

Gimnazija Kranj

Vpliv flukonazola in amfotericina B samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji *Melaleuca alterniifolia*, *Mentha piperita* in *Cinnamomum cassia* na rast *Candida glabrata* in *Candida krusei*

BIOLOGIJA

raziskovalna naloga

Avtor: Neža Babič

Mentor: dr. Petra Košir (Gimnazija Kranj)

Somentor: dr. Dane Lužnik (Univerzitetna klinika Golnik)

Breg, 2023

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici dr. Petri Košir za vse praktične nasvete v zvezi z izdelavo raziskovalne naloge in za njeno pozornost pri opozarjanju na napake. Zahvaljujem se dr. Danetu Lužniku, ki me je bil pripravljen sprejeti v laboratorij, se dogovoril za dobavo materialov, me potrpežljivo vodil skozi izvedbo eksperimenta in mi bil ves čas na voljo kot vir strokovnih nasvetov. Zahvaljujem se vsem družinskim članom, ki so me v tem obdobju nadomestili pri opravljanju nekaterih hišnih opravil, še posebej pa se zahvaljujem svojemu najboljšemu prijatelju za moralno podporo, vse spodbude in odpravljanje pravopisnih napak.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
KAZALO SLIK.....	4
KAZALO TABEL	4
POVZETEK	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1 UVOD	7
1.1 Cilji	7
1.2 Hipoteze	7
2 TEORETIČNI DEL.....	8
2.1 Pojavnost sevov <i>Candida glabrata</i> in <i>Candida krusei</i>	8
2.2 Razvoj odpornosti gliv na flukonazol in amfotericin B	8
2.3 Mehanizmi delovanja eteričnih olj	9
3 RAZISKOVALNI DEL	10
3.1 Materiali in oprema	10
3.2 Metodologija	10
3.2.1 Priprava vzorcev	10
3.2.2 Branje rezultatov	11
4 REZULTATI.....	13
4.1 Obdelava in prikaz podatkov	13
4.2 Statistična analiza	16
4.2.1 Antimikotika samostojno.....	16
4.2.1 Kombinacije antimikotikov z eteričnimi olji	16
5 RAZPRAVA.....	18
5.1 Hipoteza 1.....	18
5.2 Hipoteza 2.....	18
5.3 Uporabnost metode	19
6 SKLEPI	20
7 VIRI IN LITERATURA	21

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: odčitavanje rezultatov za (a) Candida glabrata, AMB in (b) Candida glabrata, FLU. Temno modre črte označujejo območje inhibicije. MIC vrednost je bila odčitana tam, kjer črta prečka MIC testni trak.</i>	<i>11</i>
<i>Slika 2: odčitavanje rezultatov za Candida krusei, AMB, Melaleuca alterniifolia (EO1).....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 3: (a) Candida glabrata, FLU, Melaleuca alterniifolia (b) Candida krusei, FLU, Cinnamomum cassia.</i>	<i>12</i>
<i>Slika 4: minimalne inhibitorne koncentracije amfotericina B in flukonazola samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji Melaleuca alterniifolia (EO1), Mentha piperita (EO2) in Cinnamomum cassia (EO3) za Candida glabrata.....</i>	<i>14</i>
<i>Slika 5: minimalne inhibitorne koncentracije amfotericina B in flukonazola samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji Melaleuca alterniifolia (EO1), Mentha piperita (EO2) in Cinnamomum cassia (EO3) za Candida krusei.....</i>	<i>15</i>

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: mehanizmi antimikotičnega delovanja čajevca, poprove mete in cimeta. Povzeto po Nazzaro et al. (2017).</i>	<i>9</i>
<i>Tabela 2: zbrani podatki skupaj s povprečno vrednostjo, standardnim odklonom in koeficientom variacije za Candida glabrata.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 3: zbrani podatki skupaj s povprečno vrednostjo, standardnim odklonom in koeficientom variacije za Candida krusei.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 4: določanje statistične pomembnosti razlik med vplivom flukonazola in amfotericina B na rast dveh vrst Candida in za vsakega izmed izbranih antimikotikov pri posamezni vrsti.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 5: določanje statistične pomembnosti razlik pri vzorcih C. glabrata.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 6: določanje statistične pomembnosti razlik pri vzorcih C. krusei.</i>	<i>17</i>

POVZETEK

Odpornost mikroorganizmov na antibiotična sredstva po vsem svetu predstavlja vse večji problem (Kon in Rai, 2013). Nabor sredstev za zdravljenje glivnih okužb predstavlja še dodatno skrb, saj je seznam antimikotikov omejen (Anderson, 2005). Rastlinska eterična olja imajo zaradi svojih kompleksnih zdravilnih lastnosti potencial za zdravljenje glivnih obolenj (Kon in Rai, 2013). V tej raziskavi sem z uporabo MIC testnih trakov preučevala učinek amfotericina B in flukonazola samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji čajevca (*Melaleuca alternifolia*), poprove mete (*Mentha piperita*) in cimeta (*Cinnamomum cassia*) na rast *Candida glabrata* in *Candida krusei*. Pri vseh kombinacijah, razen pri kombinaciji flukonazola z eteričnim oljem *Melaleuca alternifolia*, se je MIC bistveno zmanjšala. Izbrana metoda se je izkazala za učinkovit in dostopen način določanja MIC, zlasti za sinergične kombinacije.

Ključne besede: antimikotiki, eterična olja, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, MIC testni trakovi

ABSTRACT

Resistance of microorganisms to antibiotics is becoming a growing concern worldwide (Kon in Rai, 2013). The range of antimycotics against fungal infections is even more concerning because the list of antimycotics is limited (Anderson, 2005). Due to their complex healing properties, plant essential oils can potentially aid in treating fungal infections (Kon in Rai, 2013). In this research, I investigate the effect of fluconazole and amphotericin B alone and in combination with essential oils of tea tree (*Melaleuca alternifolia*), peppermint (*Mentha piperita*), and cinnamon (*Cinnamomum cassia*) on the growth of *Candida glabrata* and *Candida krusei* using the MIC test strips. All combinations except combining fluconazole with the essential oil of *Melaleuca alternifolia* showed a significant decrease in MIC. The method proved to be a convenient way of measuring the MIC, especially in synergic combinations.

Key words: antimycotics, essential oils, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, MIC test strips

SEZNAM OKRAJŠAV

MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. Minimal Inhibitory Concentration)
AMB	amfotericin B
FLU	flukonazol
EO	eterično olje (ang. essential oil)
EO1	eterično olje <i>Melaleuca alternifolia</i> (čajevec)
EO2	eterično olje <i>Mentha piperita</i> (poprova meta)
EO3	eterično olje <i>Cinnamomum cassia</i> (cimet)
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
RPMI agar	agarsko gojišče za testiranje odpornosti z MIC testnimi trakovi
ECM	zunajcelični matriks (ang. Polymeric Extracellular Matrix)

1 UVOD

Napredovanje v medicini in vse pogostejša uporaba širokega spektra antimikotikov vodi do vse večje odpornosti glivnih patogenov na konvencionalna protiglivična sredstva (Beredaki et al., 2019). Zaradi svojega kompleksnega delovanja imajo rastlinska eterična olja velik potencial za zdravljenje glivnih okužb, saj ne delujejo samo antimikotično, temveč v nekaterih primerih lahko povečajo učinkovitost uporabljenih antimikotikov (Kon in Rai, 2013). Številne raziskave potrjujejo njihovo uporabnost za zmanjševanje MIC in potencialno povečanje uporabnosti antimikotikov, vendar pa se osredotočajo predvsem na vpliv na *Candida albicans* (Kon in Rai, 2013). Ta raziskovalna naloga se zato osredotoča na vpliv flukonazola in amfotericina B samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji čajevca (*Melaleuca alternifolia*), poprove mete (*Mentha piperita*) in cimeta (*Cinnamomum cassia*) na rast *Candida glabrata* in *Candida krusei*. Za določanje MIC so bili v raziskavi uporabljeni MIC testni trakovi, ki se uporabljajo predvsem v kliničnem okolju. Glede na potek raziskave in pridobljene rezultate sem zato lahko dodatno ocenila primernost in uporabnost izbrane metode za prihodnje študije.

1.1 Cilji

Cilji raziskovalne naloge so bili sledeči:

- Določiti MIC flukonazola in amfotericina B za *Candida glabrata* in *Candida krusei*.
- Na podlagi primerjave pridobljenih rezultatov oceniti antimikotično delovanje eteričnih olj čajevca (*Melaleuca alternifolia*), poprove mete (*Mentha piperita*) in cimeta (*Cinnamomum cassia*).
- Ugotoviti kako učinkovito je kombiniranje antimikotikov z izbranimi eteričnimi olji.
- Oceniti uporabnost metode z MIC testnimi trakovi za nadaljnje raziskave.

1.2 Hipoteze

Hipoteza 1: Tako *C. glabrata* kot *C. krusei* bosta pokazali večjo odpornost proti flukonazolu v primerjavi z amfotericinom B. To pomeni, da bo MIC za amfotericin B bistveno manjša.

Hipoteza 2: Kombinacija eteričnih olj *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* in *Cinnamomum cassia* s flukonazolom in amfotericinom B bo zmanjšala MIC *C. glabrata* in *C. krusei*.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Pojavnost sevov *Candida glabrata* in *Candida krusei*

Vrste gliv iz rodu *Candida* so oportunistični patogeni, ki povzročajo okužbe pri prekomerno izčrpanih ali imunsko ogroženih gostiteljih. Površinske okužbe vključujejo okužbe kože in sluznice in jih lahko zdravimo z nanašanjem lokalnih antimikotikov, kot so kreme, mazila in raztopine. Na drugi strani pa imamo invazivne septične okužbe, ki so pogosto življenjsko ogrožajoče. Dejavniki, ki povečujejo verjetnost za pojavnost slednjih so operacijski posegi (predvsem trebušnega predela), opekline, dolgotrajna hospitalizacija in predhodno zdravljenje s širokospektralnimi antibiotiki in imunosupresivnimi zdravili. Napredovanje medicine v kemoterapiji, presajanju organov, hemodializi in centralnih venskih katetrah prav tako povečuje pojavnost invazivnih glivičnih okužb (Spampinato in Leonardj, 2013).

Pojavnost invazivnih kandidaz se je v zadnjih letih še povečala predvsem zaradi pogoste izpostavljenosti gliv različnim protiglivnim sredstvom (Beredaki et al., 2019). Najpogosteje se pojavlja *Candida albicans*, ki je posledično tudi najbolj raziskana. *Candida glabrata* predstavlja 29% vseh septičnih okužb, hkrati pa je pogost povzročitelj okužb sečnice in nožnice (Kumar et al., 2019). *Candida krusei* je po drugi strani redek, vendar večkratno odporen glivični patogen, značilen za bolnike z rakom in bolnike s predhodno izpostavljenostjo flukonazolu (Pffaler, 2008; Beredaki et al., 2019).

2.2 Razvoj odpornosti gliv na flukonazol in amfotericin B

Omejenost števila antimikotikov lahko pripišemo predvsem bližnjemu sorodstvu človeka z glivnimi patogeni, kar je ralog za majhno število ciljnih celičnih mehanizmov, s katerimi lahko uničimo glivno celico, brez da bi pri tem poškodovali človeško (Anderson, 2005). Ena od pogostejših tarč, značilna tako za flukonazol kot za amfotericin B je ergosterol. To je sterol, ki ga najdemo izključno v celičnih membranah gliv (Marek in Timmons, 2019). Ergosterol, enako kot holesterol v živalskih celicah, pomembno vpliva na celično membrano – zagotavlja ji mehanično stabilnost in integriteto ter vpliva na njeno fluidnost in prepustnost.

Flukonazol preprečuje pretvorbo lanosterola v ergosterol, kar vodi do povečanja prepustnosti membrane in s tem uhajanja citoplazme (Marek in Timmons, 2019; Kon in Rai, 2013). Hkrati flukonazol vodi do kopičenja toksičnih 14-metilnih sterolov. Odpornost na flukonazol se pojavi zaradi spremembe encima, ki sodeluje pri pretvorbi lanosterola v ergosterol in zmanjšanim kopičenjem zdravila v celici (Kon in Rai, 2013).

Amfotericin B pa se veže na ergosterol in povzroči njegovo pretvarjanje v membranske kanalčke s hidrofилno notranjostjo. To vodi do izgube vitalnih celičnih komponent in sčasoma do celične smrti (Marek in Timmons, 2019; Kon in Rai, 2013). Odpornost na amfotericin B se razvije, ko celica uspešno prepreči vezavo antimikotika na ergosterol. To glive dosežejo tako, da spremenijo orientacijo ergosterola ali pa ga nadomestijo z drugim sterolom (Kon in Rai, 2013).

Številne študije poročajo o odpornosti *C. glabrata* in *C. krusei* na flukonazol in amfotericin B (Beredaki et al., 2019; Helmerhorst et al., 1999; Carrillo-Muñoz idr., 1999), kar poudarja potrebo po odkrivanju in raziskovanju novih učinkovin s potencialnimi antimikotičnimi učinki.

2.3 Mehanizmi delovanja eteričnih olj

Rastlinska eterična olja imajo zaradi svojih kompleksnih lastnosti potencial za povečanje aktivnosti antimikotikov ter povečanje uporabnosti antimikotikov (Kon in Rai, 2013). V tabeli 1 so povzeti mehanizmi delovanja izbranih eteričnih olj.

Tabela 1: mehanizmi antimikotičnega delovanja čajevca, poprove mete in cimeta. Povzeto po Nazzaro et al. (2017).

Eterično olje:	<i>Melaleuca alternifolia</i> (čajevce)	<i>Mentha piperita</i> (poprova meta)	<i>Cinnamomum cassia</i> (cimet)
Mehanizmi delovanja, povzeti po Nazzaro et al. (2017):	Vpliv na celično membrano in steno, zaviranje refluksnih črpalk, sinergično delovanje, zaviranje razvoja biofilma.	Vpliv na celično membrano in steno, zaviranje refluksnih črpalk, zaviranje razvoja biofilma, vpliv na sintezo miktotoksinov.	Vpliv na celično membrano in steno, zaviranje refluksnih črpalk, vpliv na sintezo miktotoksinov.

Vpliv na celično steno: Celična stena glivnih celic igra izredno pomembno vlogo za uspešno rast in delovanje glive. Posledično so tri glavne komponente celične stene: glukan, hitin in manan, pogoste tarče zdravljenja glivnih okužb (Nazzaro et al., 2017).

Zaviranje delovanja refluksnih črpalk: Glivna celična membrana vsebuje H⁺-ATPaze, ki vzdržujejo visok protonski gradient vzdolž membrane. Razlika v koncentraciji omogoča sprejemanje hranilnih snovi v celico, hkrati pa H⁺-ATPaze nadzorujejo kislost znotraj celice. Inhibicija H⁺-ATPaze vodi do znotrajcelične zakisanosti in apoptoze (Nazzaro et al., 2017).

Zaviranje razvoja biofilma: Biofilm tvorijo fiksne glivne kolonije, ki so trdno pritrjene na površino in povezane med sabo ter dodatno zavarovane z zunajceličnim matriksom (ECM). Tovrstne strukture so veliko bolj odporne na zunanje dejavnike, kar pomeni, da se lahko obdržijo na katetrih in protezah ter nato s krvjo dosežejo druge organe. Sposobnost organizma tvoriti biofilm je zato povezana z visoko stopnjo smrtnosti. Eterična olja lahko direktno uničijo biofilm ali pa preprečijo njegov nastanek (Nazzaro et al., 2017).

3 RAZISKOVALNI DEL

3.1 Materiali in oprema

Vsi materiali in oprema, z izjemo eteričnih olj, so bili priskrbljeni s strani mikrobiološkega laboratorija Univerzitetne klinike Golnik.

Seznam materialov:

- izolirana kolonija *Candida glabrata*
- izolirana kolonija *Candida krusei*
- 0.85 % sterilna raztopina NaCl
- 96 % etanol
- RPMI agar gojišča, Sigma-Aldrich
- **AMB:** 40 testnih trakov za določanje MIC amfotericina B (koncentracije antimikotika v $\mu\text{L/mL}$: 0.016, 0.023, 0.032, 0.047, 0.064, 0.094, 0.125, 0.19, 0.25, 0.38, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 32, 48, 64, 96, 128, 192, 256), Liofilchem
- **FLU:** 40 testnih trakov za določanje MIC flukonazola (koncentracije antimikotika v $\mu\text{L/mL}$: 0.002, 0.003, 0.004, 0.006, 0.012, 0.016, 0.023, 0.032, 0.047, 0.064, 0.094, 0.125, 0.19, 0.25, 0.38, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 32), Liofilchem
- **EO1:** 100% eterično olje *Melaleuca alternifolia*, Eteris
- **EO2:** 100% eterično olje *Mentha piperita*, Eteris
- **EO3:** 100% eterično olje *Cinnamomum cassia*, Eteris

Seznam opreme:

- denzimeter Densimat Densitometer (± 0.05 McF), Biomérieux Biotechnology
- vorteksni mešalnik Vortex PV-1, Grant Instruments
- mikropipeta (± 0.2 μL), Eppendorf
- biološka varnostna omara PIO SMBC 122 AV, Iskra
- inkubator I-590 VPC, Kambič
- rotator za plošče
- 80 petrijevok
- svetilka
- pinceta
- sterilne bombažne palčke
- laboratorijski plašč
- medicinske rokavice
- kirurška maska

3.2 Metodologija

3.2.1 Priprava vzorcev

Zaradi večje jasnosti so bile petrijevke z RPMI agarjem najprej označene z imenom glivne vrste (*C. glabrata* ali *C. krusei*), kratico antimikotika (FLU ali AMB) in splošnim imenom eteričnega olja (čajevc, poprova meta ali cimeti).

Vsi naslednji koraki so bili izvedeni v biološki varnostni omari. Suspenzije z motnostjo 0,5 McF so bile pripravljene tako, da je bila ena od izoliranih kultur z bombažno palčko prenešana v 0.85 % raztopino natrijevega klorida (NaCl). Koncentracija gliv v suspenziji je bila izmerjena z denzimetrom.

Primerno označena petrijevka je bila nato položena na rotator za plošče, kjer je bombažna palčka nežno potovala od sredine do enega roba, proti drugemu robu in nazaj v sredino, kar je omogočilo enakomerno porazdelitev glivne suspenzije po celotnem gojišču. Pokrite plošče so stale 15 minut, da se je suspenzija vpila v agar. MIC testni trakovi so bili na ustrezne plošče položeni s sterilno pinceto. Zaradi omejenih sredstev sta bila na nekatere izmed plošč položena po dva testna trakova.

Glede na oznake je bilo na določene MIC testne trakove naknadno dodano še eterično olje. Na tri vnaprej določena mesta je bilo nanešenega 5 μ L eteričnega olja. Na vsak MIC testni trak je bilo skupaj tako nanešenih 15 μ L. Točke so bile med seboj enako oddaljene, kar je omogočilo enakomerno porazdelitev eteričnega olja po celotnem testnem traku.

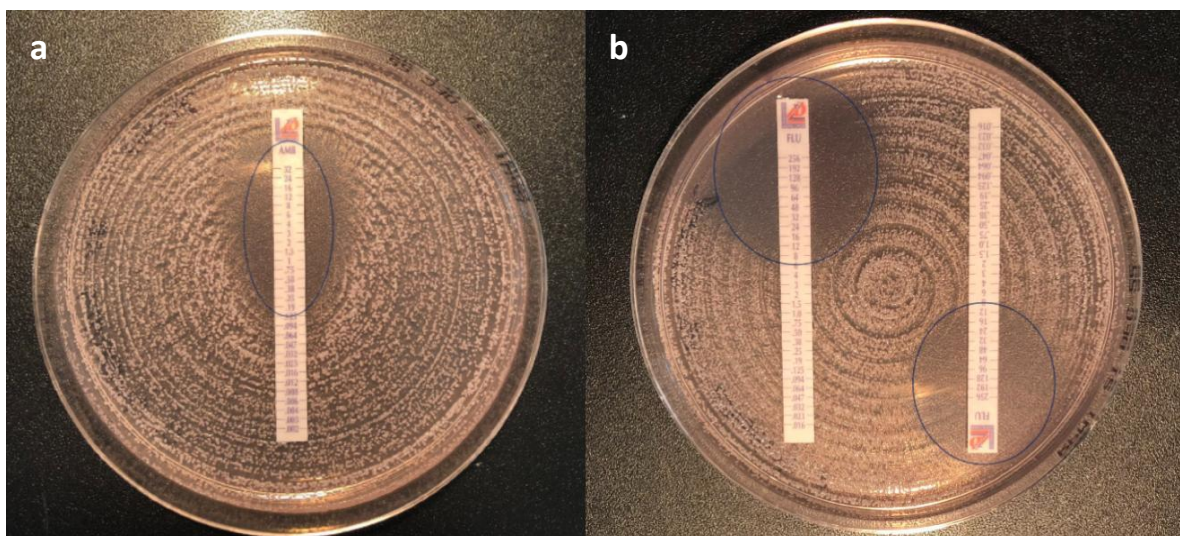
Pokrite plošče so bile obrnjene navzdol in 48 ur inkubirane pri 35 °C.

Varnostni ukrepi:

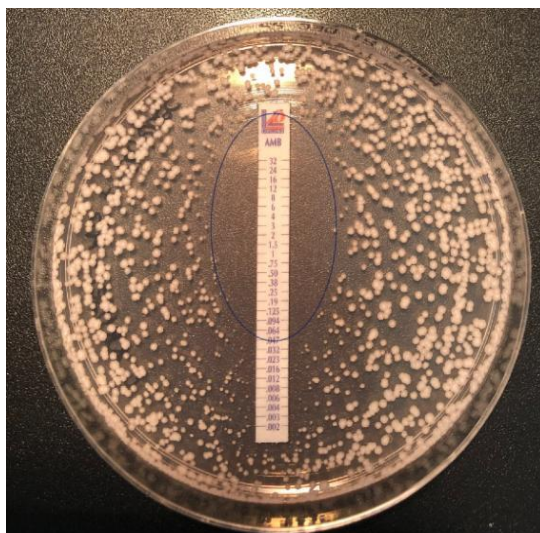
Čeprav so preučevani mikroorganizmi del naravne bioflore človeškega telesa, je pri njihovem preučevanju potrebno slediti predpisanim varnostnim ukrepom. Eksperiment je bil izveden v mikrobiološkem laboratoriju Univerzitetne klinike Golnik, ki zagotavlja zahtevan varnostni nivo.

3.2.2 Branje rezultatov

Rezultati so bili odčitani na podlagi standardiziranega protokola za določanje MIC pri uporabi MIC testnih trakov. MIC za flukonazol je bila odčitana pri 80 % inhibicijske cone. Za amfotericin B nad minimalno inhibitorno koncentracijo ni bilo kolonij. To je najlepše razvidno iz Slike 1 in 2.

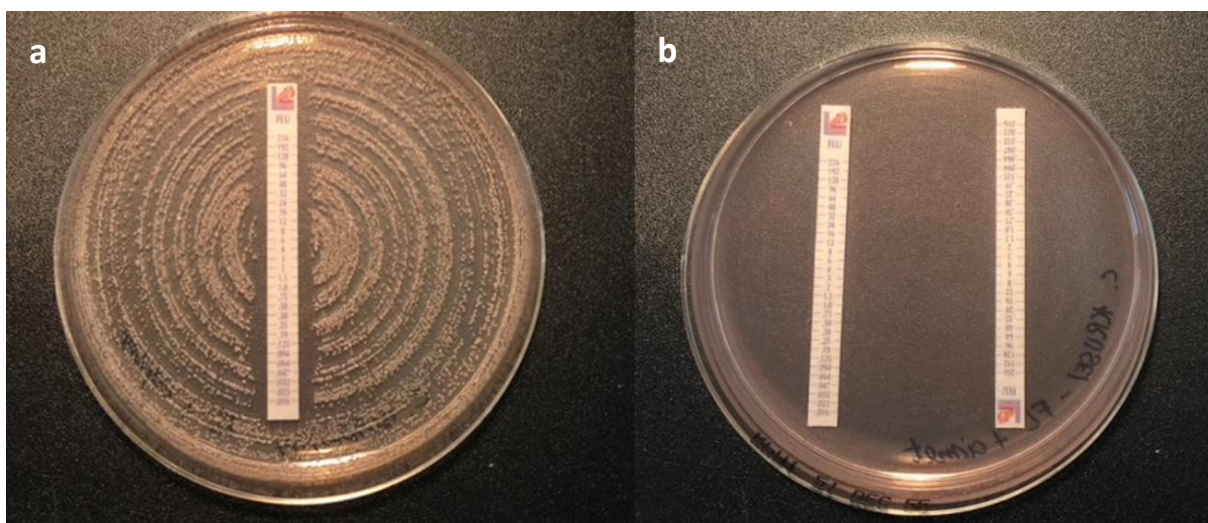


Slika 1: odčitavanje rezultatov za (a) *Candida glabrata*, AMB in (b) *Candida glabrata*, FLU. Temno modre črte označujejo območje inhibicije. MIC vrednost je bila odčitana tam, kjer črta prečka MIC testni trak.



Slika 2: odčitavanje rezultatov za *Candida krusei*, AMB, *Melaleuca alternifolia* (EO1).

Kljub standardnemu protokolu so se s kombiniranjem ponekod pojavile izjeme. V nekaterih primerih so se kolonije pojavile vzporedno s testnim trakom (Slika 3 /a/), v drugih pa je bila rast popolnoma zavirana (Slika 3 /b/). V primeru vzporedne rasti podatkov ni bilo mogoče kvantitativno ovrednotiti. Vloga pri inhibiciji je imelo samo eterično olje, ki je sočasno zaustavilo oziroma uničilo delovanje antimikotika. Te meritve so bile v Tabelah 2 in 3 zato označene z minus (-). Popolna inhibicija pa pomeni, da je pri zaviranju rasti sodelovala le minimalna koncentracija antimikotika ali izključno eterično olje, kar je bilo kvantitativno interpretirano kot minimalna koncentracija na MIC testnem traku (0,016 $\mu\text{L/mL}$ za flukonazol in 0,002 $\mu\text{L/mL}$ za amfotericin B).



Slika 3: (a) *Candida glabrata*, FLU, *Melaleuca alternifolia* (b) *Candida krusei*, FLU, *Cinnamomum cassia*.

4 REZULTATI

4.1 Obdelava in prikaz podatkov

V Excelu je bila s pomočjo funkcije AVERAGE izračunana povprečna MIC vrednost. Standardi odklon je bil določen z uporabo funkcije STDEV.P, z namenom določitve razpršenosti podatkov okrog srednje vrednosti. Nazadnje je bil izračunan še koeficient variacije (KV), ki daje informacijo o relativni razpršenosti podatkov glede na velikost srednje vrednosti.

$$\text{Koeficeint variacije} = \frac{\text{standardni odklon}}{\text{povprečna MIC vrednost}} \times 100$$

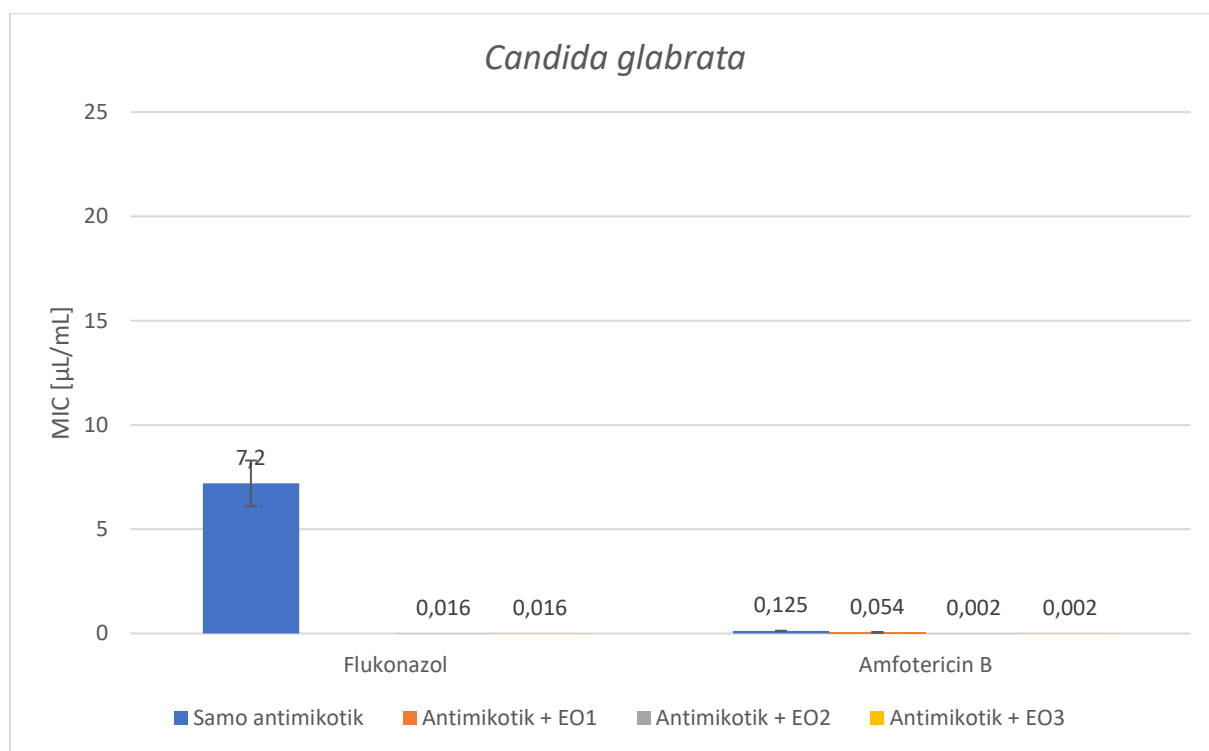
$$KV (\text{Candida glabrata, FLU}) = \frac{1,1}{7,2} \times 100 = 15,2 \%$$

Podatki za *Candida glabrata* so zbrani v Tabeli 2.

Tabela 2: zbrani podatki skupaj s povprečno vrednostjo, standardnim odklonom in koeficientom variacije za *Candida glabrata*.

Antimikotik in EO	<i>Candida glabrata</i> - MIC [$\mu\text{L}/\text{mL}$]							
	1	2	3	4	5	Povprečje	Standardni odklon	Koeficient variacije [%]
FLU	8,00	8,00	6,00	8,00	6,00	7,20	1,10	15,2
FLU + EO1	-	-	-	-	-	-	-	-
FLU + EO2	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0	0
FLU + EO3	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0	0
AMB	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0	0
AMB + EO1	0,047	0,047	0,064	0,047	0,064	0,054	0,00931	17,3
AMB + EO2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0	0
AMB + EO3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0	0

Na podlagi teh podatkov je bila oblikovana Slika 4.



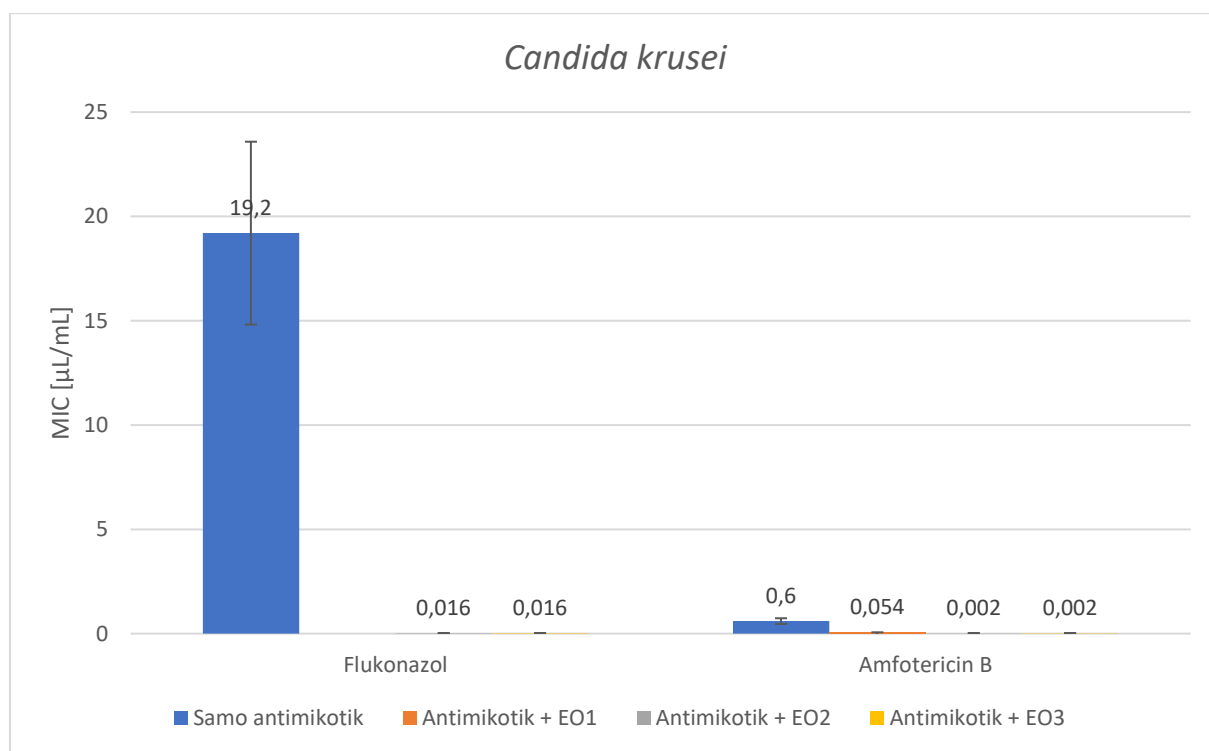
Slika 4: minimalne inhibitorne koncentracije amfotericina B in flukonazola samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji *Melaleuca alternifolia* (EO1), *Mentha piperita* (EO2) in *Cinnamomum cassia* (EO3) za *Candida glabrata*.

Podatki za *Candida krusei* so zbrani v Tabeli 3.

Tabela 3: zbrani podatki skupaj s povprečno vrednostjo, standardnim odklonom in koeficientom variacije za *Candida krusei*.

Antimikotik in EO	<i>Candida krusei</i> - MIC [$\mu\text{L}/\text{mL}$]							
	1	2	3	4	5	Povprečje	Standardni odklon	Koeficient variacije [%]
FLU	24,0	16,0	16,0	24,0	16,0	19,2	4,38	22,8
FLU + EO1	-	-	-	-	-	-	-	-
FLU + EO2	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0	0
FLU + EO3	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0	0
AMB	0,500	0,500	0,750	0,500	0,750	0,600	0,137	22,8
AMB + EO1	0,047	0,047	0,064	0,047	0,064	0,054	0,00931	17,3
AMB + EO2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0	0
AMB + EO3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0	0

Na podlagi teh podatkov je bila oblikovana Slika 5.



Slika 5: minimalne inhibitorne koncentracije amfotericina B in flukonazola samostojno in v kombinaciji z eteričnimi olji *Melaleuca alternifolia* (EO1), *Mentha piperita* (EO2) in *Cinnamomum cassia* (EO3) za *Candida krusei*.

4.2 Statistična analiza

Da bi ocenili ali so razlike med srednjimi vrednostmi statistično pomembne, so bili izvedeni parni T-testi. Najprej sta bili oblikovani ničelna in alternativna hipoteza. Podatki so bili nato analizirani v Data Analysis razširitvi programa Excel, ki izračuna T-vrednost in kritično vrednost na podlagi vstavljenih podatkov. Primerjava med T-vrednostjo in kritično vrednostjo, za statistično pomembnost v vrednosti 0,05 ($p = 0,05$), je zbrana v tabelah 4, 5 in 6.

4.2.1 Antimikotika samostojno

Ničelna hipoteza (H_0): razlike med srednjo vrednostjo vzorcev za posamezno vrsto ali antimikotik niso bistveno različne, kakršnekoli razlike so posledica naključja ali napak pri vzorčenju. (Kritična vrednost je večja od T-vrednoti.)

Alternativna hipoteza (H_1): razlike med srednjo vrednostjo vzorcev za posamezno vrsto ali antimikotik se bistveno razlikujejo, razlika najverjetneje ni posledica naključja ali napak pri vzorčenju. (Kritična vrednost je manjša od T-vrednosti.)

Tabela 4: določanje statistične pomembnosti razlik med vplivom flukonazola in amfotericina B na rast dveh vrst *Candida* in za vsakega izmed izbranih antimikotikov pri posamezni vrsti.

	Kritična vrednost v primerjavi s T-vrednostjo	Sprejeta hipoteza:
<i>C. glabrata</i> : AMB: FLU v primerjavi z AMB	$2.8 < 14.4$	Alternativna hipoteza
<i>C. krusei</i> : FLU v primerjavi z AMB	$2.8 < 9.5$	Alternativna hipoteza
FLU: <i>C. krusei</i> v primerjavi s <i>C. glabrata</i>	$2.8 < 5.7$	Alternativna hipoteza
AMB: <i>C. krusei</i> v primerjavi s <i>C. glabrata</i>	$2.8 < 7.8$	Alternativna hipoteza

Vse primerjane srednje vrednosti se bistveno razlikujejo, kar pomeni, da razlike najverjetneje niso posledica naključja ali napak pri vzorčenju.

4.2.1 Kombinacije antimikotikov z eteričnimi olji

Ničelna hipoteza (H_0): srednja vrednost vzorcev samo z antimikotikom se ne razlikuje bistveno od srednje vrednosti kombiniranih vzorcev, kakršnekoli razlike so posledica naključja ali napak pri vzorčenju. (Kritična vrednost je večja od T-vrednoti.)

Alternativna hipoteza (H_1): srednja vrednost vzorcev samo z antimikotikom se bistveno razlikuje od srednje vrednosti kombiniranih vzorcev, razlika najverjetneje ni posledica naključja ali napak pri vzorčenju. (Kritična vrednost je manjša od T-vrednosti.)

Tabela 5: določanje statistične pomembnosti razlik pri vzorcih *C. glabrata*.

<i>C. glabrata</i>	Kritična vrednost v primerjavi s T-vrednostjo	Sprejeta hipoteza:
FLU v primerjavi s FLU + EO2	$2.8 < 14.7$	Alternativna hipoteza
FLU v primerjavi s FLU + EO3	$2.8 < 14.7$	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO1	$2.8 < 17.1$	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO2	(brez odstopanj)	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO3	(brez odstopanj)	Alternativna hipoteza

Pri določanju minimalnih inhibitornih koncentracij vzorcev primerjanih v zadnjih dveh vrsticah Tabele 5 (AMB, AMB + EO2, AMB + EO3) ni prišlo do odstopanj, zato lahko alternativno hipotezo potrdimo brez dodatnih izračunov.

Tabela 6: določanje statistične pomembnosti razlik pri vzorcih *C. krusei*.

<i>C. krusei</i>	Kritična vrednost v primerjavi s T-vrednostjo	Sprejeta hipoteza:
FLU v primerjavi s FLU + EO2	$2.8 < 9.8$	Alternativna hipoteza
FLU v primerjavi s FLU + EO3	$2.8 < 9.8$	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO1	$2.8 < 9.6$	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO2	$2.8 < 9.8$	Alternativna hipoteza
AMB v primerjavi z AMB + EO3	$2.8 < 9.8$	Alternativna hipoteza

Vse primerjane srednje vrednosti se bistveno razlikujejo, kar pomeni, da razlike najverjetneje niso posledica naključja ali napak pri vzorčenju.

5 RAZPRAVA

5.1 Hipoteza 1

Po izvedbi parnih T-testov (Tabela 4) lahko potrdimo, da je tako pri *Candida glabrata* kot pri *Candida krusei* MIC amfotericina B bistveno nižja od MIC flukonazola, kar potrjuje prvo hipotezo. Poleg tega rezultati kažejo na bistveno manjšo MIC obeh antimikotikov proti *C. glabrata* v primerjavi s koncentracijo, potrebno za zaustavitev rasti *C. krusei*. To poenostavljeno pomeni, da je amfotericin B učinkovitejši pri zaviranju rasti obeh testiranih vrst in da je *Candida krusei* razvila večjo odpornost proti obema antimikotikoma. Rezultati se ujemajo z meritvami iz študije, ki so jo izvedli Carrillo-Muñoz et al. (1999). Študija navaja, da je povprečna MIC amfotericina B za *C. glabrata* 0,125 mg/L in 0,93 mg/L za *C. krusei* ter povprečna MIC flukonazola 7,46 mg/L za *C. glabrata* in 11 mg/L za *C. krusei*. Razlike v vrednostih lahko pripišemo različnim raziskovalnim metodam, časovni razliki med študijama in različnim glivnim virom. Ne glede na to, je opazovani trend enak in ga je mogoče razložiti z različnimi mehanizmi razvoja odpornosti, opisanimi v teoretičnem delu raziskovalne naloge.

Glede na predstavljene podatke lahko sklepamo, da je zaustavljanje biosinteze ergosterola, za katero je odgovoren flukonazol, manj učinkovito kot perforacija celične membrane s hidrofилnimi kanalčki, ki jo povzroča amfotericin B.

5.2 Hipoteza 2

Po izvedbi parnih T-testov (Tabeli 5 in 6) lahko potrdimo, da kombiniranje flukonazola in amfotericina B z eteričnimi olji *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* in *Cinnamomum cassia* bistveno zmanjša koncentracijo antimikotika potrebno za inhibicijo rasti *Candida glabrata* in *Candida krusei*. Edina izjema je kombinacija flukonazola z eteričnim oljem čajevca (*Melaleuca alternifolia*), ki vodi do domnevne inhibicije ali uničenja flukonazola, o kateri priča vzporedno območje inhibicije. Pretekle študije, ki se osredotočajo na vpliv kombinacije flukonazola z EO1, poročajo o povečanem delovanju flukonazola v kombinaciji z eteričnim oljem *Melaleuca alternifolia* (Mertas et al., 2015; Khan, Malik in Ahmad, 2012), vendar pa se nobena izmed navedenih študij ne osredotoča na vrsti *Candida glabrata* ali *Candida krusei*, kar pomeni, da bi bil razlog za razlike v delovanju kombinacij lahko v razlikah med vrstami gliv. V vsakem primeru bodo za razlago mehanizmov delovanja kombinacij potrebne nadaljnje raziskave, na prvem mestu vpliv samega eteričnega olja na rast *C. glabrata* in *C. krusei*. Za boljše razumevanje mehanizma bo potrebno natančno raziskati vpliv posameznih komponent eteričnega olja samostojno in v kombinaciji s flukonazolom.

Kombiniranje amfotericina B z eteričnim oljem *Melaleuca alternifolia* je imelo sinergični učinek. Dodatek eteričnega olja je za obe glivni vrsti vodil do bistvenega zmanjšanja MIC (Tabeli 5 in 6). Pri *C. glabrata* se je MIC amfotericina B iz 0,125 µL/mL zmanjšala na 0,054 µL/mL, pri *C. krusei* pa iz 0,600 µL/mL na 0,054 µL/mL. Rezultati se skladajo z mehanizmi delovanja eteričnega olja, ki jih opisujejo Nazzaro et al. (2017) (Tabela 1). Študije, ki bi preučevale in potencialno potrdile ali ovrgle pridobljene rezultate za enake kombinacije, še niso bile izvedene.

Eterični olji *Mentha piperita* in *Cinnamomum cassia* sta se izkazali za najučinkovitejši, saj sta v kombinaciji z obema antimikotikoma popolnoma zavrla rast *C. glabrata* in *C. krusei*. Popolno inhibicijo lahko v veliki meri pripišemo hlapnosti eteričnih olj, ki je povzročila, da so aktivne snovi dosegle celotno območje petrijevke. Ker je do popolne inhibicije pri vseh kombinacijah prišlo, ne glede na razporeditev testnih trakov na petrijevko in s tem povezanim volumnom eteričnega olja, lahko sklepamo, da za popolno inhibicijo zadostuje že 15 µL koncentriranega EO2 ali EO3. Glede na pridobljene rezultate bi bilo v nadaljnjih raziskavah potrebno raziskati vpliv manjših koncentracij eteričnih olj in na ta način

določiti optimalno kombinacijo obeh snovi (antimikotika in eteričnega olja) za inhibicijo rasti gliv in hkratno najmanjšo verjetnost za povečanje odpornosti glivnih patogenov.

Hipoteza 2 je torej delno potrjena, predvsem pa zbrani rezultati opozarjajo na potrebo po nadaljnem raziskovanju vpliva kombinacij antimikotikov z eteričnimi olji in njihovih mehanizmov delovanja. Preden bodo eterična olja uporabna za zdravljenje hujših okužb je potrebno izvesti še številne laboratorijske, predklinične in klinične raziskave.

5.3 Uporabnost metode

Največja pomanjkljivost izbrane metode je bila nedostopnost podatkov o samostojnem delovanju eteričnih olj. To bi namreč omogočilo natančnejšo opredelitev kombinacij in potencialno pojasnilo učinek eteričnega olja čajevca na flukonazol. Test bi lahko izvedli tako, da bi uporabili trakove istega materiala brez predhodno nanesenega antimikotika in jih napojili z enako količino eteričnega olja. Na žalost tovrstni trakovi niso bili dostopni. Uporaba Kirby-Bauerjeve metode je bila izločena, ker ne omogoča pridobivanja standardiziranih rezultatov, ki bi bili primerljivi z do zdaj izvedenimi študijami.

V splošnem se je izbrana metoda izkazala za primerno in natančno, predvsem za sinergične kombinacije, kot je bila kombinacija med AMB in EO1. Podobne rezultate bi najverjetneje lahko opazili pri razredčenih koncentracijah EO2 in EO3, predvsem pa pri eteričnih oljih za katere so že potrdili sinergično delovanje. Poleg čajevca so to še *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon nardus*, *Illicium verum* in drugi (Nazzaro et al., 2017). Prednost metode z MIC testnimi trakovi je predvsem njena preprostost in dostopnost, ki omogoča testiranje velikega števila vzorcev. To namreč pomeni, da lahko v kratkem času, kljub omejenosti sredstev, raziščemo relativno veliko število koncentracijskih kombinacij in na ta način optimiziramo koncentracije antimikotikov in eteričnih olj pri kombiniranem zdravljenju.

6 SKLEPI

Glede na pridobljene rezultate lahko sklepamo, da:

- je amfotericin B učinkovitejši pri zaustavljanju rasti *C. glabrata* in *C. krusei* kot flukonazol.
- je *C. krusei* bolj odporna na flukonazol in amfotericin B kot *C. glabrata*.
- ima eterično olje *Melaleuca alternifolia* potencial, da uniči ali inhibira delovanje flukonazola.
- imajo vse testirane kombinacije, z izjemo flukonazola z eteričnim oljem *Melaleuca alternifolia*, potencial, da zmanjšajo MIC antimikotika.
- je izbrana metoda z MIC testnimi trakovi primerna za določanje MIC predvsem pri sinergičnih kombinacijah.

7 VIRI IN LITERATURA

Kon, K. in Rai, M. (2013). 'Combining plant essential oils and antimycotics in coping with antimycotic-resistant candida species.' *Antifungal Metabolites from Plants*, str.: 263–281, doi: 10.1007/978-3-642-38076-1_9.

Anderson, J.B. (2005). 'Evolution of antifungal-drug resistance: Mechanisms and Pathogen Fitness.' *Nature Reviews Microbiology*, 3(7), p. 547–556, doi: 10.1038/nrmicro1179.

Beredaki, M.-I., Georgiou, P.-C., Siopi, M., Kanioura, L., Arendrup, M. C., Mouton, J. W in Meletiadis, J. (2019). 'Voriconazole efficacy against candida glabrata and candida krusei: Preclinical data using a validated in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model.' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(1), str.: 140–148, doi: 10.1093/jac/dkz425.

Spampinato, C. in Leonardi, D. (2013). 'Candidainfections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents.' *BioMed Research International*, str.: 1–13, doi: 10.1155/2013/204237.

Kumar, K., Askari, F., Sahu, M. S. In Kaur, R. (2019) 'Candida glabrata: A lot more than meets the eye.' *Microorganisms*, 7(2), str.: 39, doi: 10.3390/microorganisms7020039.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S. In Rina, M. (2008). 'Candida krusei', a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the Artemis Disk Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005.' *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), str.: 515-521, doi: 10.1128/JCM.01915-07.

Marek, C.L. in Timmons, S.R. (2019) 'Antimicrobials in Pediatric Dentistry' in A.J. Nowak et al. (eds) *Pediatric dentistry: Infancy through adolescence*. 6th edn. *Elsevier Health Sciences*, str.: 128–141, doi: 10.1016/B978-0-323-60826-8.00009-2.

Helmerhorst, E., reijnders, I., van't Hof, W., Simoons-Smith, I., Veerman, E. in Amerongen, A. (1999) 'Amphotericin B- and fluconazole-resistant candida spp., aspergillus fumigatus, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides.' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), str.: 702–704, doi: 10.1128/aac.43.3.702.

Carrillo-Muñoz, A. J., Quindós, G., Tur, C., Ruesga, M. T., Miranda, Y., del Valle, O., Cossun, P. A. in Wallace, T. L. (1999). 'In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole.' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(3), str.: 397–401, doi: 10.1093/jac/44.3.397

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. in De Feo, V. (2017). 'Essential oils and antifungal activity.' *Pharmaceuticals*, 10(4), str.: 86, doi: 10.3390/ph10040086.

Mertas, A., Garbusinska, A., Szliszka, E., Jureczko, A., Kowalska, M in Krol, W. (2015). 'The influence of Tea Tree Oil (melaleuca alternifolia) on fluconazole activity against fluconazole-resistant candida albicans strains.' *BioMed Research International*, 2015, str.: 1–9, doi: 10.1155/2015/590470.

Khan, M.S., Malik, A. in Ahmad, I. (2012). 'Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of Candida albicans.' *Medical Mycology*, 50(1), str.: 33–42, doi: 10.3109/13693786.2011.582890.