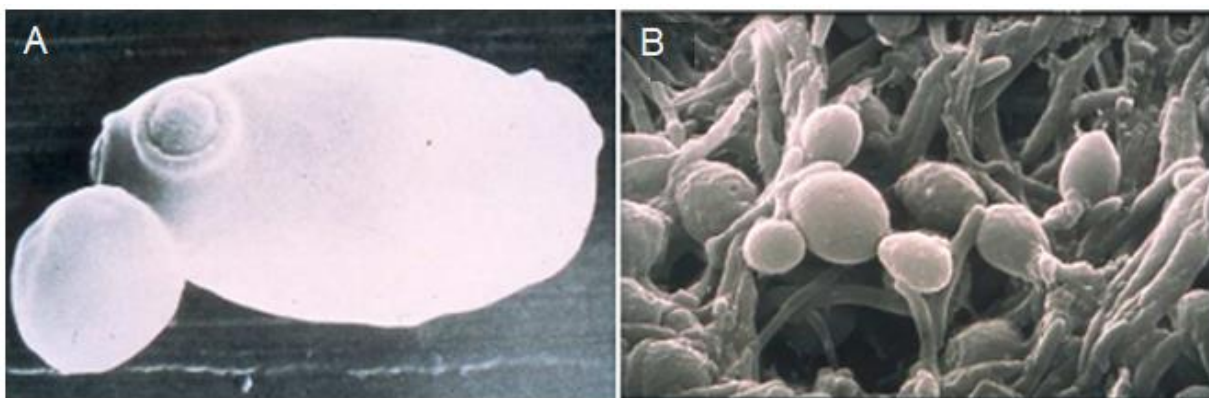
Budući da je poslednjih nekoliko godina došlo do naglog širenja antibiotske rezistencije i smanjivanja delotvornosti antibiotika, razvoj primene probiotika kao bioterapeutika predstavlja obećavajuću alternativu sa ciljem smanjenja upotrebe antibiotika (Sleator i Hill, 2008). Pojedini probiotski sojevi su ispoljili višestruke efekte u pravcu sprečavanja invazije i vezivanja patogenih mikroorganizama, inhibiranja rasta enteropatogena *in vivo* i jačanja imunskog odgovora. Uzimajući navedeno u obzir, upotreba probiotika može da smanji zavisnost od antibiotskih tretmana (Radulović i sar., 2012).

#### **2.4.2.2 Probiotski kvasac *Saccharomyces boulardii***

Probiotski kvasac *S. boulardii* je 1920. godine otkrio francuski mikrobiolog Henri Boulardi, kada je boravio u Indokini u potrazi za novim sojevima kvasaca koji bi se mogli koristiti u procesu fermentacije. Boulardi je posetio Indokinu u vreme izbijanja kolere. Nakon analize uzoraka obolelih je primetio, da su nezaraženi ljudi pili poseban čaj, koji je napravljen od spoljašnjeg omotača tropskog voća ličija. On je uspeo da izoluje poseban soj kvasca koji je nazvao "*Saccharomyces boulardii*". Patent za ovaj kvasac su 1947. godine kupili Biocodex Laboratories, koji su počeli da istražuju detaljnije kvasac. Od otkrića do danas, broj studija i publikacija koje se odnose na istraživanje probiotskog kvasca *S. boulardii* se značajno povećao (McFarland, 2010).

*S. boulardii* je ovalni probiotski kvasac (Slika 9), koji je sposoban da raste pod anaerobnim kao i aerobnim uslovima i može narasti do 10  $\mu\text{m}$  dužine i 5  $\mu\text{m}$  širine (Czerucka i sar., 2007). *S. boulardii* uspešno raste pri niskim pH vrednostima i na optimalnoj temperaturi od 37 °C (Czerucka i Rampal, 2002). Kvasac veoma dobro raste pre svega u gastrointestinalnom traktu,

gde sposobnost da raste pri niskoj pH i tolerancija na žučne kiseline mu daje prednost nad drugim potencijalno patogenim mikroorganizmima (McFarland, 2010). Genom samog kvasca je nedavno proučavan detaljno čime je bila potvrđena sličnost probiotskog kvasca *S. boulardii* sa pekarskim kvascem *S. cerevisiae*. Analiza sekvence genoma *S. boulardii* sadrži 11,400,000 baznih parova (Khatri i sar., 2013).



**Slika 9.** Skening elektron mikroskopska slika probiotskog kvasca *S. boulardii* (A). Slepo crevo miša 3h nakon unosa 30 mg *S. boulardii* (B) (Czerucka i Rampal, 2002).

Rezultati brojnih taksonomskih studija su pokazali, da je *S. boulardii* soj kvasca *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle i sar., 2005). Isto tako, *S. boulardii* se ne priznaje kao posebna vrsta u skladu sa trenutnom taksonomijom, i kao takav, kvasac treba da se naziva *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Czerucka i Rampal, 2002). Pored toga, kvasac *S. boulardii* je moguće odvojiti od ostalih sojeva vrste *S. cerevisiae* s obzirom na njegov probiotski potencijal, njegovu nesposobnost da koristi galaktozu i proizvodi askospore. Iz tih razloga neki naučnici veruju da bi probiotski kvasac trebalo smatrati kao svoju vrstu (van der Aa Kuhle i Jespersen, 2003). Isto tako, nekoliko studija posebno sa mikrosatelitskim polimorfizmom su pokazali jasan obrazac na osnovu koga je moguće da se napravi razlika između kvasaca *S. boulardii* i *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle i Jespersen, 2003). Pored mikrosatelitskog polimorfizma tu je i analiza RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) pomoću kojih je moguće razlikovati sojeve vrsta *S. boulardii* i *S. cerevisiae* (Mitterdorfer i sar., 2002), kao i razlikovanje na osnovu elektroforetskih kariotipova između *S. boulardii* u poređenju sa *S. cerevisiae* (Cassone i sar., 2003; Czerucka i sar., 2007). Zbog sukobljenih rezultata istraživanja se u praksi trenutno koristi ime *S. boulardii* (nom. nud) (Vaughan-Martini i Martini, 1998). *Nom.nud.* (*nomen nudum*) je latinski izraz koji označava »golo ime«. Termin se uglavnom koristi za vrste koje su slične poznatim vrstama, ali nisu još uvek

taksonomski klasifikovane. Ovi sojevi su u procesu dobijanja naučnog imena, dok se ne dobije detaljan opis, što je u skladu sa važećim standardima nomenklature (ICZN, 2014).

### **2.4.2.3 Mehanizmi delovanja probiotskog kvasca *Saccharomyces boulardii* i praktična upotreba**

Glavni mehanizmi delovanja probiotskog kvasca *S. boulardii*:

Inhibicija aktivnosti bakterijskih patogenih proizvoda: kvasac *S. boulardii* proizvodi serinske proteaze, koje cepaju toksin A i B patogene bakterije *Clostridium difficile* (Im i Pothoulakis, 2010; Qamar i sar., 2001).

Povećan imunski odgovor: Probiotski kvasac stimuliše proizvodnju antitela protiv toksina A patogene bakterije *C. difficile* (Im i Pothoulakis, 2010; Czerucka i sar., 2007).

Modifikacija signalnih puteva, koji su uključeni u inflamatorne i neinflamatorne bolesti: *S. boulardii* može smanjiti inflamaciju u gastrointestinalnom traktu stimulišući regulatorne T ćelije i inhibirajući mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze i nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B), što dovodi do smanjenja lučenja interleukina (IL-8) i faktora nekroze tumora alfa (Pothoulakis, 2009).

Održavanje integriteta ćelija odnosno funkcije ćelijske barijere: kvasac *S. boulardii* u konkurenciji za mesta vezivanja u crevima inhibira adheziju i rast patogenih mikroorganizama na intestinalnom epitelu i na taj način sprečava oštećenje ovih organizama (Czerucka i sar., 2007).

Koflokulacija s patogenim bakterijama: Probiotski kvasac vezuje neke od patogenih bakterija (*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*), koje se vezuju odnosno adheriraju na površinu *S. boulardii* (lecitin receptori) umesto na crevne receptore, omogućavajući brže otklanjanje patogenih bakterija iz tela (Czerucka i sar., 2007).

Uticaj na proliferaciju ćelija: kvasac *S. boulardii* vezivanjem na ciljano mesto u crevima utiče na proliferaciju ćelija. U slučaju raka debelog creva blokira receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) i time blokira s EGF (epidermalni faktor rasta) indukovanu proliferaciju i podstiče apoptozu (Im i Pothoulakis, 2010).



Poboljšanje biostrukture fecesa: kvasac *S. boulardii* ima povoljan uticaj na poboljšanje biostrukture fecesa kod pacijenata sa dijarejom sprečavanjem izlučivanja vode i elektrolita kao i povećavanje broja disaharida, koji se tako lakše razgrađuju u monosaharide i absorbuju se u krvi (Im i Pothoulakis, 2010).

Uticaj na sekreciju imunoglobulina A (IgA): Nedavne studije potvrđuju, da probiotski kvasac *S. boulardii* može uticati na sekreciju imunoglobulina A (IgA) (Rodrigues i sar., 2000). *S. boulardii* takođe stimuliše proizvodnju imunoglobulina A i proizvodi mali (<10kDa) faktor, koji inhibira inflamatorni put (Im i Pothoulakis, 2010).

Probiotski kvasac *S. boulardii* se prvenstveno koristi za (Floch, 2014):

- lečenje i prevenciju akutne infektivne dijareje
- lečenje i prevenciju dijareje uzrokovane antibioticima
- lečenje i prevenciju dijareje izazvane bakterijom *C. difficile*
- pomoćnu terapiju u lečenju inflamatornih bolesti creva (Kronova bolest).

### 3 CILJ I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1 Cilj istraživanja

Sintetička antimikrobna sredstva, uprkos svom značaju u lečenju, imaju i širok spektar ograničavajućih faktora. Pojava rezistentnosti patogenog kvasca *C. glabrata* na klasične antimikotike, je stimulisala napore da se otkriju novi agensi za prevenciju i lečenje sve većeg broja infekcija izazvanih ovim patogenom.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sastojao se u:

- kvantitativnom određivanju adheriranih ćelija sojeva kvasca *C. glabrata* na polistiren površinu
- određivanju hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasca *C. glabrata*
- ispitivanju uticaja temperature na adheziju ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* na polistiren površinu
- ispitivanju uticaja pH na adheziju ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* na polistiren površinu
- određivanju antimikrobne aktivnosti antimikotika na kliničke sojeve kvasca *C. glabrata*
- ispitivanju uticaja antimikotika na adheziju ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* na polistiren površinu
- ispitivanju interakcije kvasca *C. glabrata* sa drugim vrstama mikroorganizmima u ko-kulturi

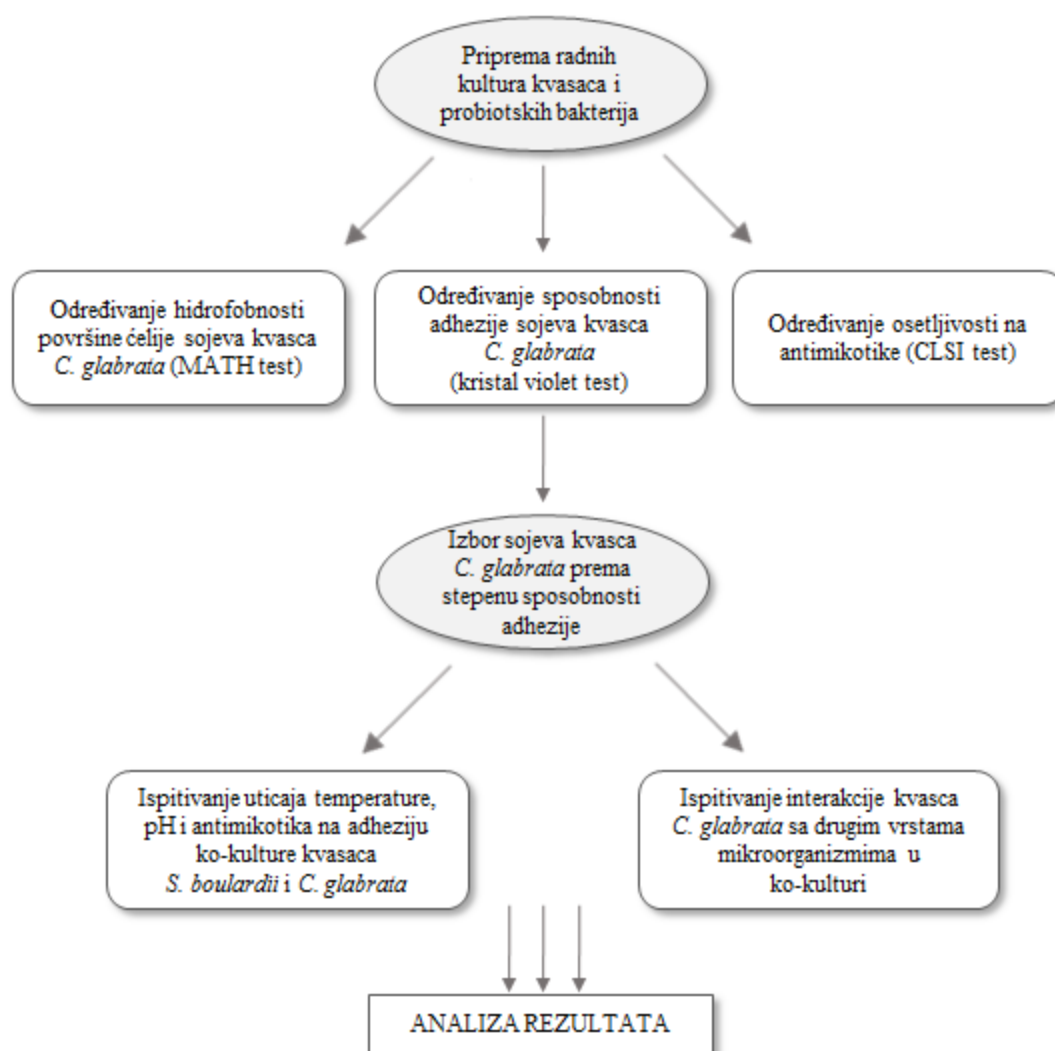
#### 3.2 Hipoteze istraživanja

- Hidrofobnost površine ćelije kvasca *C. glabrata* određuje adheziju na abiotičke površine
- Probiotski kvasac *S. boulardii* sprečava adheziju patogenog kvasca *C. glabrata*
- Promena temperature i pH vrednosti utiču na vijabilnost adheriranih ćelija kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*
- Flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata*
- Flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii*

## 4 MATERIJAL I METODE

Na osnovu radnih hipoteza postavljen je koncept eksperimentalnog rada, koji je izveden u periodu od novembra 2012. godine do oktobra 2013. godine u laboratorijama Katedre za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane, Biotehničkog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani.

### 4.1 ŠEMA RADA



Slika 10. Hodogram eksperimenata.

## 4.2 MATERIJAL

Ovo poglavlje rezimira materijal, koji je korišćen u eksperimentalnom radu u okviru doktorske disertacije.

### 4.2.1 Kulture mikroorganizama

Glavni radni mikroorganizmi, sojevi kvasaca i probiotskih bakterija, koji su korišćeni za obavljanje istraživačkog rada u okviru doktorske disertacije, su deo zbirke Katedre za biotehnologiju, mikrobiologiju i bezbednost hrane, Biotehničkog fakulteta u Ljubljani. Identifikacija sojeva kvasaca je izvršena PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*- analiza dužine restrikcionih fragmenata) analizom sekvenci ITS rDNK regiona (Andrade i sar., 2006).

U istraživanju je korišćeno ukupno 48 sojeva vrste *C. glabrata* izolovanih iz kliničkih uzoraka u cilju ispitivanja mogućnosti korelacije između adhezije na polistiren površinu i hidrofobnosti površine ćelije. Poreklo sojeva je prikazano u Tabeli 1. Za test adhezije ko-kulture sa drugim vrstama mikroorganizama, sojevi kvasaca *C. glabrata* su odabrani na osnovu prethodno utvrđenog potencijala adhezije na polistiren površinu i testirani su u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii* izolovanim iz kapsule komercijalno dostupnog *S. boulardii* probiotskog dodatka ishrani, referentnim sojem *C. krusei* CBS573 izolovanim iz ispljuvka (lat. *sputum*), kliničkim *S. cerevisiae* sojem YJM311 koji je izolovan iz žučnog kanala, i dva soja probiotskih bakterija *Lactobacillus rhamnosus* ZIM B542 i *Lactobacillus casei* ZIM B538.

**Tabela 1.** Oznaka i poreklo sojeva vrste *C. glabrata* korišćenih u ispitivanju.

OZNAKA	POREKLO	OZNAKA	POREKLO	OZNAKA	POREKLO
ZIM 2342	urin	ZIM 2358	krv	ZIM 2374	bris grla
ZIM 2343	abdominalna drenažna cevčica	ZIM 2359	bris rane	ZIM 2375	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )
ZIM 2344	urin	ZIM 2360	bris u trbušnoj duplji	ZIM 2376	apsces
ZIM 2345	urin	ZIM 2361	oralni mukozni bris	ZIM 2377	abdominalna drenažna cevčica
ZIM 2346	bris rane	ZIM 2362	bris u trbušnoj duplji	ZIM 2378	bronhoalveolarno ispiranje
ZIM 2347	bris u trbušnoj duplji	ZIM 2363	bris rektuma	ZIM 2379	urin
ZIM 2348	vaginalni bris	ZIM 2364	bris grla	ZIM 2380	urin
ZIM 2349	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )	ZIM 2365	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )	ZIM 2381	trahealna aspiracija
ZIM 2350	punkcija ascitesa	ZIM 2366	bris dekubitusa	ZIM 2382	urin
ZIM 2351	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )	ZIM 2367	trahealna aspiracija	ZIM 2383	urin
ZIM 2352	bris nazofarinksa	ZIM 2368	bris u trbušnoj duplji	ZIM 2384	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )
ZIM 2353	urin	ZIM 2369	bronhoalveolarno ispiranje	ZIM 2386	bris grla
ZIM 2354	bris u trbušnoj duplji	ZIM 2370	bris dekubitusa	ZIM 2387	urin
ZIM 2355	bris rane	ZIM 2371	trahealna aspiracija	ZIM 2388	urin
ZIM 2356	bronhijalno ispiranje	ZIM 2372	urin	ZIM 2390	bris dekubitusa
ZIM 2357	urin	ZIM 2373	ispljuvak (lat. <i>sputum</i> )	ZIM 2391	bris u trbušnoj duplji

#### 4.2.2 Mikrobiološki medijumi

Za održavanje, kultivaciju i skladištenje sojeva kvasaca i probiotskih bakterija korišćeni su medijumi navedeni u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Čvrsti i tečni medijumi korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima i probiotskim bakterijama.

SASTAV	PRIPREMA
<b>Tečni medijum Malt Extract Broth (MEB)</b>	
Osnovni medijum; Malt Extract Broth (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	8.5 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe medijum je čuvan na 4 °C.
<b>Tečni medijum Malt Extract Broth (MEB) sa izmenjenom pH vrednošću</b>	
Osnovni medijum; Malt Extract Broth (Merck, Germany) 1M HCl (Merck, Germany) 1M NaOH (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	Prilikom testiranja adhezivnosti na različitim pH vrednostima (4, 5.5, 7, 8.5), vrednosti pH su podešene nakon autoklaviranja i hlađenja MEB medijuma sa dodatkom 1M HCl ili 1M NaOH.
<b>Tečni medijum Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)</b>	
Osnovni medijum; Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich, Germany) MOPS pufer (Sigma-Aldrich, Germany) L-glutamin (Sigma-Aldrich, Germany) dH <sub>2</sub> O	Medijum je pripremljen tako da je 5.20 g medijuma RPMI, 17.27 g MOPS-a i 0.15 g L-glutamina odmereno u normalni sud od 500 ml i dopunjeno destilovanom vodom do oznake. Rastvor je zatim podešen na pH 7 dodatkom 5M NaOH i sterilisan filtracijom pomoću vakuum pumpe. Do upotrebe medijum je čuvan na 4 °C.
<b>Tečni medijum Yeast Peptone Dextrose (YPD)</b>	
Osnovni medijum; Yeast Peptone Dextrose (Sigma-Aldrich, USA) dH <sub>2</sub> O	25 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe medijum je čuvan na 4 °C.
<b>Čvrsti medijum Malt Extract Agar (MEA)</b>	
Osnovni medijum; Malt Extract Agar (Merck, Germany) dH <sub>2</sub> O	24 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Kada je medijum ohlađen na 45 °C, aseptično je razliven u sterilne Petri ploče i ploče sa medijumom su čuvane do upotrebe na 4 °C.
<b>Čvrsti medijum Sabouraud dextrose broth (SDA)</b>	
Osnovni medijum; Sabouraud dextrose broth (Sigma-Aldrich, Germany) Agar bacteriological (Biolife, Italy) dH <sub>2</sub> O	15 g osnovnog medijuma zajedno sa 10 g agra je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Kada je medijum ohlađen na 45 °C, aseptično je razliven u sterilne Petri ploče i ploče sa medijumom su čuvane do upotrebe na 4 °C.
<b>Čvrsti medijum Tryptic Soy Agar (TSA)</b>	
Osnovni medijum; Tryptic Soy Agar (Oxoid, England) dH <sub>2</sub> O	20 g osnovnog medijuma je rastvoreno u 500 ml dH <sub>2</sub> O i sterilisano u autoklavu (121 °C, 20 min). Kada je medijum ohlađen na 45 °C, aseptično je razliven u sterilne Petri ploče i ploče sa medijumom su čuvane do upotrebe na 4 °C.

### 4.2.3 Reagensi i rastvori za rad sa kvascima

Ovo poglavlje rezimira reagensne i rastvorne, koji su korišćeni za rad sa kvascima i probiotskim bakterijama u zavisnosti od vrste eksperimenta (Tabela 3).

**Tabela 3.** Reagensi i rastvori korišćeni za eksperimentalni rad sa kvascima i probiotskim bakterijama.

RASTVORI, REAGENSI	PRIPREMA
<b>4M amonijum sulfat</b>	
Amonijum sulfat (Merck, Germany) PBS (Oxoid, England)	26.43 g amonijum sulfata je rastvoremo u 50 ml PBS mešanjem na magnetnoj mešalici.
<b>Dimetil sulfoksid (DMSO)</b>	
DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	DMSO je korišćen kao rastvarač za pripremu štok koncentracija antimikotika itrakonazola i amfotericina B.
<b>Kristal violet</b>	
Kristal violet (Merck, Germany) ddH <sub>2</sub> O	Komercijalno pripremljen rastvor kristal violeta je razblažen sa ddH <sub>2</sub> O do željene koncentracije.
<b>Metilensko plavo</b>	
Metilensko plavo (Sigma-Aldrich, Germany) Natrijum citrat dihidrat (Sigma-Aldrich, Germany) dH <sub>2</sub> O	U 10 ml dH <sub>2</sub> O je rastvoreno 0.01 g metilenskog plavog, dodato 2 g natrijum citrat dihidrata i rastvoreno mešanjem na magnetnoj mešalici. Sadržaj je prenet u normalni sud od 100 ml i dopunjen destilovanom vodom do oznake. Rastvor metilenskog plavog je zatim filtriran kroz 0.2 µm filter i čuvan na 4 °C do upotrebe.
<b>Fiziološki rastvor NaCl</b>	
NaCl (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) dH <sub>2</sub> O	8.5 g NaCl je rastvoreno u 1000 ml dH <sub>2</sub> O i rastvor je sterilisan u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe rastvor NaCl je čuvan na sobnoj temperaturi.
<b>Fiziološki rastvor puferisan fosfatom (PBS)</b>	
PBS tablete (Oxoid, England) dH <sub>2</sub> O	Prema uputstvima proizvođača, jedna tableta PBS je rastvorena u 100 ml dH <sub>2</sub> O i rastvor je sterilisan u autoklavu (121 °C, 20 min). Do upotrebe rastvor PBS je čuvan na 4 °C.

Pored navedenih rastvora i reagenasa, korišćeni su antimikotici flukonazol, itrakonazol i amfotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ksilen (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

#### 4.2.4 Laboratorijski materijal i oprema

Ovo poglavlje rezimira materijal i opremu koji je korišćen u eksperimentalnom radu (Tabela 4 i 5).

**Tabela 4.** Laboratorijski materijal korišćen u eksperimentalnom radu.

LABORATORIJSKI MATERIJAL	OZNAKA	PROIZVOĐAČ
Anaerobne posude	AG0025A	Oxoid, England
Automatske pipete i nastavci	10 µl, 20-200 µl, 1000 µl, 10 ml	Eppendorf, Germany
Burker-Türk komora za brojanje	/	Brand, Germany
Epruvete za centrifugiranje	1.5 i 2 ml	Eppendorf, Germany
Magneti	/	Brand GMBH, Germany
Parafilm	Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, USA
Plastične eze	10 µl	Labor tehnika Golias, Slovenia
Plastične epruvete za centrifugiranje	15 i 50 ml	TPP, Switzerland
Plastične sterilne posude	100 ml	Labor tehnika Golias, Slovenia
Polistirenske mikrotitarske ploče	96F	Nunc, Denmark
Staklene laboratorijske boce sa navojem	250 ml, 500 ml, 1000 ml	Duran, Germany
Staklene čaše i epruvete	96F	Brand, Germany
Sterilne plastične Petri ploče	Fi 90	Labor tehnika Golias, Slovenia
Filtri sa porama	SLGV033RS	Merck, Germany

Pored navedenog korišćen je i ostali laboratorijski pribor i potrošni materijal, kao što su stalci za epruvete, pincete, zaštitne rukavice, vreće za autoklaviranje otpadnog materijala.



**Tabela 5.** Laboratorijska oprema korišćena u eksperimentalnom radu.

LABORATORIJSKA OPREMA	OZNAKA	PROIZVOĐAČ
Autoklav	A-21 i A-63 C	Kambič, Slovenia
Vage	PB 1502-S Sartorius, analytic ME5 in CP 2202S-OCE	Mettler Toledo, USA GMBH, Germany Sartorius, Switzerland
Vodeno kupatilo	WB-13EHK i Julabo	Kambič, Slovenia
Vorteks	IKA Lab Dencer	IKA, USA
Zamrzivač -80 °C	HERAfreeze HFU T Series	Thermo Scientific, USA
Zamrzivač -20 °C	Economic	Gorenje, Slovenia
Inkubator	I 150 C	Kambič, Slovenia
Kamera	DFC290	Leica, Germany
Laminarna komora	PIO LFVP 12	IskraPIO, Slovenia
Magnetna mešalica	RCT basic	IKA, Germany
Mikroskop	DM4000 B	Leica, Germany
pH metar	Seven multi	Mettler Toledo, USA
Frižider	/	Gorenje, Slovenia
Centrifuga sa mogućnošću hlađenja	3K30	Sigma, USA
Čitač mikrotitarskih ploča	Safire 2	Tecan Trading, AG Switzerland

Pored navedenog laboratorijskog materijala i opreme korišćen je i softver Magellan (Tecan, Switzerland), Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, USA), Image J, v1.43u, softver za obradu slika.

## 4.3 METODE

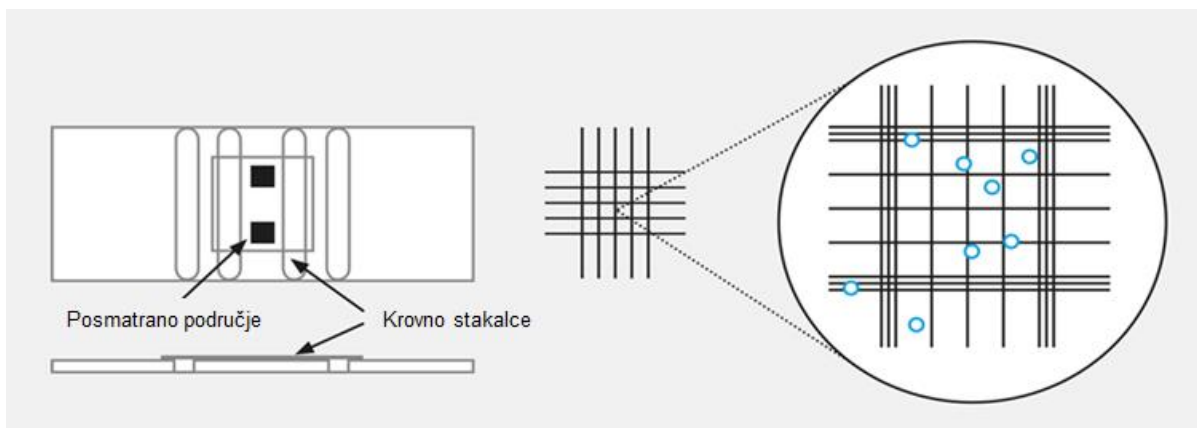
### 4.3.1 Revitalizacija mikroorganizama

Sojevi kvasaca, koji su korišćeni u eksperimentalnom delu, su bili čuvani u Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu sa dodatkom 15 % glicerola na temperaturi od -80 °C. Svi sojevi su revitalizovani iz zamrznutih štokova kultivacijom na Malt Extract Agar (MEA) pločama i inkubirani 2 dana na 37 °C pre početka testa adhezije. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti antimikotika, sojevi kvasaca su revitalizovani iz zamrznutih štokova kultivacijom na čvrstoj Sabouraud dextrose broth (SDA) podlozi 24 h na 35 °C. Sojevi probiotskih bakterija *L. rhamnosus* i *L. casei* su nakon odmrzavanja gajeni na Tryptic Soy Agar (TSA) podlogama u anaerobnim uslovima 4 dana na 37 °C pre upotrebe u testu.

### 4.3.2 Priprema inokuluma

Vijabilnost i koncentracija ćelija u suspenziji je merena direktno, pomoću bojenja ćelija metilenskim plavim, mikroskopa sa kamerom (Leica DFC290) kao i kompjuterskog programa Image J, v1.43u za obradu slika (Tomičić i sar., 2016a; Zupan i sar., 2013). Najpre je suspenzija testiranog mikroorganizma dobro izvorteksirana, i 50 µl suspenzije je razblaženo sa 50 µl metilenskog plavog. Nakon vorteksiranja suspenzije ćelija i metilenskog plavog, 20 µl dvostruko razblažene suspenzije je ravnomerno preneto na Bürker-Türk komoru za brojanje (hemocitometar) prekrivenu sa krovnom stakalcem (Slika 11). Uzorak je zatim posmatran pod mikroskopom (10 puta uvećanje) i u skladu sa specifičnim podešavanjima za snimanje slika (aparatura 1, gama 10, crnobela slika) je snimljena slika živih ćelija u vidljivom polju (Zupan i sar., 2013). Slika je prenetu u kompjuterski program Image J pomoću kojeg je dobijen broj ćelija na određenoj površini, koji je zatim uzimajući u obzir razblaženje i površinu, upotrebljen za izračunavanje koncentracije ćelija po mililitru suspenzije prema jednačini:

$$\text{broj} \frac{\text{ćelija}}{\text{ml}} = \frac{\text{prosečan broj ćelija na vidnom polju}}{\text{površina vidnoga polja}} \times \text{faktor razblaženja}$$



**Slika 11.** Šematski prikaz brojanja ćelija s hemocitometrom po Bürker-Türk (Doyle i Griffiths, 1999).

#### 4.3.3 Mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti antimikotika *in vitro*

Osetljivost sojeva kvasca *C. glabrata* na antimikotike je određena primenom bujon mikrodilucione metode prema procedurama CLSI standarda (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M27-A3) (CLSI, 2008). U testu su korišćeni antimikotici dve različite klase, gde su iz klase azola korišćeni flukonazol i itrakonazol, dok je iz klase poliena korišćen amfotericin B. Eksperimenti su izvođeni tako što su u mikrotitar pločama najpre pripremljena dvostruka razređenja testiranih antimikotika tako da su se finalne koncentracije itrakonazola i amfotericina B u mikrotitar pločama kretale od 0.03 do 16  $\mu\text{g/ml}$ , dok su se finalne koncentracije flukonazola kretale od 0.5 do 256  $\mu\text{g/ml}$ . Flukonazol je rastvoren u sterilnoj destilovanoj vodi, dok finalna koncentracija dimetil sulfoksid (DMSO) rastvarača koji je korišćen za rastvaranje itrakonazola i amfotericina B nije prelazila 1 %.

Od prekonocnih kultura ispitivanih sojeva kvasaca uzgajanih na SDA pločama na 35 °C je pripremljena suspenzija u sterilnom 0.85 % fiziološkom rastvoru NaCl. Finalna koncentracija inokuluma  $5 \times 10^3$  ćelija/ml je dobijena razblaženjem 1:50 (v/v) u RPMI 1640 medijumu i podešena je pomoću Bürker-Türk komore za brojanje, mikroskopa sa kamerom (Leica DFC290) i softvera ImageJ za obradu slika (Tomičić i sar., 2016a; Zupan i sar., 2013). Ovako pripremljena suspenzija dodata je u bunarčice mikrotitar ploče u istom volumenu kao i dvostruko koncentrovani agens (1:1, v/v), a finalna zapremina suspenzije u svakom bunarčiću je iznosila 200  $\mu\text{l}$ . Referentni sojevi kvasaca *C. albicans* ATCC 10261 i *C. krusei* CBS573 su takođe testirani i korišćeni su kao kontrola. Test je obuhvatao pozitivnu kontrolu (inokulum u

RPMI medijumu bez aktivne supstance) i negativnu kontrolu (RPMI medijum bez supenzije kvasaca).

Mikrotitar ploče su inkubirane tokom 48 h na 35 °C. Nakon isteka perioda inkubacije za svaki testirani soj je određena minimalna inhibitorna koncentracija (eng. Minimum Inhibitory Concentration - MIC) u µg/ml, merenjem apsorbance u bunarčićima mikrotitar ploče na 650 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland) i korišćenjem računarskog programa »Magellan«. Prema CLSI protokolu za azolne antimikotike, flukonazol i itrakonazol, MIC je očitana pri 50 % inhibiciji rasta, dok je za polienski antimikotik amfotericin B vrednost MIC očitana pri koncentraciji u kojoj nije bilo vidljivog rasta. Testirani sojevi su okarakterisani kao osetljiv, umereno osetljiv ili rezistentan na testirane antimikotike prema preporučenim standardnim kriterijumima CLSI u dokumentu M27-A3 (CLSI, 2008) (Tabela 6). Test je rađen u četiri nezavisna ponavljanja i rezultati su predstavljeni tabelarno sa dobijenim MIC vrednostima.

**Tabela 6.** Granične vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija za određene antimikotike prema kriterijumima CLSI (CLSI, 2008).

	S (µg/ml)	S-DD (µg/ml)	R (µg/ml)
<b>Flukonazol</b>	≤ 8	16 - 32	≥ 64
<b>Itrakonazol</b>	≤ 0.125	0.25 - 0.5	≥ 1
<b>Amfotericin B</b>	≤ 0.5	-	≥ 2

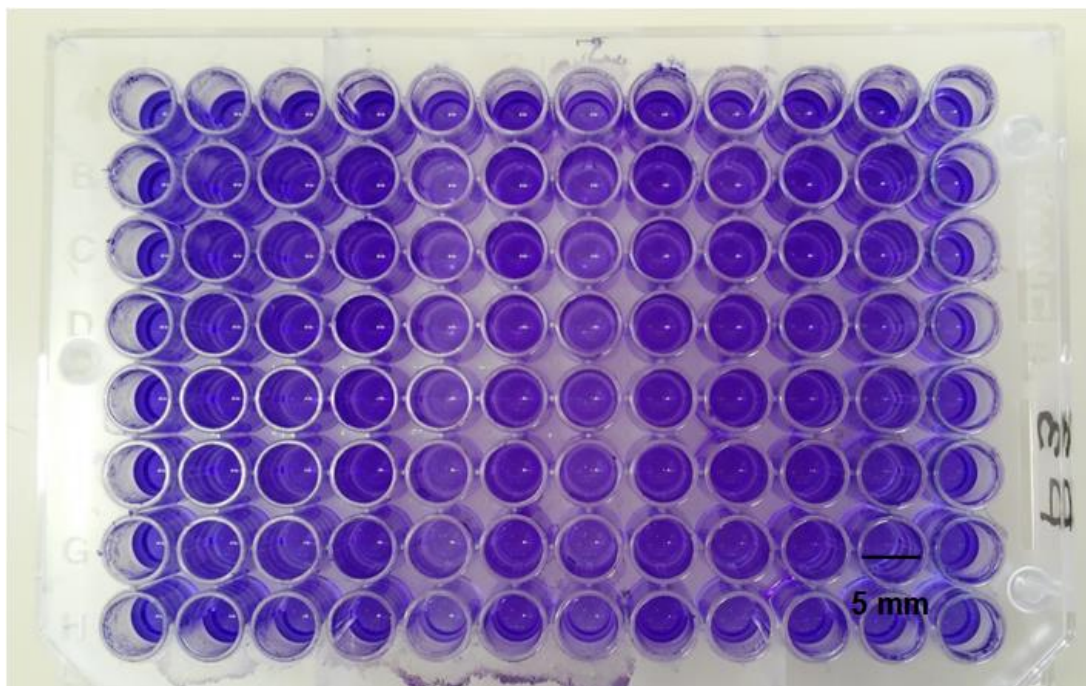
**Legenda:** S – osetljiv; S-DD – umereno osetljiv; R- rezistentan.

#### 4.3.4 Određivanje sposobnosti adhezije sojeva kvasaca metodom kristal violet

Za kvantitativno ispitivanje sposobnosti adhezije sojeva kvasaca korišćen je kristal violet test u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića i ravnim dnom, prema metodi koju su opisali Mowat i sar. (2007), uz modifikacije. Sojevi su najpre gajeni na MEA pločama tokom 48 h na 37 °C. Nakon isteka perioda inkubacije, ćelije kvasaca su suspendovane u odgovarajućem MEB medijumu pri osnovnoj vrednosti pH 5.5. Koncentracije ćelija su određene i podešene na  $2 \times 10^7$  ćelija/ml pomoću Bürker-Türk komore za brojanje i mikroskopa (Leica DM4000 B) sa automatskim brojanjem vijabilnih ćelija kao što je prethodno opisano (Tomičić i sar., 2016b; Zupan i sar., 2013). Test je iniciran dodavanjem 200 µl ćelijske suspenzije u mikrotitar ploču sa 96-bunarčića, koje su zatim inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Kao negativna kontrola korišćen je sterilni medijum bez dodatka inokuluma.

Kristal violet test na temperaturama 28 °C, 39 °C i 42 °C je izveden na identičan način kao i test na temperaturi 37 °C. Za ispitivanje adhezivnosti pri različitim vrednostima pH (4, 5.5, 7, 8.5), korišćen je MEB medijum kome su pH vrednosti podešene na željenu vrednost dodatkom 1M HCl ili 1M NaOH. U cilju ispitivanja uticaja antimikotika na inicijalnu adheziju kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*, koncentracije antimikotika su odabrane na osnovu predhodno određenih Minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) primenom bujon mikrodilucione metode prema preporukama CLSI standarda (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M27-A3) (CLSI, 2008).

Nakon 24 h perioda inkubacije, neadherirane ćelije su uklonjene ispiranjem tri puta sa 150 µl sterilne destilovane vode. Zaostale adherirane ćelije su fiksirane sušenjem 10 minuta sa fenom. Nakon sušenja, u svaki bunarčić je dodato po 100 µl 0.5 % rastvora kristal violeta, nakon čega su ploče inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi. Višak kristal violeta je uklonjen inverzijom mikrotitar ploča i ispiranjem tri puta sa sterilnom destilovanom vodom. Mikrotitar ploče su osušene sušenjem sa fenom u trajanju od 10 minuta. Kristal violet koji je ostao vezan za adherirane ćelije rastvoren je dodavanjem 100 µl 33 % sirćetne kiseline u svaki bunarčić i ploče su šejkane 3 minuta kako bi se oslobodila boja iz ćelija (Slika 12). Adhezivnost sojeva je određena na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanca kristal violeta u rastvoru na talasnoj dužini od 584 nm na čitaču mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Vrednosti apsorbanca korišćenih za karakterizaciju adhezije su dobijeni umanjenjem svake dobijene apsorbanca za srednju vrednost apsorbanca negativne kontrole ( $A_{584}$ ). Test je izveden u osam nezavisnih ponavljanja, a dobijene vrednosti apsorbanca su izražene kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom i predstavljene su grafički pomoću softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA). Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanca, sojevi su klasifikovani u četiri kategorije prema Stepanović i sar. (2000).



**Slika 12.** Mikrotitar ploča nakon dodavanja kristal violeta.

#### **4.3.5 Određivanje hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasca *Candida glabrata* – MATH test**

Hidrofobnost površine ćelije (eng. Cell Surface Hydrophobicity - CSH) sojeva kvasca *C. glabrata* određena je testom Mikrobne adhezije na ugljovodonike (eng. Microbial Adhesion To Hydrocarbon - MATH) metodom po Rosenbergu (Rosenberg, 1984), uz modifikacije. Sojevi kvasca su najpre gajeni u 6 ml Yeast Peptone Dextrose (YPD) medijumu 24 h na 30 °C. Nakon završenog perioda inkubacije, ćelije su centrifugirane pri  $1500 \times g$  tokom 3 minute i dva puta isprane sa fosfatnim puferom (PBS). Ćelije kvasca su zatim resuspendovane u 6 ml 4M amonijum sulfata što povećava hidrofilitnost vodene faze, i suspenzija je podešena do vrednosti apsorbance od 0.7 – 0.8 na 650 nm ( $A_0$ ). Alikvoti ćelijskih suspenzija od 1.4 ml su preneti u epruvete za centrifugiranje, i 0.2 ml ksilena kao organskog rastvarača je dodato za pokretanje testa. Epruveta bez dodatog ksilena je korišćena kao kontrola. Epruvete su vorteksovane 1 minut i ostavljene da odstoje 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se obezbedilo kompletno odvajanje dve faze, vodene i ugljovodonične. Nakon razdvajanja faza, zapremina od 300  $\mu$ l donje vodene faze je pažljivo izdvojena i izmerena joj je apsorbance (A) na 650 nm na čitaču mikrotitar ploča (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland). Vrednosti

rezultata su izražene kao procenat ćelija koje adheriraju za ksilen (A) u odnosu na kontrolnu suspenziju ( $A_0$ ):

$$\text{CSH (\%)} = (1 - A/A_0) \times 100\%.$$

Testovi su izvedeni u triplikatu sa tri ponavljanja, pri čemu su srednje vrednosti dobijenih procenata sa standardnom devijacijom predstavljene grafički primenom softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA) i korelirane sa vrednostima adhezije sojeva *C. glabrata* na polistiren površinu. Rezultati su tumačeni tako, da su sojevi čije su vrednosti bile > 50 % smatrani izrazito hidrofobnim, umereno hidrofobnim kada su vrednosti bile u opsegu 20 - 50 % i hidrofilnim kada su dobijene vrednosti iznosile < 20 % (Mattos-Guaraldi i sar., 1999).

#### 4.3.6 Statistička obrada rezultata

Deskriptivne statističke analize za izračunavanje srednje vrednosti i standardne devijacije izvršene su korišćenjem Microsoft Excel software (Microsoft Office, 2013). Svi dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom i predstavljeni grafički primenom softvera Origin 8.1. (Microcal Software, USA). Procena statistički značajnih razlika između testiranih parametara je izvedena primenom testova Mann-Whitney i Kruskal-Wallis. U okviru svih merenja vrednost  $P < 0.05$  je smatrana statistički značajnom. Za utvrđivanje korelacije između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije sojeva kvasaca na polistiren površinu korišćen je regresioni model. Analize su izvedene pomoću statističkog softvera SPSS version 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 5 REZULTATI I DISKUSIJA

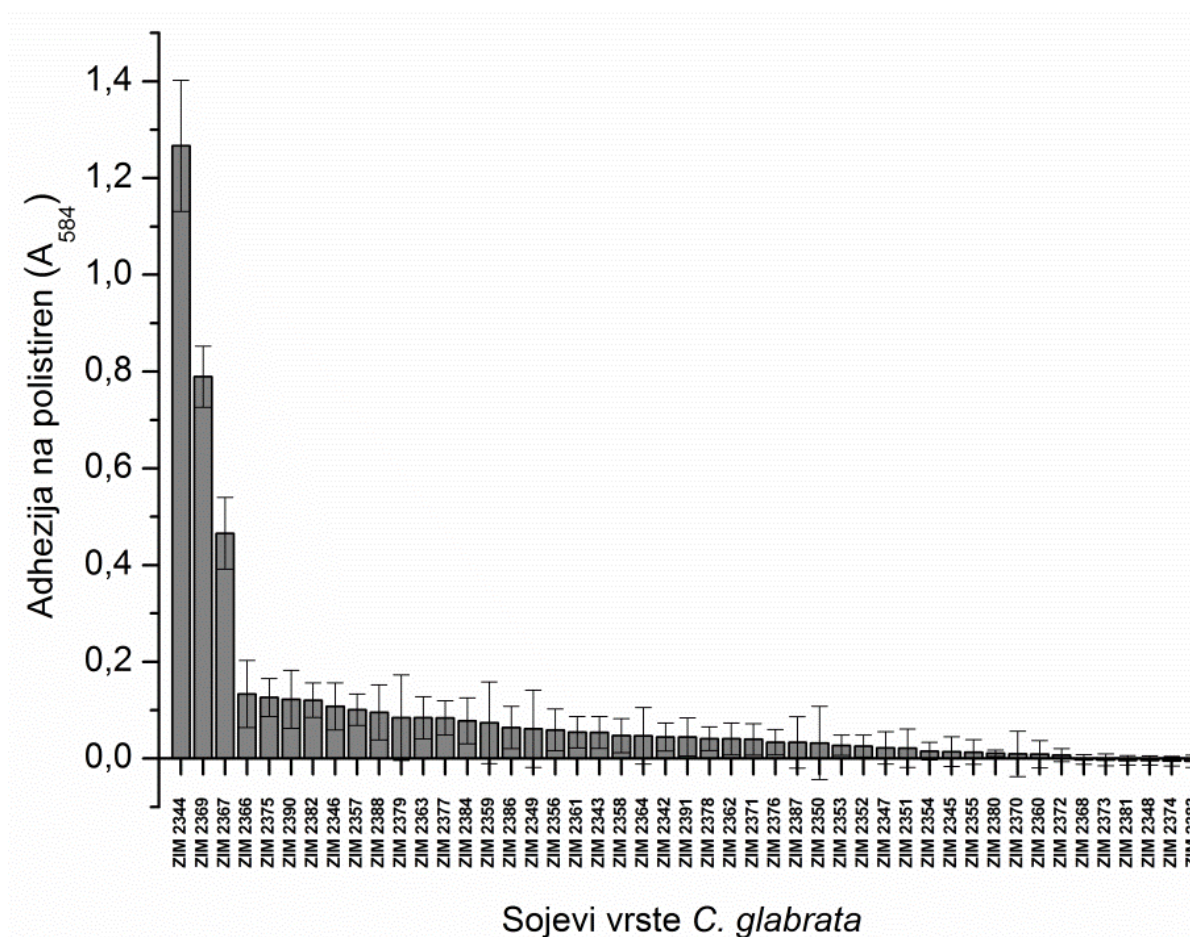
Ovo poglavlje opisuje rezultate dobijene u eksperimentalnom radu. Na osnovu postavljenih radnih hipoteza ispitali smo, (I) da li hidrofobnost površine ćelije kvasca *C. glabrata* određuje adheziju na abiotičke površine; (II) probiotski kvasac *S. boulardii* sprečava adheziju patogenog kvasca *C. glabrata*; (III) promena temperature i pH vrednosti utiču na vijabilnost adheriranih ćelija kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*; (IV) flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata*; (V) flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii*.

### 5.1 Kavantitativno određivanje adheriranih ćelija sojeva kvasca *Candida glabrata* na polistiren površinu

Adhezija je početna i osnovna faza u formiranju biofilma i zbog toga je važan činilac u patogenezi infekcija uzrokovanih vrstom *C. glabrata*. Ovaj kvasac poseduje sposobnost formiranja biofilma na biotičkim površinama, kao što su rane, unutrašnji organi, i na abiotičkim površinama, pre svega na medicinskim uređajima i opremi, kao što su kateteri, implatanti i drugim predmetima. Podatak da je 80 % infekcija povezano sa nastankom biofilma, kao i da su ćelije u okviru biofilma i do 1000 puta otpornije na antimikrobne agense, govori u prilog postavci da je inhibicija njegovog formiranja od velikog značaja (Donlan i Costerton, 2002; Douglas, 2003). U našem istraživanju metodom bojenja kristal violetom ispitan je potencijal adhezije 48 sojeva vrste *C. glabrata* na mikrotitar pločama nakon 24 h inkubacije na temperaturi od 37 °C.

Iz grafičkog prikaza datog na Slici 13 može se uočiti da su među svim testiranim sojevima najviši stepen adhezije imali sojevi ZIM 2344 i ZIM 2369 dok je soj ZIM 2367 bio umereno adhezivan. Vrednosti apsorbanci kod ovih sojeva su se kretale u rasponu 0.47 (ZIM 2367) do 1.27 (ZIM 2344). Preostali sojevi su bili slabo adhezivni ili neadhezivni na polistiren površinu, što pokazuje da su razlike među sojevima doprinele varijaciji u sposobnosti adhezije. Istraživanja koja su sprovedli drugi istraživači (Ramage i sar., 2006; Shinde i sar., 2012; Tomićić i sar., 2017; Trofa i sar., 2008) su pokazala da osobine ćelije kvasca i svojstva materijala mogu značajno doprineti u varijaciji formiranja biofilma. Ove osobine mogu uključiti hidrofobnost površine ćelije, brzinu rasta kao i adhezine površine ćelije. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci četiri soja kvasca *C. glabrata* (ZIM 2344, ZIM 2367, ZIM 2369 i ZIM 2382) su korišćena za dalji test adhezije u ko-kulturi sa drugim vrstama mikroorganizmima.



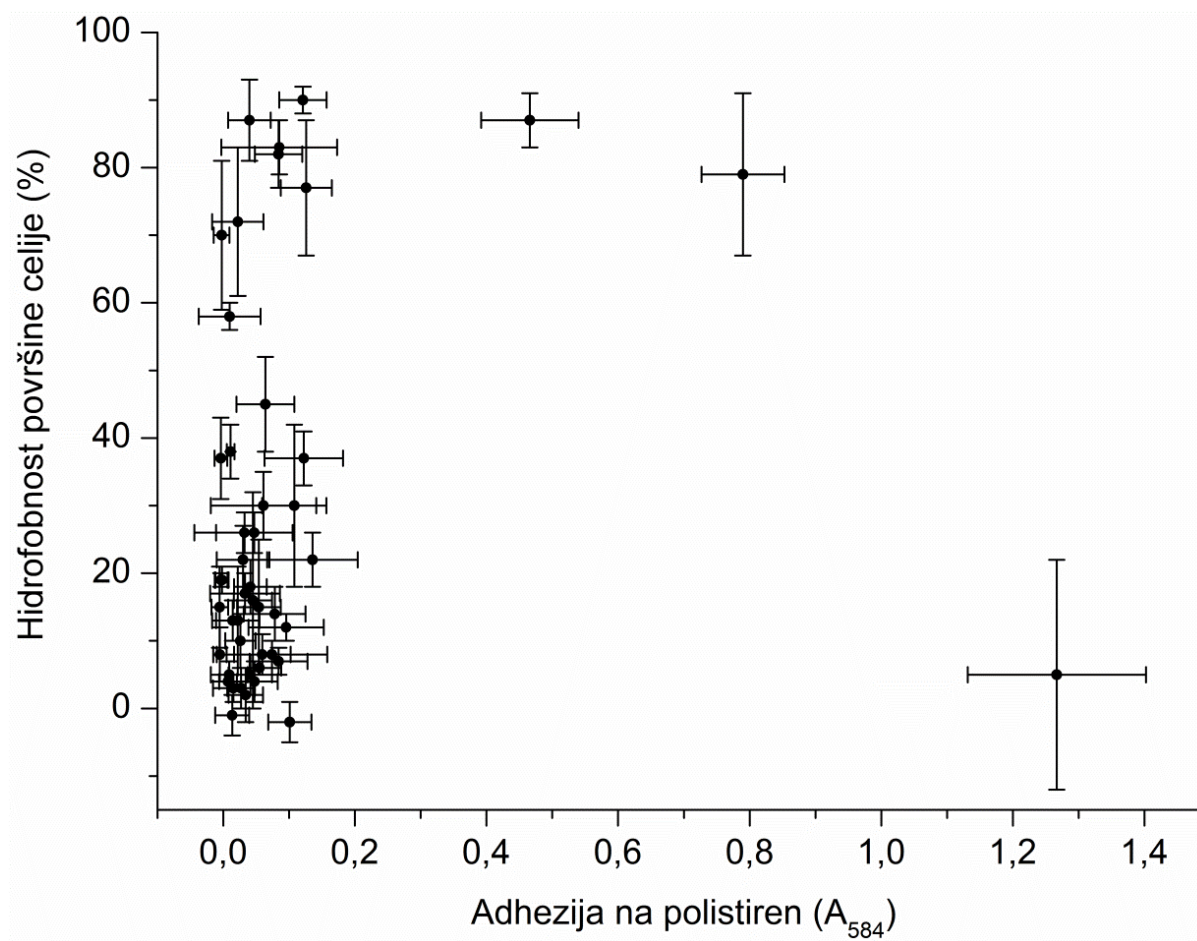


**Slika 13.** Ispitivanje sposobnosti adhezije 48 sojeva vrste *C. glabrata* na polistiren površinu nakon 24 h inkubacije na 37 °C. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.

## 5.2 Određivanje hidrofobnosti površine ćelije sojeva kvasca *Candida glabrata*

Hidrofobnost površine ćelije (CSH) se smatra važnom patogenom osobinom vrsta roda *Candida* koja se odnosi na njihovu adheziju i zadržavanje na površinama domaćina. Takođe je poznato da su hidrofobni kvasci virulentniji od hidrofilnih (Brugnoli i sar., 2007; Chae i sar., 2006; Li, 2003). Pošto je CSH često povezana sa adhezijom i flokulacijom (Nguyen i sar., 2011; Hazen i Hazen, 1988; Soares, 2010), u okviru doktorske disertacije određena je hidrofobnost površine ćelije 48 sojeva vrste *C. glabrata* testom Mikrobne adhezije na

ugljovodonike (Rosenberg, 1984). Ovom metodom se određuje odnos broja ćelija koje se vežu za organski rastvarač i broja ćelija koje ostaju u vodenoj fazi. Kao nepolarni rastvarač korišćen je ksilen za koji se ćelije svojim hidrofobnim površinama vezuju. Korelacija između adhezije na polistiren površinu i CSH je prikazana grafički na Slici 14.



**Slika 14.** Korelacija između hidrofobnosti površine ćelije (MATH test) i adhezije na polistiren (kristal violet test) sojeva vrste *C. glabrata* na 37 °C. Veličina inokuluma je  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna ponavljanja.

Rezultati ispitivanja stepena hidrofobnosti sojeva kvasca *C. glabrata* su pokazali veliku disperziju vrednosti u opsegu od 0 do 90 %. Među testiranim sojevima najveći broj (57 %) je ispoljio stepen hidrofilnosti. Dva soja ZIM 2367 i ZIM 2382 sa najvišim vrednostima CSH (87 % i 90 %, respektivno) su imala umerenu sposobnost adhezije na polistiren površinu, dok je

najadhezivniji soj ZIM 2344 pokazao snažno hidrofilno ponašanje sa vrednošću CSH od 4 %. S druge strane, hidrofobnost površine ćelije izrazito adhezivnog soja ZIM 2369 je iznosila 79 %. Statistički značajna korelacija između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije sojeva kvasca *C. glabrata* na polistiren nije utvrđena ( $R^2 = 0.02$ ).

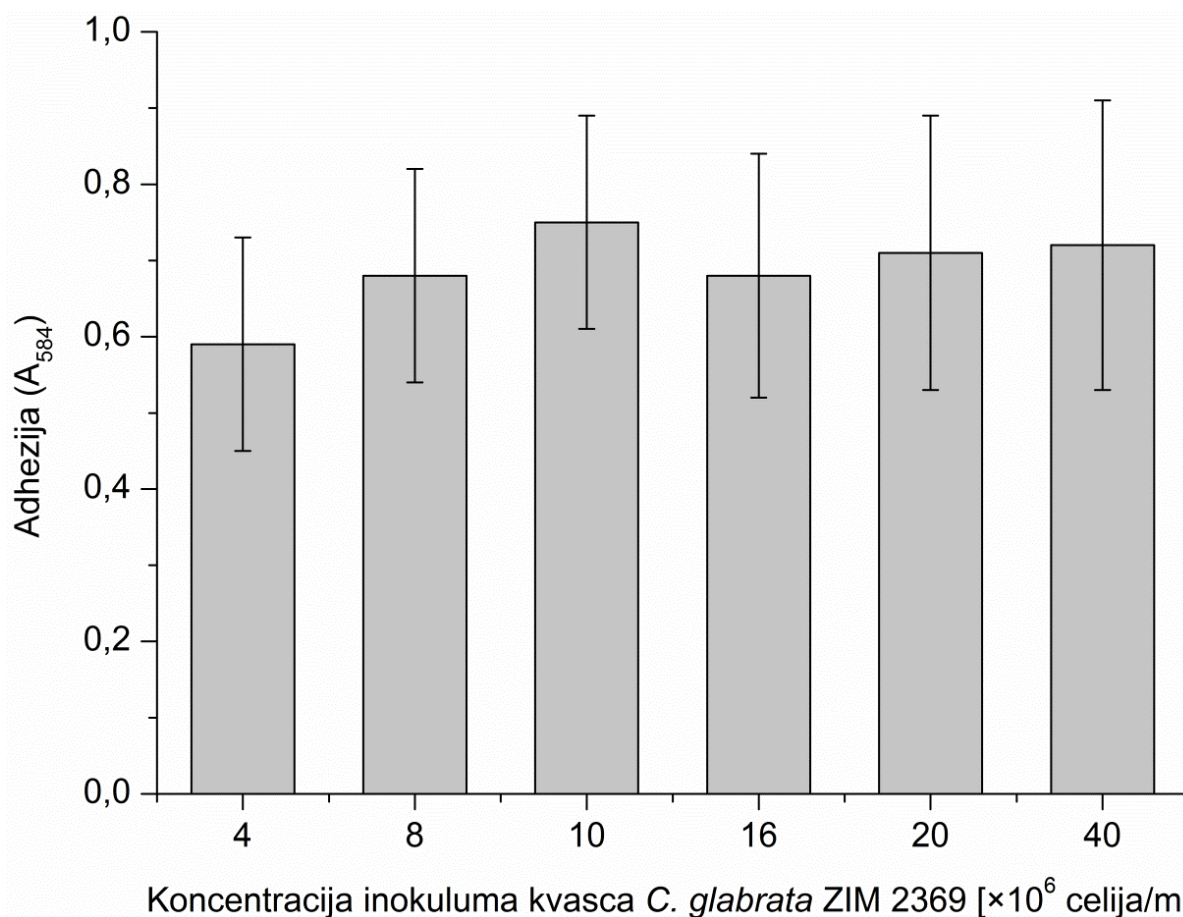
U pogledu korelacije između CSH i adhezije na polistiren, rezultati drugih autora su nesaglasni. Predhodne studije su pokazale da postoji pozitivna korelacija između hidrofobnosti i adhezije vrsta roda *Candida* na abiotičke površine i ćelije domaćina (Luo i Samaranyake, 2002; Panagoda i sar., 2001; Silva-Dias i sar., 2010), dok kod drugih korelacija nije utvrđena (Camacho i sar., 2007; Tomičić i sar., 2016b). Ovi podaci ukazuju da hidrofobnost ćelijskog zida ne mora uvek da bude precizna mera adhezivnog potencijala (Camacho i sar., 2007; Hazen, 1989). Iz svega navedenog se može uočiti, da postoje određene poteškoće u utvrđivanju adhezivnog potencijala *in vitro*, što je posledica razlika u sojevima, u mehanizmu adhezije i uticaja uslova ispitivanja u pojedinim eksperimentima pa i u metodama merenja.

### **5.3 Razvoj metode merenja adhezije ko-kulture kvasaca *Saccharomyces boulardii* i *Candida glabrata* i njena validacija**

Adhezija na površinu epitelnih ćelija je važan preduslov za kolonizaciju probiotskih sojeva u gastrointestinalnom traktu jer omogućava dugotrajnije delovanje probiotskih mikroorganizama na crevnu mikrofloru i imunski sistem domaćina. Iako su molekularni mehanizmi pomoću kojih probiotski mikroorganizmi imaju delotvorni efekat na zdravlje domaćina još uvek nepoznati, smatra se da su površinski molekuli, uglavnom proteini, uključeni u njihovu adheziju i kolonizaciju u intestinalnom traktu što doprinosi funkcionalnosti ovih sojeva kao probiotika (Czerucka i sar., 2007; Sanders, 2013). Pored toga, adhezija probiotskih sojeva za intestinalni epitel obezbeđuje prednost u kompeticiji sa patogenima za kolonizaciju gastrointestinalnog trakta (Butel, 2014). Jedno od važnih funkcionalnih svojstava probiotskih sojeva je njihovo antagonističko delovanje prema nepoželjnim mikroorganizmima, stoga u okviru našeg istraživanja ispitan je uticaj probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju patogenog kvasca *C. glabrata*.

Tri preliminarna testa adhezije su izvedena da bi se ispitalo kako koncentracija inokuluma i odnos između kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* utiče na adheziju obe vrste na polistiren površinu. Iz grafičkog prikaza datog na Slici 15 može se uočiti da koncentracija inokuluma kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 u opsegu od  $4 \times 10^6$  do  $4 \times 10^7$  ćelija/ml nije imala uticaj na količinu adheriranih ćelija nakon 24 h. Evidentno je da koncentracije inokuluma od  $4 \times 10^6$  i 4

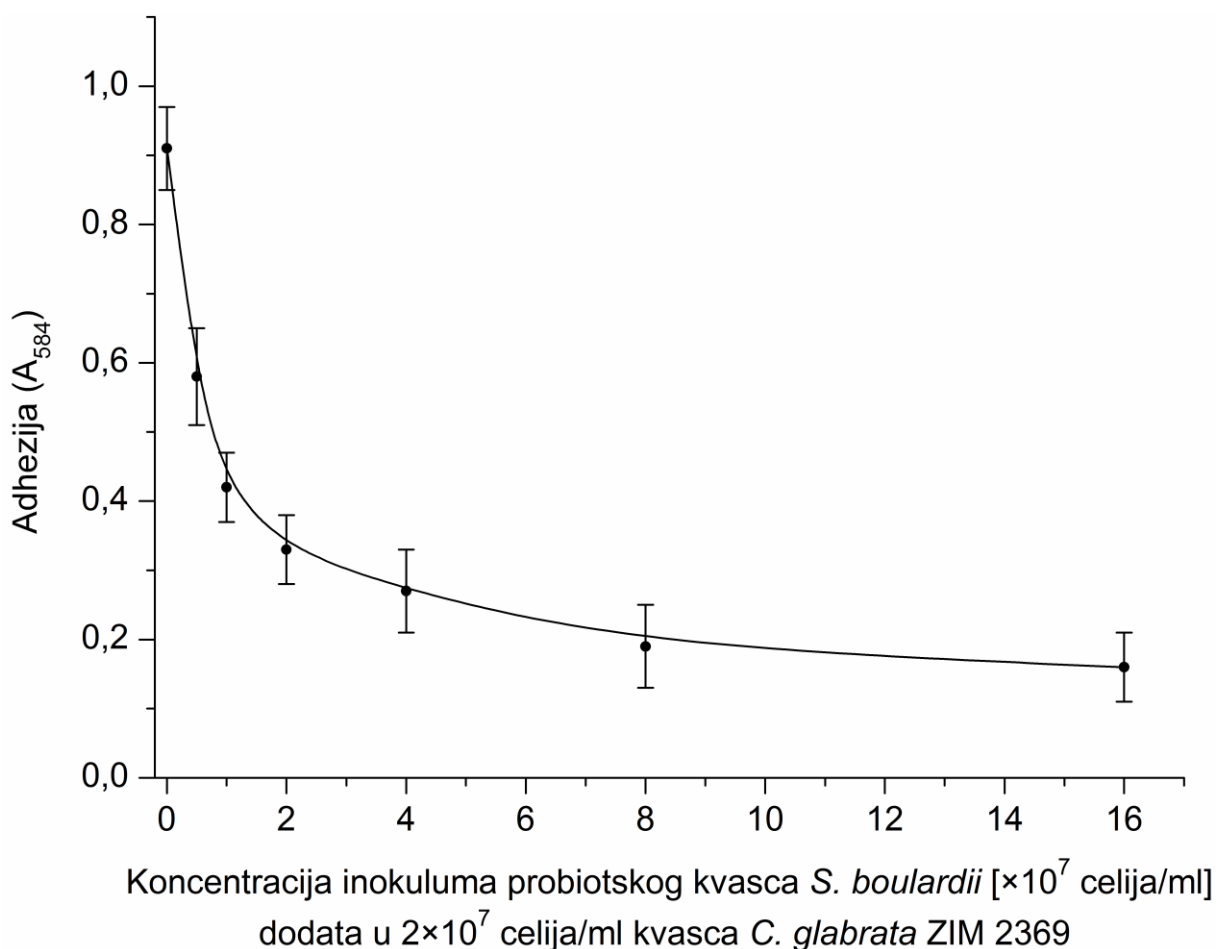
$\times 10^7$  ćelija/ml nisu rezultirale statistički značajnim razlikama u vrednostima adhezije nakon 24 h ( $P = 0.178$ ).



**Slika 15.** Uticaj koncentracije inokuluma na količinu adheriranih ćelija kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 nakon 24 h adhezije. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.

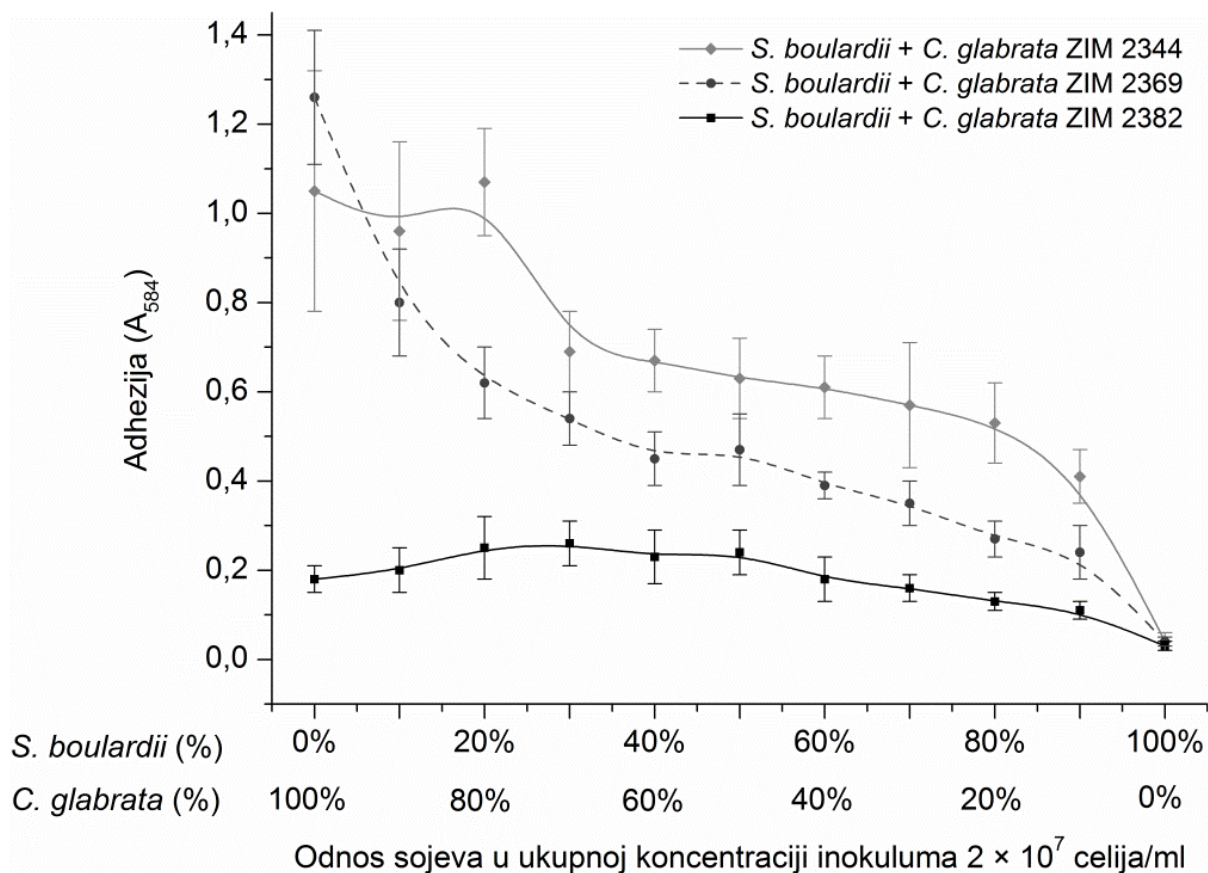
U drugom delu eksperimenta inokulisana je fiksna koncentracija ćelija kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 ( $2 \times 10^7$  ćelija/ml) sa nizom različitih koncentracija ćelija probiotskog kvasca *S. boulardii* u opsegu od  $5 \times 10^6$  do  $1.6 \times 10^8$  ćelija/ml. Rezultati jasno pokazuju da adhezija soja ZIM 2369 u velikoj meri zavisi od veličine inokuluma probiotskog kvasca u odnosu na izabrani raspon koncentracija (Slika 16). Adhezija ćelija eksponencijalno je smanjena sa povećanjem koncentracije inokuluma *S. boulardii*. Pri najnižoj koncentraciji probiotskog

kvasca *S. boulardii* ( $5 \times 10^6$  ćelija/ml, koja predstavlja 20 % ćelija u ko-kulturi) adhezija soja ZIM 2369 je smanjena za 31 % u poređenju sa kontrolnim ćelijama koje nisu tretirane probiotskim kvascem. Dok je pri koncentraciji od  $1 \times 10^7$  ćelija/ml probiotskog kvasca koja predstavlja 1/3 ćelija u ko-kulturi, adhezija soja ZIM 2369 inhibirana za 50 %. Treba naglasiti da ovo smanjenje adhezije nije posledica niže koncentracije kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi, jer rezultati na Slici 15 pokazuju da veličina inokuluma nije značajno uticala na konačni rezultat adhezije.



**Slika 16.** Validacija testa adhezije ko-kulture patogenog kvasca *C. glabrata* i probiotskog kvasca *S. boulardii* na polistiren. Ispitivanje uticaja različitih koncentracije inokuluma probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju ko-kulture pri fiksnim koncentracijama inokuluma kvasca *C. glabrata*. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.

U trećem delu eksperimenta cilj je bio da se ispita kumulativna veličina inokuluma od  $2 \times 10^7$  ćelija/ml u svim kombinacijama ko-kultura, stoga su pomešane ćelije kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* u različitim odnosima. Korišćenjem različitih sojeva kvasca *C. glabrata* ZIM 2344, ZIM 2369 i ZIM 2382, testirana je i specifičnost sojeva. Na osnovu rezultata prikazanih grafički na Slici 17 može se uočiti da i) ćelije probiotskog kvasca *S. boulardii* su potpuno neadhezivne na polistiren površinu (pri odnosu od 100 % *S. boulardii* nije detektovana adhezija), ii) prisustvo probiotskog kvasca *S. boulardii* značajno je uticalo na adheziju kvasca *C. glabrata*, i iii) ovaj efekat je zavisen od sojeva kvasca *C. glabrata*. U slučaju sojeva ZIM 2344 i ZIM 2369 efekat je bio antagonistički, adheziju oba soja značajno je inhibirao probiotski kvasac u zavisnosti od koncentracije dodatih ćelija. Pri odnosu ćelija 50% *S. boulardii* / 50% *C. glabrata* u ko-kulturi, primećeno je značajno 50 % i 65 % smanjenje adhezije sojeva ZIM 2344 i ZIM 2369, respektivno. Međutim, kod soja ZIM 2382 efekat je bio slabo sinergistički. Pri odnosu 30% *S. boulardii* / 70% *C. glabrata* ZIM 2382 adhezija ko-kulture je značajno indukovana u poređenju sa pojedinačnom kulturom kvasca *C. glabrata* ( $P = 0.0025$ ). Sposobnost probiotskog kvasca *S. boulardii* da inhibira proces adhezije vrsta roda *Candida* otvara mogućnost za njegovu primenu u lečenju kandidijaze.



**Slika 17.** Validacija testa adhezije ko-kulture patogenog kvasca *C. glabrata* i probiotskog kvasca *S. boulardii* na polistiren. Ispitivanje uticaja različitih koncentracija inokuluma probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju ko-kulture pri recipročnim koncentracijama inokuluma kvasca *C. glabrata*. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.

Prema našem saznanju ovo su i prva istraživanja o uticaju probiotskog kvasca *S. boulardii* na adhezivna svojstva vrste *C. glabrata*. Rezultati su pokazali da prisustvo ćelija probiotskog kvasca *S. boulardii* značajno smanjuje vezivanje dva najadhezivnija soja patogenog kvasca *C. glabrata* ZIM 2344 i ZIM 2369 na polistiren površinu. Uprkos činjenici da su ćelije *S. boulardii* neadhezivne u ovoj studiji, može se pretpostaviti da probiotski kvasac i dalje uspeva da zauzme deo površine tokom inkubacije i poremeti rast i adheziju ćelija kvasca *C. glabrata*. Takođe možemo pretpostaviti da se probiotski kvasac *S. boulardii* prilično vezuje za ćelije *C. glabrata* i na taj način prekida flokulaciju i adheziju kvasca *C. glabrata*. Ovu hipotezu mogu dodatno podržati izveštaji o galaktomananima ćelijskog zida probiotskog kvasca *S. boulardii* kao prebiotičkog faktora (Badia i sar., 2012), pošto su prethodne studije pokazale da prisustvo ćelija *S. boulardii* i njihov ekstrakt inhibiraju formiranje hifa, adherenciju i formiranje

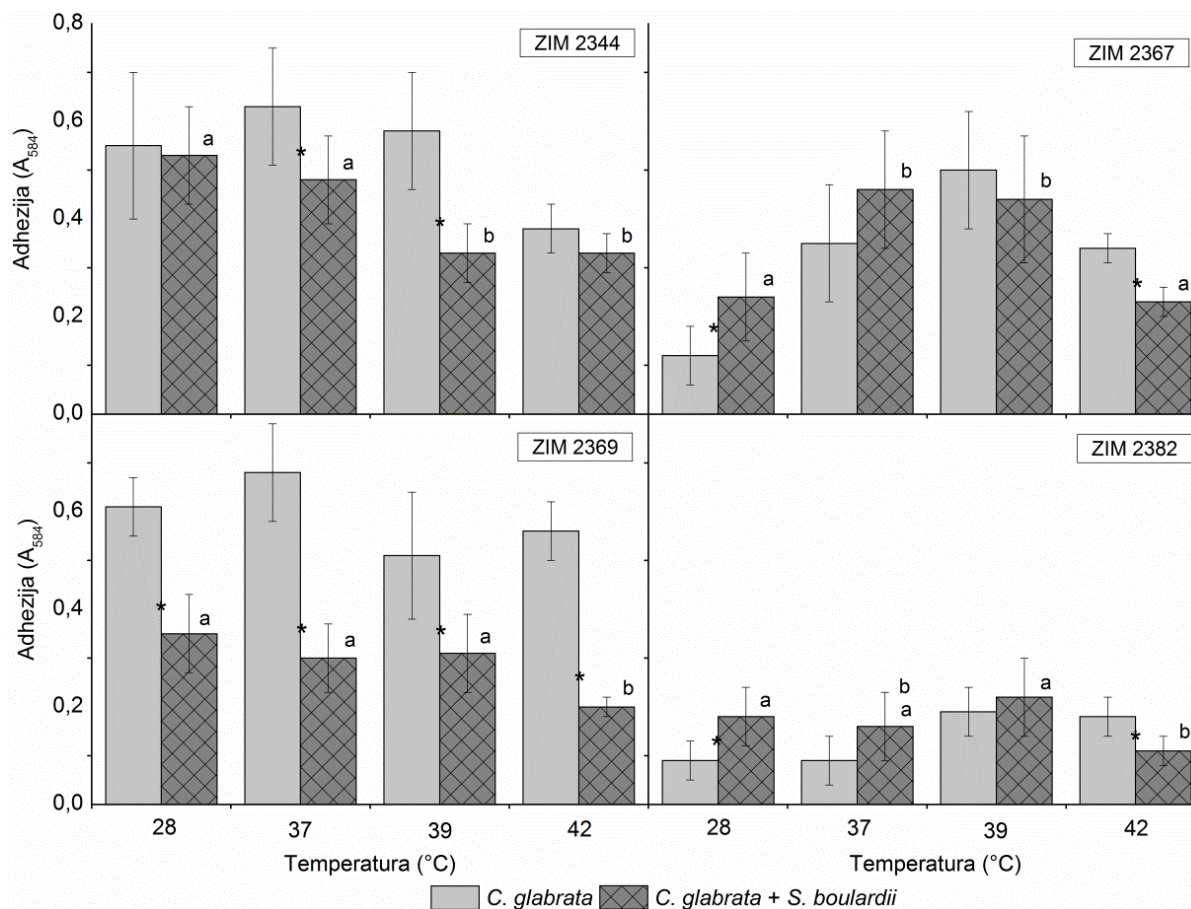
biofilma vrste *C. albicans* na plastične površine *in vitro* (Krasowska i sar., 2009; Murzyn i sar., 2010; Tiago i sar., 2012).

S druge strane, sinergistiki efekat je primećen u interakcija između kvasaca *C. glabrata* ZIM 2382 i *S. boulardii*. Očigledno povećanje broja adheriranih ćelija kvasca *C. glabrata* pri određenim koncentracijama može se objasniti flokulacijom između mikroorganizama (Domingues i sar., 2000; Soares, 2010). Uprkos kontradikciji sa predhodnom diskusijom, u ovom slučaju ćelije probiotskog kvasca *S. boulardii* mogu predstavljati vezu između ćelija kvasca *C. glabrata*. U daljem istraživanju bilo bi zanimljivo ispitati osobine ćelijskog zida sojeva ZIM 2344 i ZIM 2382, kao što su adhezini, i potražiti razlike. Drugo objašnjenje može uključiti jednu od prvih definicija probiotika kao sposobnih da podrže rast drugih mikroorganizama. Ipak, s obzirom na oba zapažanja, činjenica je da je efekat probiotskog kvasca *S. boulardii* u velikoj meri zavisao od sojeva vrste *C. glabrata*. Pored toga, možemo zaključiti i da se adhezivnost dve odvojene pojedinačne kulture ne može koristiti za predviđanje adhezivnosti njihove ko-kulture.

#### **5.4 Uticaj temperature na adheziju ko-kulture kvasaca *Saccharomyces boulardii* i *Candida glabrata* na polistiren površinu**

Pored specifičnosti sojeva, faktori životne sredine imaju veliki uticaj na rast ćelija, širenje i adheziju. Prilagođavanje promenama u okruženju je uslov za preživljavanje mnogih mikroorganizama (Penalva i Arst, 2002; Pumeesat i sar., 2017). Na formiranje biofilma utiču faktori sredine kao što su sastav medijuma, pH i temperatura. Iako postoje različita saopštenja o uspešnosti formiranja biofilmova pri različitim temperaturama, veliki broj autora naglašava značaj temperature pri istraživanju biofilmova (El-Azizi i sar., 1999; Karam El-Din i sar., 2012; 2017; Tomičić i Raspor, 2017). Rezultati ispitivanja uticaj probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju sojeva kvasca *C. glabrata* na polistiren površinu na temperaturama 28, 37, 39 i 42 °C su prikazani grafički na Slici 18.





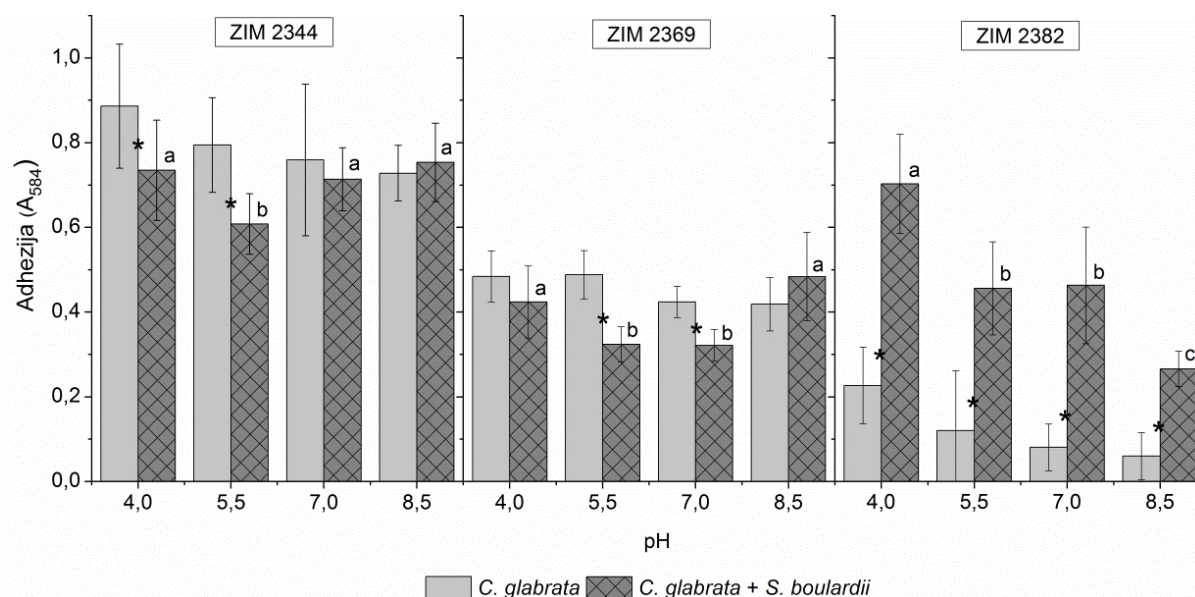
**Slika 18.** Ispitivanje uticaja temperature rasta na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Zvezdica obeležava značajne razlike između adhezije pojedinačne kulture i ko-kulture za svaku temperaturu i soj, dok slova a i b označavaju značajnu razliku između adhezije ko-kultura na različitim temperaturama, posebno za svaki soj.

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da temperatura inkubacije ima veliki uticaj na sposobnost adhezije. Rezultati su pokazali dve vrste ćelijskog odgovora na različite temperature: i) sojevi ZIM 2344 i ZIM 2369 su pokazali slabo smanjenje adhezije na povišenim temperaturama (42 °C), kako u pojedinačnoj kulturi tako i u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii*, dok su ii) sojevi ZIM 2367 i ZIM 2382 najviši stepen adhezije imali u srednjem temperaturnom opsegu, a najniži pri vrednostima temperature 28 °C ( $P < 0.05$ ). Ono što je još interesantnije je promena "*S. boulardii* efekta" od stimulativnog pri temperaturi 28 °C do represivnog pri 42 °C. Naime, adhezija sojeva ZIM 2367 i ZIM 2382 u ko-kulturi sa probiotskim kvascem na temperaturi 28 °C je povećana za 100 % u pređenju sa pojedinačnom kulturom, dok je adhezija obe ko-kulture na 42 °C smanjena za oko 30 % u

poređenju sa pojedinačnom kulturom. Može se pretpostaviti da je koncentracija ćelija probiotskog kvasca *S. boulardii* bila manja na 42 °C zbog sporijeg razmnožavanja i stoga je imala manji uticaj na adheziju kvasca *C. glabrata*. Međutim, ova hipoteza izostaje u slučaju sojeva ZIM 2344 i ZIM 2369, gde su ko-kulture pokazale sličan pad adhezije na temperaturama 28 i 42 °C. Rezultati pokazuju da je uticaj probiotskog kvasca *S. boulardii* veoma zavisian od sojeva vrste *C. glabrata*.

### 5.5 Uticaj pH na adheziju ko-kulture kvasaca *Saccharomyces boulardii* i *Candida glabrata* na polistiren površinu

Kod mnogih patogenih gljiva, pH se smatra važnim faktorom u adheziji na tkiva domaćina. U okviru ljudskog organizma vrsta *C. glabrata* pokriva širok opseg pH vrednosti od kiselog pH u želucu i vagini kroz neutralni i blago bazni u krvotoku i mnogim organima (Bairwa i Kaur, 2011; Monteagudo i sar., 2004). U okviru doktorske disertacije ispitan uticaj različitih vrednosti pH u opsegu od 4 do 8.5 na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren pri temperaturi od 37 °C.



**Slika 19.** Ispitivanje uticaja pH na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren pri temperaturi od 37 °C. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Zvezdica obeležava značajne razlike između adhezije pojedinačne kulture i ko-kulture za svaki pH i soj, dok slova a i b označavaju značajnu razliku između adhezije ko-kultura na različitim pH vrednostima, posebno za svaki soj.

Rezultati prikazani grafički na Slici 19 pokazuju da je pH imao slab uticaj na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*, dok je adhezija kvasca *C. glabrata* bila bolja u kiselom medijumu. Kao i u svim prethodnim eksperimentima probiotski kvasac je imao stimulatívni efekat na adheziju soja ZIM 2382, nivo adhezije ko-kulture je utrostručen pri čitavom opsegu pH u poređenju sa pojedinačnom kulturom. Takođe, sposobnost adhezije ovog soja je u velikoj meri zavisila od pH, sa najvišom vrednošću pri pH 4 i najnižom pri pH 8.5. S druge strane, adhezija oba soja ZIM 2344 i ZIM 2369 je bila najslabija pri neutralnom pH. Treba spomenuti da je pri pH 8.5 prvi put primećen "*S. boulardii* stimulatívni efekat" kod sojeva ZIM 2344 i ZIM 2369.

Uzimajući u obzir pojedinačne kulture može se zaključiti da sojevi kvasca *C. glabrata* imaju sposobnost da adheriraju pri svim vrednostima pH, ali sa značajnom tendencijom ka kiseloj sredini. Ovaj pronalazak je u skladu sa rezultatima adhezije vrsta *C. albicans* i *C. glabrata* na vaginalne epitelne ćelije koji su pokazali statistički značajnu povezanost između adhezije testiranih izolata i pH. Adhezija pri kiselom pH je bila znatno viša nego pri neutralnim i alkalnim uslovima (Fidel i sar., 1999; Karam El-Din i sar., 2012).

## **5.6 Antimikrobna aktivnost antimikotika na sojeve kvasca *Candida glabrata***

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti antimikotika flukonazola, itrakonazola i amfotericina B prema sojevima vrste *C. glabrata* su dobijeni primenom mikrodilucione metode. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) izražene u µg/ml, prikazane su u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Prikaz vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) ispitivanih antimikotika u  $\mu\text{g/ml}$ , određenih za 48 sojeva vrste *C. glabrata*. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina četiri ponavljanja.

Soj	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			Soj	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Fluc	Itra	AmphB		Fluc	Itra	AmphB
ZIM 2342	4	0.5	0.0625	ZIM 2366	2	2	0.125
ZIM 2343	2	0.5	0.25	ZIM 2367	4	2	0.125
ZIM 2344	1	0.5	0.125	ZIM 2368	4	2	0.125
ZIM 2345	4	1	0.25	ZIM 2369	8	1	0.0625
ZIM 2346	8	1	0.25	ZIM 2370	128	8	0.25
ZIM 2347	4	0.25	0.25	ZIM 2371	4	2	0.125
ZIM 2348	32	1	0.25	ZIM 2372	8	1	0.25
ZIM 2349	4	0.25	0.25	ZIM 2373	128	8	0.25
ZIM 2350	4	0.5	0.125	ZIM 2374	8	2	0.0625
ZIM 2351	4	0.5	0.25	ZIM 2375	2	0.5	0.125
ZIM 2352	4	0.5	0.25	ZIM 2376	4	0.5	0.25
ZIM 2353	4	1	0.25	ZIM 2377	16	0.5	0.25
ZIM 2354	4	2	0.25	ZIM 2378	8	2	0.0625
ZIM 2355	4	1	0.25	ZIM 2379	8	1	0.25
ZIM 2356	4	0.5	0.125	ZIM 2380	16	2	0.125
ZIM 2357	4	1	0.125	ZIM 2381	2	0.25	0.5
ZIM 2358	4	1	0.25	ZIM 2382	2	1	0.25
ZIM 2359	2	0.5	0.25	ZIM 2383	2	0.0625	0.125
ZIM 2360	4	1	0.25	ZIM 2384	4	1	0.25
ZIM 2361	4	0.5	0.25	ZIM 2386	64	4	0.125
ZIM 2362	8	2	0.125	ZIM 2387	128	4	0.125
ZIM 2363	8	2	0.125	ZIM 2388	4	1	0.125
ZIM 2364	8	2	0.125	ZIM 2390	128	16	0.0625
ZIM 2365	4	0.5	0.25	ZIM 2391	4	0.5	0.125

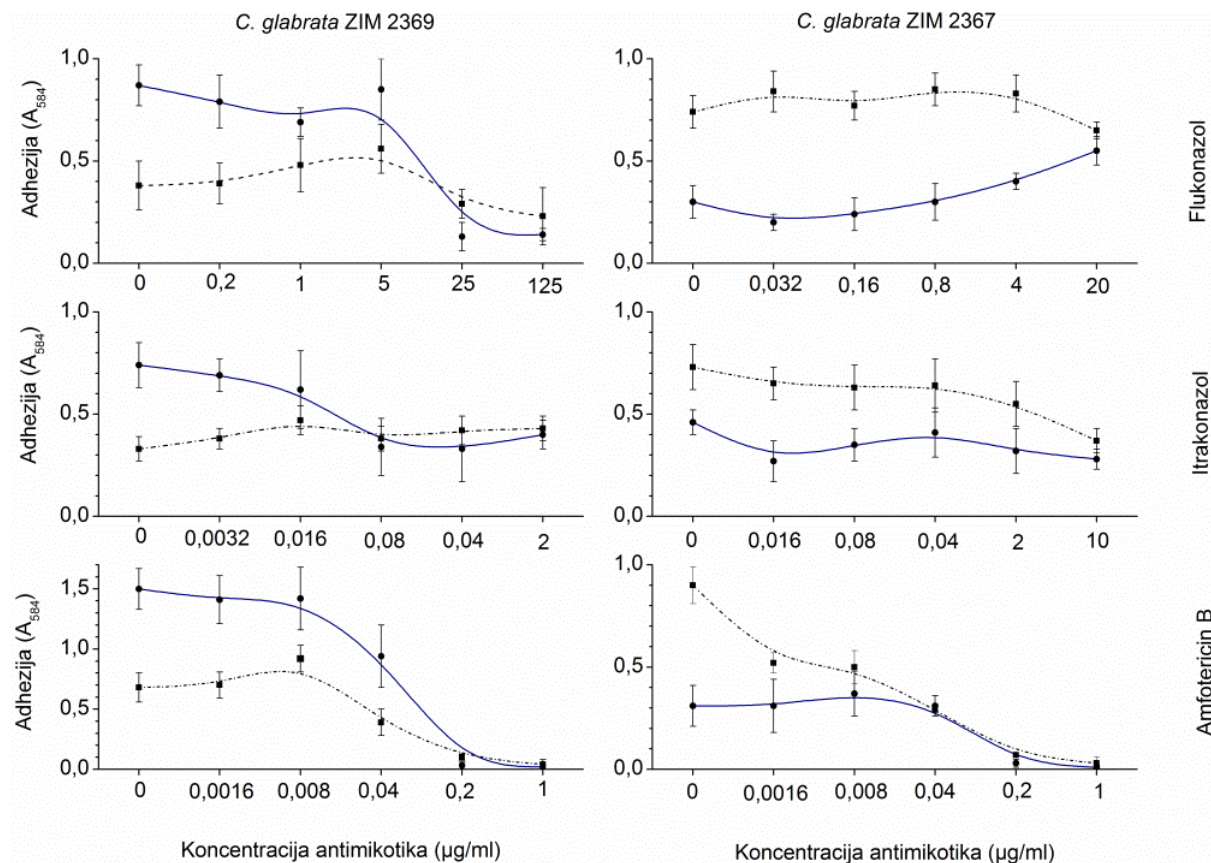
**Legenda:** Flukonazol (Fluc); Itrakonazol (Itra); Amfotericin B (AmphB).

Dobijene MIC vrednosti potvrđuju činjenicu da su sojevi u velikoj meri rezistentni na antimikotike iz grupe azola, flukonazol i itrakonazol. Visok stepen rezistencije ispoljili su na itrakonazol, 64 % od svih testiranih sojeva. Naročito otpornim se pokazao soj ZIM 2390 na koga je inhibitorno delovao flukonazol pri koncentraciji 128 µg/ml, dok je aktivnost itrakonazola bila pri koncentraciji 16 µg/ml. Među testiranim antimikoticima najefikasniji je bio amfotericin B na koji su svi sojevi kvasca *C. glabrata* pokazali osetljivost sa vrednostima MIC u opsegu od 0.0625 do 0.5 µg/ml. Vrednosti MIC za referentne sojeve kvasaca *C. albicans* ATCC 10261 i *C. krusei* CBS573 su bile za flukonazol 1 i 8 µg/ml, itrakonazol 0.25 i 2 µg/ml i amfotericin B 0.25 i 0.25 µg/ml, respektivno. Rezultati prethodnih istraživanja, kao i rezultati dobijeni u okviru ispitivanja u ovoj disertaciji, ukazuju na slabu aktivnost antimikotika iz grupe azola na različite vrste roda *Candida* (Lyon i sar., 2010; Sanguinetti i sar., 2005; Zupan i sar., 2015), dok je s druge strane amfotericin B pokazao izrazito jak inhibitorni efekat sa vrednostima MIC od 0.125 do 1 µg/ml (Kuhn i sar., 2002; Park i sar., 2006).

Rezistencija mikroorganizama na antimikrobne lekove predstavlja sve veći problem u savremenoj medicini. S obzirom da su gljivične infekcije često rekurentne, ponovljeno izlaganje antimikoticima može dovesti do razvoja rezistencije. Upotreba antimikotika nosi sa sobom i neke rizike, koji se ispoljavaju u vidu raznih neželjenih dejstava, preosetljivosti i interakcija sa drugim lekovima, koje pacijent koristi (Bondaryk i sar., 2013; Cannon i sar., 2009).

## 5.7 Uticaj antimikotika na adheziju ko-kulture kvasaca *Saccharomyces boulardii* i *Candida glabrata* na polistiren površinu

U ovom delu istraživanja ispitan je uticaj tri klinički važna antimikotika na odnos između patogenog kvasca *C. glabrata* i probiotskog kvasca *S. boulardii* tokom adhezije na polistiren površinu.



**Slika 20.** Ispitivanje uticaja antimikotika na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii* na polistiren pri temperaturi od 37 °C. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja je iznosila  $2 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja. Pojedinačna kultura (puna linija); ko-kultura (isprekidana linija).

Na osnovu rezultata grafički prikazanih na Slici 20 može se uočiti da su najniže koncentracije antimikotika koje su značajno inhibirale adheziju kvasca *C. glabrata* uglavnom bile više od vrednosti MIC određenih prema CLSI metodi. Vrednosti MIC sojeva ZIM 2369 i ZIM 2367 su

iznosile za flukonazol 8 i 4 µg/ml, itakonazol 1 i 2 µg/ml i amfotericin B 0.0625 i 0.125 µg/ml, respektivno.

Imajući u vidu inhibitorni efekat probiotskog kvasca na adheziju soja ZIM 2369, antimikotici nisu uticali na dodatno smanjenje nivoa adhezije ko-kulture. Visoke koncentracije antimikotika su imale relativno slabiji efekat na adheziju ko-kulture u poređenju sa adhezijom pojedinačne kulture kvasca *C. glabrata* ZIM 2369. Naime, pri visokoj koncentraciji flukonazola (125 µg/ml) nije postignuta potpuna supresija adhezije ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* ZIM 2369. U ovom slučaju adhezija ko-kulture pri koncentraciji 125 µg/ml flukonazola je bila dvostruko veća u poređenju sa pojedinačnom kulturom soja ZIM 2369, uprkos činjenicama da (i) adhezija bez dodatka antimikotika je bila dvostruko niža nego u pojedinačnoj kulturi, i (ii) vrednost MIC flukonazola za ovaj soj je bio nizak 8 µg/ml. Slično tome, nivo adhezije ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* ZIM 2369 je bio konstantan tokom čitavog testiranog opsega koncentracija itrakonazola (0 – 2 µg/ml), dok je vrednost MIC za itrakonazol iznosila 1 µg/ml.

S druge strane, u slučaju soja ZIM 2367 primećena je indukovana adhezija pri dodatku probiotskog kvasca *S. boulardii*. Još jedno zanimljivo zapažanje je da je kod viših koncentracija oba azola nestao indukcionni efekat kvasca *S. boulardii*, najverovatnije zbog supresije rasta probiotskog kvasca. Rezultati pokazuju interesantnu dinamiku, kao što je primećeno u našim prethodnim eksperimentima prisustvo probiotskog kvasca *S. boulardii* sprečava adheziju soja ZIM 2369 i stimuliše adheziju soja ZIM 2367. Međutim, može se uočiti da su visoke koncentracije azola deaktivirale "*S. boulardii* efekat" u oba slučaja, s obzirom da se adhezije ko-kultura pri visokim koncentracijama azola mogu uporediti sa adhezijom pojedinačnih kultura.

Među testiranim antimikoticima najbolju aktivnost je ispoljio amfotericin B. Izlaganje različitim koncentracijama amfotericina B u rasponu od 0.0016 do 1 µg/ml značajno je inhibiralo sposobnost adhezije sojeva kvasca *C. glabrata*, odnosno njihov rast u pojedinačnoj kulturi i u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii*. Adhezija je potpuno sprečena pri koncentraciji 1 µg/ml, što je do 16 puta više od vrednosti MIC dobijenih prema CLSI metodi. Ove vrednosti ukazuju koliko puta je slabije antimikrobno dejstvo na kvasac *C. glabrata* u biofilmu u odnosu na planktonsku formu. Ramage i sar. (2012) kao i Taff i sar. (2013) su ustanovili da su razlike u MIC vrednostima antimikotika kod planktonske forme drastično manje u odnosu na biofilm formu, ovo drastično smanjenje kod biofilma može da bude i preko 1000 puta.

Kvasci unutar biofilma su rezistentniji na dejstvo antimikotika u odnosu na planktonsku formu. Jedan od pretpostavljenih mehanizama rezistencije je nemogućnost prodiranja antimikotika u biofilm. Polimeri koji čine matriks biofilma otežavaju difuziju, tako da se neki antimikotici inaktiviraju u spoljnim delovima biofilma. Postoji horizontalni transfer rezistencije unutar biofilma. Biofilm može sadržati više vrsta roda *Candida* sa različitom rezistencijom na antimikotike. Jedno od objašnjenja je da neke ćelije u okviru zajednice nemaju dovoljno hrane i ne razmnožavaju se sve podjednako brzinom, ćelije koje se sporije razmnožavaju su manje osetljive na antimikotike (Silva i sar., 2017; Taff i sar., 2013).

Danas se javljaju nove ideje u pronalaženju antimikotičnih lekova. Problemi sa niskom selektivnošću klasičnih antimikotičnih molekula na definisane ciljne strukture gljiva, toksičnost i fungistatičko umesto fungicidno delovanje su nedostaci koji moraju da se prevaziđu. Iako postoji potreba za novim antimikoticima, rezultati istraživanja su još uvek nedovoljni. Usled visokog stepena rezistencije vrsta roda *Candida* na konvencionalne antimikotike, neprestano se traga za novim alternativnim agensima i razvijaju se strategije za prevazilaženje ovog problema. Interes za primenu probiotskih mikroorganizama u svrhu održavanja zdravlja i prevencije bolesti ili pak lečenja je u ekspanziji tokom poslednjih nekoliko godina i mogu se smatrati mogućom alternativom ili terapijskom dopunom klasičnim antifungalnim lekovima.

## **5.8 Interakcija kvasca *Candida glabrata* sa drugim vrstama mikroorganizmima u ko-kulturi**

Prisustvo drugih vrsta mikroorganizama, koji kolonizuju većinu ljudskih površina, povećava složenost takvih studija adhezije. Uopšteno gledano, mnoge današnje zarazne bolesti su direktno povezane sa biofilmovima u kojima više vrsta koegzistira. Kolonizacija ne-*albicans* *Candida* vrstama je u značajnom porastu poslednjih godina, posebnu zabrinutost predstavljaju oslabljeni pacijenti sa malignitetom i primaoci transplatacije koštane srži (Kaur i sar., 2016; Safdar i Armstrong, 2002). Pored probiotskog kvasca *S. boulardii*, u okviru istraživanja ispitana je adhezija kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa drugim vrstama mikroorganizama. Testirana su tri soja kvasca *C. glabrata*, kvasci *C. krusei* i *S. cerevisiae*, kao i dve vrste probiotskih bakterija *L. rhamnosus* i *L. casei*.



**Tabela 8.** Adhezija patogenog kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa drugim vrstama kvasaca i probiotskih bakterija na 37 °C. Vrednosti predstavljaju apsorbance na 584 nm nakon 24 h adhezije korišćenjem kristal violet testa. Koncentracija inokuluma svakog pojedinačnog soja u ko-kulturi je iznosila  $1 \times 10^7$  ćelija/ml. Podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija osam nezavisnih ponavljanja.

Soj	<i>Cg</i>	<i>Cg</i>	<i>Cg</i>	<i>Ck</i>	<i>Sc</i>	<i>Sb</i>	<i>Lr</i>	<i>Lc</i>	srednja vrednost
	ZIM 2344	ZIM 2369	ZIM 2382	CBS573	YJM311	-	ZIM B542	ZIM B538	
<i>Cg</i> ZIM 2344	0.95 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.10	0.63 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.09	0.63 $\pm$ 0.09	0.57 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.11	
<i>Cg</i> ZIM 2369	0.64 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.08	
<i>Cg</i> ZIM 2382	0.63 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.08	0.09 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.08	0.10 $\pm$ 0.04	
<i>Ck</i> CBS573	0.41 $\pm$ 0.09	0.27 $\pm$ 0.07	0.04 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	-	-	-	-	0.24
<i>Sc</i> YJM311	0.34 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.06	-	0.03 $\pm$ 0.02	-	-	-	0.25
<i>Sb</i> -	0.63 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.05	-	-	0.00	-	-	0.45
<i>Lr</i> ZIM B542	0.57 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.08	-	-	-	0.00	-	0.41
<i>Lc</i> ZIM B538	0.53 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.08	0.10 $\pm$ 0.04	-	-	-	-	0.00	0.37
srednja vrednost	0.50	0.40	0.14						
Skala apsorbance	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0			

**Legenda:** *Cg*, *Candida glabrata*; *Ck*, *Candida krusei*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Sb*, *Saccharomyces boulardii*; *Lr*, *Lactobacillus rhamnosus*; *Lc*, *Lactobacillus casei*.

Rezultati prikazani u Tabeli 8 pokazuju da su sojevi kvasaca *C. krusei* CBS573 i *S. cerevisiae* YJM311 imali manju sposobnost adhezije na polistiren površinu u poređenju sa sojevima kvasca *C. glabrata*, dok su probiotski sojevi bili neadhezivni na polistiren površinu.

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbanci adhezija ko-kulture sojeva kvasca *C. glabrata* ZIM 2344 i ZIM 2369 je znatno slabija (OD = 0.64) u poređenju sa adhezijom njihovih pojedinačnih kultura (OD = 0.95 i OD = 0.74, respektivno). S druge strane, sojevi kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa neadhezivnim patogenim sojevima kvasaca *C. krusei* i *S. cerevisiae* su imali manju sposobnost adhezije nego u ko-kulturi sa neadhezivnim probiotskim vrstama (*S. boulardii*, *L. rhamnosus* i *L. casei*). Interesantno je da je detektovana jednaka vrednost adhezije soja ZIM 2344 u ko-kulturi sa sojevima ZIM 2369 i ZIM 2382 (P = 0.94), bez obzira na činjenicu da je stepen adhezije pojedinačne kulture kvasca *C. glabrata* ZIM 2382 znatno manji (OD = 0.09) od stepena adhezije kvasca *C. glabrata* ZIM 2369 (OD = 0.74). Najsnažniji inhibicioni efekat na adheziju sojeva kvasca *C. glabrata* ZIM 2344 i ZIM 2369 je primećen od strane patogenih sojeva kvasaca *C. krusei* CBS573 i *S. cerevisiae* YJM311, dok je adhezija kvasca *C. glabrata* ZIM 2382 u ko-kulturi sa kvascem *S. cerevisiae* YJM311 stimulirana u poređenju sa pojedinačnim kulturama. Međutim, potrebna su dalja istraživanja mehanizama koji stoje iza takvih interakcija, koji odlučuju između represije i stimulacije formiranja biofilma.

Antimikrobna aktivnost probiotskih bakterija, posebno prema patogenim vrstama mikroorganizama, važno je funkcionalno svojstvo probiotskih bakterija, koje im osigurava prednost u kompeticiji za mesta vezivanja i hranjive materije u gastrointestinalnom traktu (Fijan, 2016). Izraženo antagonističko dejstvo prema patogenim mikroorganizmima, kao što su vrste *C. albicans*, *H. pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* i *C. difficile* detektovano je za mnoge probiotske sojeve, što značajno doprinosi stabilizaciji i moduliranju intestinalne mikrobiote (Rijkers i sar., 2010; Zarate i Nader-Macias, 2006). Antimikrobna aktivnost laktobacila je posledica sinteze supstanci poput organskih kiselina, vodonik peroksida, etanola, ali i bakteriocina (Servin, 2004; Sharma i Saharan, 2016). Posebna pažnja je poslednjih godina posvećena bakteriocinima, s obzirom na njihov značajan udeo u antimikrobnom potencijalu bakterija mlečne kiseline (Jamuna i Jeevaratnam, 2004). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su obe vrste probiotskih bakterija *Lactobacillus* imale sličan antagonistički efekat na adheziju sojeva kvasca *C. glabrata*. Korišćenje probiotskih bakterija za smanjenje prevalencije kvasaca u biofilmovima ostaje vredan pristup.

## 6 ZAKLJUČAK

Tokom istraživačkog rada u okviru doktorske teze uspeali smo da odgovorimo na postavljene hipoteze i stoga smo došli do sledećih zaključaka:

- Hidrofobnost površine ćelije kvasca *C. glabrata* određuje adheziju na abiotičke površine

Na osnovu rezultata kvantifikacije adheriranih ćelija sojeva kvasca *C. glabrata* na polistiren površinu ustanovljeno je da su se ispitivani sojevi međusobno razlikovali po sposobnosti adhezije, pri čemu su tri soja imala jaku sposobnost adhezije dok su preostali sojevi bili slabo adhezivni ili neadhezivni na polistiren površinu. Rezultati ispitivanja stepena hidrofobnosti površine ćelije su pokazali visok stepen hidrofobnosti kod sojeva koji su imali umerenu sposobnost adhezije na polistiren površinu, dok je najadhezivniji soj pokazao snažno hidrofilno ponašanje. Dakle, nije utvrđena korelacija između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije na polistiren površinu sojeva kvasca *C. glabrata*, što ukazuje da hidrofobnost ćelijskog zida ne mora uvek da bude precizna mera adhezivnog potencijala.

- Probiotski kvasac *S. boulardii* sprečava adheziju patogenog kvasca *C. glabrata*

Naši rezultati su pokazali značajan inhibitorni efekat probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju ćelija kvasca *C. glabrata* na polistiren površinu. Ovo je od značaja, jer su upravo planktonske ćelije te koje kolonizuju nove površine i omogućavaju širenje biofilma na udaljena mesta. S druge strane, primećen je blagi stimulatívni efekat probiotskog kvasca na adheziju određenih sojeva kvasca *C. glabrata*, što naglašava važnost specifičnosti sojeva i otvara dalje istraživačke interese za ispitivanje svojstava ćelijskog zida, što može objasniti ove razlike.

- Promena temperature i pH vrednosti utiču na vijabilnost adheriranih ćelija kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*

Faktori životne sredine, temperatura i pH, značajno su uticali na interakciju između kvasca *C. glabrata* i *S. boulardii* tokom adhezije na polistiren površinu. Uticaj probiotskog kvasca *S. boulardii* je veoma zavisio od sojeva vrste *C. glabrata*. Primećene su dve vrste ćelijskog odgovora na različite temperature, i) adhezija u slučaju sojeva ZIM 2344 i ZIM 2369 je relativno jednako smanjena u svim testiranim temperaturnim opsezima, dok je ii) adhezija u slučaju sojeva ZIM 2367 i ZIM 2382 značajno stimulísana na 28 °C ( $P < 0.5$ ) i inhibirana na

42 °C ( $P < 0.5$ ). Pored toga, pH je imao slab uticaj na adheziju ko-kulture kvasaca *C. glabrata* i *S. boulardii*, dok je adhezija kvasca *C. glabrata* bila bolja u kiselom medijumu.

- Flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata*

Najniže koncentracije antimikotika koje su značajno inhibirale adheziju kvasca *C. glabrata* uglavnom su bile više od vrednosti MIC određenih prema CLSI metodi. Sojevi kvasca *C. glabrata* su ispoljili visok stepen rezistencije na antimikotike iz grupe azola, naročito itrakonazol sa vrednostima MIC u rasponu od 1 do 32 µg/ml. Amfotericin B je bio najefikasniji antimikotik na koji su svi klinički sojevi kvasca *C. glabrata* pokazali osetljivost.

- Flukonazol, itrakonazol i amfotericin B inhibiraju adheziju kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa probiotskim kvascem *S. boulardii*

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su antimikotici imali slabiji efekat na adheziju ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata* u poređenju sa adhezijom pojedinačne kulture kvasca *C. glabrata*. Visoke koncentracije azola su deaktivirale "S. boulardii efekat" kod oba testirana soja, s obzirom da se adhezije ko-kultura pri visokim koncentracijama azola mogu uporediti sa adhezijom pojedinačnih kultura. Među testiranim antimikoticima najbolju aktivnost je ispoljio amfotericin B. Može se spekulisati da probiotski kvasac *S. boulardii* može zameniti efekat antimikotika u određenom rasponu koncentracija i kod specifičnih tipova sojeva.

## 7 LITERATURA

- Ahmad K.M., Kokošar J., Guo X., Gu Z., Ishchuk O.P., Piškur J. (2014). Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 14: 529–535.
- Andrade M.J., Rodriguez M., Sanchez B., Aranda E., Cordoba J.J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1) 48 – 58.
- Alem M.A.S., Oteef M.D.Y., Flowers T.H., Douglas L.J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5: 1770-1779.
- Al-Fattani M.A., Douglas L.J. (2004). Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9): 3291–3297.
- Andes D., Nett J., Oschel P., Albrecht R., Marchillo K., Pitula A. (2004). Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and Immunity*, 72(10): 6023-6031.
- Ashley E.S.D., Lewis R., Lewis J.S., Martin C., Andes D. (2006). Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clinical Infectious Diseases*, 43(1): S28–S39.
- Badia R., Zanello G., Chevaleyre C., Lizardo R., Meurens F., Martínez P., Brufau J., Salmon H. (2012). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and beta-galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged *in vitro* with *Escherichia coli* F4 (K88). *Veterinary Research*, 43: 4.
- Bairwa G., Kaur R. (2011). A novel role for a glycosylphosphatidylinositol-anchored aspartyl protease, CgYps1, in the regulation of pH homeostasis in *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology*, 79(4): 900–913.
- Bassetti M., Righi E., Costa A., Fasce R., Molinari M.P., Rosso R., Pallavicini F.B., Viscoli C. (2006). Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infectious Diseases*, 6: 21.
- Bink A., Pellens K., Cammue B.P.A., Thevissen K. (2011). Anti-biofilm strategies: how to eradicate *Candida* biofilms? *The Open Mycology Journal*, 5: 29-38.

- Bondaryk M., Kurzątkowski W., Staniszewska M. (2013). Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(5): 293-301.
- Brugnoni L.I., Lozano J.E., Cubitto M.A. (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40: 332-340.
- Bruke S., Hube B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular Microbiology*, 15(5): 701–708.
- Butel M.J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1): 1-8.
- Camacho D.P., Gasparetto A., Svidzinski T.I. (2007). The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia*, 163(5): 261–266.
- Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Review*, 22: 291–321.
- Casalone E., Barberio C., Cappellini L., Polsinelli M. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Research in Microbiology*, 156(2): 191-200.
- Cassone M., Serra P., Mondello F., Girolamo A., Scafetti S., Pistella E., Venditti M. (2003). Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11): 5340-5343.
- Cauda R. (2009). Candidaemia in patients with an inserted medical device. *Drugs*, 1: 33-38.
- Chae M.S., Schraft H., Truelstrup Hansen L., Mackereth R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, 23(3): 250-259.
- Chaffin W.L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3): 495-544.
- Chandra J., Kuhn D.M., Murkherjee P.K., Hoyer L.L., McCormic, T., Ghannoum M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18): 5385-5394.

- Chen S.C.A., Slavin M.A., Sorrell T.C. (2011). Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections. *Drugs*, 71(1): 11-41.
- CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Vol. 28, No. 14. Wayne, PA, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute: 25 str.
- Csank C., Haynes K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 115-120.
- Czerucka D., Piche T., Rampal P. (2007). Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26: 767-778.
- Czerucka D., Rampal P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*, 4(7): 733–739.
- De Groot P.W.J., Kraneveld E.A., Yin Q.Y., Dekker H.L., Gross U., Crielaard W., de Koster C.G., Bader O., Klis F.M., Weig M. (2008). The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: Differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eucariotic cell*, 7(11): 1951–1964.
- De Las Peñas A., Pan S.J., Castaño I., Alder J., Cregg R., Cormack B.P. (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAPI- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes and Development*, 17: 2245–2258.
- Domingues L., Vicente A.A., Lima N., Teixeira J.A. (2000). Applications of Yeast Flocculation in Biotechnological Processes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5: 288-305.
- Dongari-Bagtzoglou A., Kashleva H., Dwivedi P., Diaz P., Vasilakos J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2009, 4(11): e7967.
- Donlan R.M., Costerton J.M. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167-193.
- Douglas L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1): 30-36.
- Doyle A., Griffiths J. B. (1999). Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology. 1th ed. Chichester, Wiley: 332 str.

- El-Azizi M., Khardori N. (1999). Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37: 941-951.
- Eschenauer G., DePestel D.D., Carver P.L. (2007). Comparison of echinocandin antifungals. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(1): 71–97.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization, London, Ontario, Canada.
- Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1): 80-96.
- Fijan S. (2016). Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens, Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, Dr. Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/63141. Available from: <https://mts.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/antimicrobial-effect-of-probiotics-against-common-pathogens>.
- Finkel J.S., Mitchell A.P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2): 109-118.
- Floch M., (2014). Recommendations for probiotic use in humans - A 2014 update. *Pharmaceuticals*, 7(10): 999–1007.
- Freydiere A.M., Robert R., Ploton C., Marot-Leblond A., Monerau F., Vandenesch F. (2003). Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8): 3861-3863.
- Fricker-Hidalgo H., Vandapel O., Duchesne M.A., Mazoyer M.A., Monget D., Lardy B., Lebeau B., Freney J., Ambroise-Thomas P., Grillot R. (1996). Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7): 1846-1848.
- Gáscer A., Trofa D., Schäfer W., Nosanchuk J.D. (2007). Targeted gene detection in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(19): 3049-3058.
- Ghannoum M.A., Rice L.B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 501–517.



- Gow N.A., Brown A.J., Odds F.C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 366-371.
- Gow N.A., van de Veerdonk F.L., Brown A.J., Netea M.G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2): 112-22.
- Hay R.J. (2006). Fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 24: 201-212.
- Hazen B.W., Hazen K.C. (1988). Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 56(9): 2521–2525.
- Hazen K.C. (1989). Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 57(7): 1894-1900.
- Hazen K.C., Plotkin B.J., Klimas D.M. (1986). Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infection and Immunity*, 54(1): 269–271.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S–73S.
- ICZN. (2014). What is a nomen nudum. London, International Commission on Zoological Nomenclature: 1 str. <http://iczn.org/content/what-nomen-nudum> (december 2014).
- Im E., Pothoulakis C. (2010). Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(1): 62-70.
- Iraqi I., Garcia-Sanchez S., Aubert S., Dromer F., Ghigo J.M., d'Enfert C., Janbon G. (2005) The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway *Molecular Microbiology*, 55 (4): 1259–1271.
- Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A., Meiller T.F. (2004). Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 14-19.
- Jamuna M., Jeevaratnam K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50(2): 79-90.

- Karam El-Din A-Z.A., Al-Basri H.M., El-Naggar M.Y. (2012). Critical factors affecting the adherence of *Candida albicans* to the vaginal epithelium. *Journal of Taibah University for Science*, 6: 10–18.
- Kaur R., Dhakad M.S., Goyal R., Kumar R. (2016). Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5): 455-460.
- Kaur R., Domergue R., Zupancic M.L., Cormack B.P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, 8:378–384.
- Kelesidis T., Pothoulakis C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(2): 111-125.
- Khatri I., Akhtar A., Kaur K., Tomar R., Prasad G.S., Ramya T.N., Subramanian S. (2013). Gleaning evolutionary insights from the genome sequence of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Gut Pathogens*, 5 (1): 1- 8.
- Klis F.M., Boorsma A., de Groot P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23: 185-202.
- Klis F.M., de Groot P., Hellingwerf K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 39 (1): 1-8.
- Klotz S.A., Drutz D.J., Zajic J.E. (1985). Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infection and Immunity*, 50(1): 97–101.
- Kojic E.M., Darouiche R.O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2): 255–267.
- Kollar R., Reinhold B.B., Petrakova E., Yeh H.J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J.C., Klis F.M., Cabib E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(28): 17762-75.
- Kontoyiannis D.P., Lewis R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*, 359(9312): 1135-1144.
- Krasowska A., Murzyn A., Dyjankiewicz, A., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D. (2009). The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research*, 9(8): 1312-1321.

- Kruppa M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*, 52(1): 1-10.
- Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1773-1780.
- Lewis K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2): 267-274.
- Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A. (2007). *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, 86: 204-215.
- Li X. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149: 353-362.
- Luo G., Samaranayake L.P. (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS*, 110: 601-610.
- Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M., Kelly S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*, 8(2): 76–81.
- Lyon G.M., Karatela S., Sunay S., Adiri Y. (2010). Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4): 1270–1275.
- Malani A., Hmoud J., Chiu L., Carver P.L., Bielaczyc A., Kauffman C.A. (2005). *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clinical Infectious Diseases*, 41(7), 975–981.
- Markowiak P., Slizewska K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9: 1-30.
- Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C., Andrade A.F. (1999). Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corinebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology*, 38(1): 37-42.
- Mayer F.L., Wilson D., Hube B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2): 119–128.
- McFarland L.V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18): 2202-2022.

- Mitterdorfer G., Mayer H.K., Kneifel W., Viernstein H. (2002). Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4): 521-530.
- Monteagudo C., Viudes A., Lazzell A., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L. (2004). Tissue invasiveness and non-acidic pH in human candidiasis correlate with “in vivo” expression by *Candida albicans* of the carbohydrate epitope recognised by new monoclonal antibody 1H4. *Journal of Clinical Pathology*, 57(6): 598–603.
- Mowat E., Butcher J., Lang S., Williams C., Ramage G. (2007). Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9): 1205-1212.
- Murzyn A., Krasowska A., Augustyniak D., Majkowska-Skrobek G., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D. (2010). The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. *FEMS Microbiology Letters*, 310: 17-23.
- Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67(3): 400–428.
- Nett J.E., Marchillo K., Spiegel C.A., Andes D.R. (2010). Development and validation of an *in vivo* *Candida albicans* biofilm denture model. *Infection and Immunity*, 2010; 78(9): 3650-3659.
- Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15: 300-310.
- Nguyen V.T., Turner M.S., Dykes G.A. (2011). Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Campylobacter* to abiotic surfaces. *Food Microbiology*, 28(5): 942-950.
- Nickerson K.W., Atkin A.L., Hornby J.M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6): 3805-3813.
- Nobile C.J., Nett J.E., Andes D.R., Mitchell A.P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic Cell*, 5(10): 1604–1610.
- Nobile C.J., Mitchell A.P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular Microbiology*, 8(9): 1382-1391.
- Park B.J., Arthington-Skaggs B.A., Hajjeh R.A., Iqbal N., Ciblak M.A., Lee-Yang W., Hairston M.D., Phelan M., Plikaytis B.D., Sofair A.N., Harrison L.H., Fridkin S.K.,

- Warnock D.W. (2006): Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4): 287–1292.
- Penalva M.A., Arst H.N. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 426–446.
- Penna F.J., Filho L., Calçado A.C., Junior H.R., Nicolli J.R. (2000). Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. *Jornal de Pediatria*, 76(1): 209-217.
- Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., Newell V.A., Ellis D., Tullio V., Rodloff A., Fu W., Ling T.A. (2010). Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4): 1366-1377.
- Pincus D.H., Orenga S., Chatellier S. (2007). Yeast identification — past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45(2): 97–121.
- Pothoulakis C. (2009): Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 30(8): 826–833.
- Pumeesat P., Muangkaew W., Ampawong S., Luplertlop N. (2017). *Candida albicans* biofilm development under increased temperature, *New Microbiologica*, 40 (4), 279-283.
- Radulović Z., Petrović T., Bulajić S. (2012). Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria, U: Pana, M.(Ed.): *Antibiotic Resistant Bacteria, A Continuous Challenge in the New Millenium*, 26: 549-576. InTech publisher, Rijeka, Croatia.
- Qamar A., Aboudola S., Warny M., Michetti P., Pothoulakis C., LaMont J.T., Kelly C.P. (2001). *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infection and Immunity*, 69 (4): 2762–2765.
- Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L. (2006). *Candida* biofilms implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6: 979-986.
- Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012: 528521.
- Ramage G., Saville S.P., Wickes B.L. Lopez-Ribot J.L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11): 5459-5463.

- Ramani R., Gromadzki S., Pincus D.H., Salkin I.F., Chaturvedi V. (1998). Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11): 3396-3398.
- Rijkers G. T., Bengmark S., Enck P., Haller D., Herz U., Kalliomaki M., Kudo S., Lenoir-Wijnkoop I., Mercenier A., Myllyluoma E., Rabot S., Rafter J., Szajewska H., Watzl B., Wells J., Wolvers D., Antoine J.-M. (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *The Journal of Nutrition*, 140: 671S-676S.
- Rodrigues A.C., Cara D.C., Fretez S.H., Cunha F.Q., Vieira E.C., Nicoli J.R., Vieira L.Q. (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3): 404-414.
- Rosenberg M. (1984). Ammonium sulphate enhances adherence of *Escherichia coli* J-5 to hydrocarbon and polystyrene. *FEMS Microbiology Letters*, 25: 41-45.
- Ruiz-Herrera J., Elorza M.V., Valentin E., Sentandreu R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*, 6: 14-29.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3): 197-215.
- Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14: 491-509.
- Safdar A., Armstrong D. (2002). Prospective evaluation of *Candida* species colonization in hospitalized cancer patients: impact on short-term survival in recipients of marrow transplantation and patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 30(12): 931-935.
- Samaranayake Y.H., Ye J., Yau J.Y.Y., Cheung B.P.K., Samaranayake L.P. (2005). In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 818-825.
- Sanders M.E., Guarner F., Guerrant R., Holt P.R., Quigley E.M., Sartor R.B., Sherman P.M., Mayer E.A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5): 787-796.

- Sanguinetti M., Posteraro B., Fiori B., Ranno S., Torelli R., Fadda G. (2005). Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2): 668–679.
- Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48: 365–377.
- Seneviratne C.J., Jin L., Samaranyake L.P. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, 14: 582-590.
- Servin A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4): 405-440.
- Sharma D., Saharan B.S. (2016). Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Reports*, 11: 27-35.
- Shinde R.B., Raut J.S., Karuppayil M.S. (2012). Biofilm formation by *Candida albicans* on various prosthetic materials and its fluconazole sensitivity: a kinetic study. *Mycoscience*, 53: 220–226.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 19(5): 241-247.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira, R., Williams D.W., Azeredo J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2): 288-305.
- Silva S., Rodrigues C.F., Araújo D., Rodrigues M.E., Henriques M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *Journal of Fungi*, 3(1): 8; doi:10.3390/jof3010008.
- Silva-Dias A., Miranda I.M., Branco J., Monteiro-Soares M., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 6: 205.
- Sleator R.D., Hill C. (2008). New frontiers in probiotic research. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2): 143-147.
- Snyderman D.R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46: S104–11.

- Soares E.V. (2010). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1): 1–18.
- Stepanović S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabić-Vlaković M. (2012). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2): 175–179.
- Sudbery P., Gow N., Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12: 317-324.
- Taff H.T., Mitchell K.F., Edward J.A., Andes D.R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10): 1325-1337.
- Tevyashova A.N, Olsufyeva E.N., Solovieva S.E., Printsevskaya S.S., Reznikova M.I., Trenin A.S., Galatenko O.A., Treshalin I.D., Pereverzeva E.R., Mirchink E.P., Isakova E.B., Zotchev S.B., Preobrazhenskaya M.N. (2013). Structure - Antifungal activity relationships of polyene antibiotics of the Amphotericin B group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8): 3815–3822.
- Tiago F.C.P., Martins F.S., Souza E.L.S., Pimenta P.F.P., Araujo H.R.C., Castro I.M., Brandao R.L., Nicoli J.R. (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1194–1207.
- Tomičić R., Raspor P. (2017). Influence of growth conditions on adhesion of yeast *Candida* spp. and *Pichia* spp. to stainless steel surfaces. *Food Microbiology*, 65: 179-184.
- Tomičić R., Tomičić Z., Raspor P. (2017). Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to Wooden Surfaces. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1): 138–142.
- Tomičić Z., Čolović R., Čabarkapa I., Vukmirović Đ., Đuragić O., Tomičić R. (2016a). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43 (2): 103-110.
- Tomičić Z., Zupan J., Matos T., Raspor P. (2016b). Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) modulates adhesive properties of *Candida glabrata*. *Medical Mycology*, 54(8): 835–845.
- Trofa D., Gacser A., Nosanchuk J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4): 606-625.
- Ullah A., Lopes M.I., Brul S., Smits G.J. (2013). Intracellular pH homeostasis in *Candida glabrata* in infection-associated conditions. *Microbiology*, 159: 803-813.



- van der Aa Kuhle A., Jespersen L. (2003). The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(4): 564-571.
- van der Aa Kuhle A., Skovgaard K., Jespersen L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1): 29-39.
- Vasiljevic T., Shah N.P. (2008). Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7): 714-728.
- Vaughan-Martini A., Martini A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1883). Vb: The yeasts. 4th ed. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). London, Elsevier: 358-371.
- Verstrepen K.J., Klis F.M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60(1): 5-15.
- Walker G.M. (2000). Yeasts. V: *Eyclopedia of microbiology*. Vol. 4. 2<sup>nd</sup> ed. Lederberg J. (ed.). San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic press, 939 – 953.
- Wingard J.R., Leather H. (2004). A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 10(2): 73-90.
- Wohlgemuth S., Gunnar Loh G., Blaut M. (2010). Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 3–10.
- Zanello G., Meurens F., Berri M., Salmon H. (2009). *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 11(1): 47-58.
- Zarate G., Nader-Macias M.E. (2006). Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2):174–180.
- Zupan J. (2010). Opredelitev invazivne rasti v populaciji kliničnih in nekliničnih sevov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija, Biotehnički fakultet, Ljubljana.

- Zupan J., Avbelj M., Butinar B., Kosel J., Šergan M., Raspor P. (2013). Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10): 2496–2505.
- Zupan J., Tomičić Z., Raspor P. (2015). Determination of MICING: a new assay for assessing minimal inhibitory concentration for invasive growth. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5): 1023–1030.

## 8 PRILOZI

Starost kulture	Adhezija ( $A_{584}$ ) $\pm$ SD						
	<i>S. boulardii</i>	<i>C. glabrata</i> ZIM 2344	ZIM 2344 i <i>S. boulardii</i>	<i>C. glabrata</i> ZIM 2369	ZIM 2369 i <i>S. boulardii</i>	<i>C. glabrata</i> ZIM 2382	ZIM 2382 i <i>S. boulardii</i>
24 h	0.0121 $\pm$ 0.0112	0.8435 $\pm$ 0.0213	0.5782 $\pm$ 0.0132	0.5843 $\pm$ 0.0345	0.4476 $\pm$ 0.0447	0.1063 $\pm$ 0.0357	0.01852 $\pm$ 0.0319
48 h	0.0134 $\pm$ 0.0121	1.2526 $\pm$ 0.0413	0.6386 $\pm$ 0.0354	0.7756 $\pm$ 0.0632	0.5457 $\pm$ 0.0461	0.15650 $\pm$ 0.0337	0.2413 $\pm$ 0.0399

**Prilog A.** Optimizacija starosti kulture na MEA pločama za test adhezije ko-kulture kvasaca *S. boulardii* i *C. glabrata*.

Rastvorljiv u vodi (flukonazol)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	soj 1
B	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	
C	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	
D	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	
E	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	soj 2
F	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	
G	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	
H	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	K+	RPMI	

**Prilog B1.** Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije antimikotika flukonazola ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Rastvorljiv u DMSO (amfotericin B, itrakonazol)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
B	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
C	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
D	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
E	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
F	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI
H	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	K+	RPMI

**Prilog B2.** Šematski prikaz mikrotitar ploče pri određivanju minimalne inhibitorne koncentracije antimikotika amfotericina B i itrakonazola ( $\mu\text{g/ml}$ ).

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:	
RBR	
Identifikacioni broj:	
IBR	
Tip dokumentacije:	Monografska publikacija
TD	
Tip zapisa:	Tekstualni štampani materijal
TZ	
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):	Doktorska disertacija
VR	
Ime i prezime autora:	Zorica Tomičić, dipl. inženjer tehnologije – master
AU	
Mentor (titula, ime, prezime,zvanje):	Prof. dr Siniša Dodić, redovni profesor
MN	Prof. dr Peter Raspor, redovni profesor
Naslov rada:	Uticaj probiotskog kvasca <i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i> na adheziju <i>Candida glabrata</i>
NR	
Jezik publikacije:	srpski, latinica
JP	
Jezik izvoda:	srpski / engleski
JI	
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija
ZP	
Uže geografsko područje:	AP Vojvodina
UGP	
Godina:	2018
GO	
Izdavač:	Autorski reprint
IZ	

Mesto i adresa:	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
MA	
Fizički opis rada:	8 poglavlja, 74 stranica, 20 slike, 8 tabela, 152
FO	literaturna navoda
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
NO	
Naučna disciplina:	Biotehnologija
ND	
Predmetna odrednica, ključne reči:	Adhezija, <i>Candida glabrata</i> , <i>Saccharomyces</i>
PO	<i>boulardii</i>
UDK	
Čuva se:	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom
ČU	Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena:	Nema
VN	
Izvod:	
IZ	

Široka upotreba imunosupresivnih terapija zajedno sa antimikotičnim terapijama šitokog spektra značajno je povećala učestalost površinskih i sistemskih infekcija uzrokovanih patogenim kvascem *Candida glabrata*. Zbog povećane rezistentnosti vrste *C. glabrata* na klasične antimikotike, javila se potreba za pronalaskom novih alternativa u prevenciji i lečenju infekcija izazvanih ovim patogenom. Tokom poslednjih nekoliko godina se u velikoj meri razmatra potencijalni benefit probiotskih mikroorganizama na zdravlje ljudi. Pored primene brojnih probiotskih bakterija, *Saccharomyces boulardii* je jedina vrsta kvasca za koju je dokazano da poseduje svojstva koja karakterišu probiotike.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja probiotskog kvasca *S. boulardii* na adheziju kvasca *C. glabrata* na polistiren površinu pri različitim temperaturama, pH vrednostima i u prisustvu različitih koncentracija tri klinički važna antimikotika kao što su flukonazol, itrakonazol i amfotericin B. Hidrofobnost površine ćelije (CSH) sojeva kvasca *C. glabrata* je određena u cilju procene korelacije između ove fizičko-hemijske osobine i adhezije na polistiren površinu. Pored toga, ispitana je adhezija kvasca *C. glabrata* u ko-kulturi sa drugim vrstama mikroorganizama. Testirana su tri soja kvasca *C. glabrata*, kvasci *Candida krusei* i *Saccharomyces cerevisiae*, kao i dve vrste probiotskih bakterija *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus casei*. Metoda korišćena za procenu adhezije bila je bojenje kristal violetom, dok je hidrofobnost površine ćelije sojeva kvasca *C. glabrata* određena

testom Mikrobne adhezije na ugljovodonike.

Naši rezultati su pokazali da uprkos neadhezivnosti ćelija probiotskog kvasca *S. boulardii*, ovaj probiotik je značajno uticao na sposobnost adhezije kvasca *C. glabrata*. Ovaj efekat je bio veoma zavisao od sojeva vrste *C. glabrata*, i bio je antagonistički ili sinergistički. Što se tiče faktora životne sredine, temperatura nije pokazala značajan uticaj na modulatorni efekat probiotskog kvasca *S. boulardii*, dok pri visokoj pH vrednosti, probiotski kvasac nije uspeo da potisne adheziju sojeva kvasca *C. glabrata*. Sličan efekat je primećen u eksperimentima sa antimikoticima, gde su povećane koncentracije antimikotika smanjile modulatorni efekat *S. boulardii* na adheziju *C. glabrata*. Sojevi vrste *C. glabrata* u ko-kulturi sa neadhezivnim patogenim sojevima vrsta *C. krusei* i *S. cerevisiae* su pokazali slabiju adheziju nego u ko-kulturi sa neadhezivnim probiotskim sojevima vrste *S. boulardii*, *L. rhamnosus* i *L. casei*. Što ukazuje da se adhezivnost dve odvojene kulture ne može koristiti za predviđanje adhezivnosti njihove ko-kulture. Nije utvrđena korelacija između hidrofobnosti površine ćelije i adhezije na polistiren površinu sojeva kvasca *C. glabrata*, što ukazuje da hidrofobnost ćelijskog zida ne mora uvek da bude precizna mera adhezivnog potencijala.

Datum prihvatanja teme od strane 09.07.2015.

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

**Prof. dr Jovana Grahovac**, vanredni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
predsednik komisije

**Prof. dr Siniša Dodić**, redovni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,  
mentor

**Prof. dr Peter Raspor**, redovni profesor,  
Fakultet zdravstvenih nauka, Univerzitet  
Primorska, mentor

**Prof. dr Dragiša Savić**, redovni profesor,  
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Leskovcu,  
član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:	
ANO	
Identification number:	
INO	
Document type:	Monographic publication
DT	
Type of record:	Textual printed material
TR	
Contents code:	Doctoral Dissertation
CC	
Author:	Zorica Tomičić, MSc
AU	
Mentor:	Prof. dr Siniša Dodić, full professor
MN	Prof. dr Peter Raspor, full professor
Title:	The influence of probiotic yeast <i>Saccharomyces</i>
TI	<i>boulardii</i> on the adhesion of <i>Candida glabrata</i>
Language of text:	Serbian, latin
LT	
Language of abstract:	Serbian / English
LA	
Country of publication:	Republic of Serbia
CP	
Locality of publication:	AP Vojvodina
LP	
Publication year:	2018
PY	
Publisher:	Author's reprint
PU	



Publication place: Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia  
PP  
Physical description: 8 chapters, 74 pages, 20 figures, 8 tables, 152  
PD references  
Scientific field: Technological Engineering  
SF  
Scientific discipline: Biotechnology  
SD  
Subject, Key words: Adhesion, *Candida glabrata*, *Saccharomyces*  
SKW *boulardii*  
UC  
Holding data: Library of Faculty of Technology, Novi Sad  
HD  
Note: None  
N  
Abstract:  
AB

Following the widespread use of immunosuppressive therapy together with broadspectrum antimycotic therapy, the frequency of mucosal and systemic infections caused by the pathogenic yeast *Candida glabrata* has increased in the past decades. Due to the resistance of *C. glabrata* to existing azole drugs, it is very important to look for new strategies helping the treatment of such fungal diseases. An increasing number of potential health benefits are being attributed to probiotic treatments. They include various bacterial probiotics, while among yeast only *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) is used extensively as a probiotic and often marketed as a dietary supplement.

The aim of this doctoral dissertation is to investigate the effect of the probiotic yeast *S. boulardii* on the adhesion of *C. glabrata* to polystyrene surface at different temperatures, pH values, and in the presence of three clinically important antifungal drugs, namely fluconazole, itraconazole, and amphotericin B. The cell surface hydrophobicity (CSH) of the tested *C. glabrata* strains has been determined as well in order to test for a possible correlation between this physico-chemical property and the ability to adhere to polystyrene surface. In addition, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, two bacterial probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* were tested in a co-culture with *C. glabrata* as well. The method used to assess adhesion was crystal violet staining. The CSH of *C. glabrata* strains was determined using the Microbial Adhesion To Hydrocarbon (MATH) test.

Our results showed that despite the nonadhesiveness of *S. boulardii* cells, this probiotic significantly affected the adherence ability of *C. glabrata*. This effect was highly dependent on *C. glabrata* strain and was either antagonistic or synergistic. Regarding the extrinsic factors, temperature did not indicate any significant influence on this *S. boulardii* modulatory effect, while at high pH, *S. boulardii* did not manage to repress the adhesion of *C. glabrata* strains. Similar effect was observed in the experiments with antimycotics, where increased concentrations of antimycotic reduced the modulatory effect of *S. boulardii* on *C. glabrata* adhesion. *C. glabrata* strains in the co-cultures with non-adhesive pathogenic strains *C. krusei* and *S. cerevisiae* showed weaker adhesion than in co-cultures with non-adhesive probiotic strains *S. boulardii*, *L. rhamnosus* and *L. casei*. This indicates that the adhesiveness of two separate cultures could not be used to predict the adhesiveness of their co-culture. Further, there is no correlation between cell surface hydrophobicity and adhesion of *C. glabrata* strains to the polystyrene surface, which indicates that the hydrophobicity of the cell wall must not always be the precise measure of the adhesive potential.

Accepted on Senate on: 09.07.2015.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

**Prof. dr Jovana Grahovac**, associate professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, president

**Prof. dr Siniša Dodić**, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, mentor

**Prof. dr Peter Raspor**, full professor, Faculty of Health Sciences, University of Primorska, mentor

**Prof. dr Dragiša Savić**, full professor, Faculty of Technology, University of Leskovac, member

