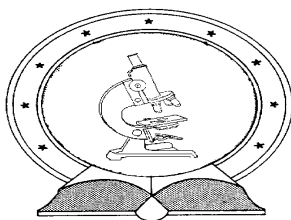


DE TTK



1949

**Digitális mikroszkópia és képelemző technikák a
fonalaszombák patogenitásának vizsgálatában**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

TÁLAS LÁSZLÓ

Témavezető

Dr. Szemán-Nagy Gábor György
Egyetemi adjunktus

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2019

A doktori értekezés betétlapja

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács a **Juhász Nagy Pál Doktori Iskola XXX doktori** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2019.02.14.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Tálas László** doktorjelölt **2013-2019** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biotechnológiai doktori** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2019.02.14.

.....

a témavezető aláírása

A doktori értekezés betétlapja

**DIGITÁLIS MIKROSZKÓPIA ÉS KÉPELEMZŐ TECHNIKÁK A
FONALAS GOMBÁK PATOGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATÁBAN**

**DIGITAL MICROSCOPY AND IMAGE ANALYSIS TECHNIQUES FOR
PATHOGENICITY OF FILAMENTOUS FUNGI**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Környezettudomány tudományágban
Írta: **Tálas László** okleveles Biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**
(**Biotechnológiai Doktori program** programja) keretében

Témavezetők:

Témavezető neve: Dr. Szemán-Nagy Gábor györgy

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr Vasas Gábor

tagok: Kozma-Bognárné Dr. Hamari Zsuzsanna

Dr. Szabó Judit Éva

A doktori szigorlat időpontja: 2017.06.23

Az értekezés bírálói:

Dr Máthé Csaba

Dr Németh Péter

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Magura Tibor

tagok: Dr Pusztahelyi Tünde

Dr Miklós ida

Dr. Borbély János

Dr Kredics László

Az értekezés védésének időpontja: 2019.04.27.

“A tudományos modellek nem jók vagy rosszak; hanem mindig rosszak. A modellek mindig csak közelítések. Azt a kérdést kell feltenni, hogy egy modell ad-e valami pluszt ahhoz képest, amit egyébként is tudunk. Ha igen, akkor a modellben van potenciál.”

Gavin Schmidt

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

alcA – Alkohol dehidrogenáz szabályozó promóter

ALS - agglutinin-szerű fehérje szekvenciák

AMB - Amphotericin-B

cAMP – Ciklikus Adenozin Monofoszfát

CP – ciklofoszfamid

Cyr1 - adenilát cikláz

CWI - sejtfali integritás

ECB - echinocandin B

ECM- extracelluláris mátrix

FadA - Egy G-protein -alegység

flbA – A fadA alegységnek a GTP-áz aktivitását növelő fehérje

GAG - Galaktozaminogalaktán

GMS - Gömöri-Grocott ezüstimpregnáció

GPI - glikozil-foszfatidil-inozitol

HaCaT - immortalizált humán keratinocita sejtvonal

HC - hidrokortizon

HE - hematoxylin-eosin

HOG - magas-ozmolaritású glicerin

Hsp90 - hősokk fehérje

IPA - Az invazív tüdő-aszpergillózis

MAPK- mitogén aktivált protein kináz útvonal

MTL- párosodás típus-szerű
NIH - National Institutes of Health
OCM-1 - choroidea melanoma sejtvonat
PAS - perjódosavas Schiff bázis
PMNL - polimorfonukleáris leukociták
PKA - cAMP-függő protein kináz A
PKSP - poliketid szintáz gén
RGS - G-protein jelátviteli fehérje
RodA – Hidrofób fehérje
SCC - laphámsejtes carcinoma sejtvonat
SEM - pásztázó elektronmikroszkóp
ST- polyketid sterigmatocystin
TLS – Time-lapse Imaging System
t-BOOH - t-butyl hydroperoxide
VRC – vorikonazole

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalom

1. BEVEZETÉS.....	1
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1 Digitális képanalízis.....	5
3.1.1. Megjelenése a mikroszkópiában	5
3.1.2 Felhasználása.....	5
3.1.3 Lépései	5
3.1.4 Digitális képelemzés felhasználási területei	10
3.2 <i>Aspergillus nidulans</i>	10
3.2.1 Tulajdonságai	10
3.2.2 Élettani hatás	11
3.2.3 Szaporodás	12
3.2.4 Morfológiai változást kiváltó hatások	13
3.3 <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	14
3.3.1 Életciklusa	14
3.3.4 Patogenitás	17
3.4 <i>Candida albicans</i>	18
3.4.1 Tulajdonságai	18
3.4.2 Morfogenezise	19
3.4.3 Patogenitása.....	20
3.4.4 Biofilmképzése	21
3.5 <i>Mycoplasma</i>	22
3.5.1 Tulajdonságai	22
3.5.2 Patogenitás	22
3.5.3 A <i>Mycoplasma</i> kimutatása	23
3.6 Vizsgálati módszerek.....	23
3.6.1 Pásztázó elektronmikroszkóp	23
3.6.2 Minták általános előkészítése	24
3.6.3 Szárítás.....	25
3.6.4 Long term scanning rendszer, time-lapse imaging videómikroszkópia.....	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
4.1 Statikus képelemzési módszer kidolgozása <i>Aspergillus nidulans</i>on	28
4.1.1 <i>Aspergillus nidulans</i> általános minta előkészítése SEM-hez	28
4.1.2 <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek genotípusai	28
4.1.3 Törzsek rövid jellemzése:.....	28
4.1.4 Statikus képanalízis.....	29

4.2 képelemzési módszer tökéletesítése <i>Aspergillus fumigatus</i>al fertőzött egerek szövettani metszetein	34
4.2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> izolátum tenyésztési és növekedés feltételei	34
4.2.2 Kísérleti állatok tenyésztési feltételei	34
4.2.3 Kísérleti állatok fertőzése, humán fertőzés elleni védelem	34
4.2.4 Szövetminták előkészítése	35
4.2.5 A statikus képelemzés	35
4.3 <i>Mycoplasma</i> in vitro fertőzés dinamikai képelemzése	36
4.3.1 Sejtkultúrák	36
4.3.2 Sejtnövekedés	36
4.3.3 Time-lapse scanning mikroszkópia (TLS).....	37
4.3.4 A Dinamikus elemzés	38
4.4 Dinamikus képelemzési módszer fejlesztése <i>Aspergillus fumigatus</i> patogenitási dinamikájának vizsgálatához.....	39
4.4.1 Digitális képfeldolgozás	39
4.5 Dinamikus képelemző módszer tökéletesítése <i>Candida albicans</i> izolátumokon	44
4.5.1 Korrelációs számítás és szignifikancia analízis	47
5. EREDMÉNYEK	48
5.1 Genetikailag módosított <i>Aspergillus nidulans</i> gombatörzsek spóramorfológiájának összehasonlító vizsgálata	48
5.1.1 Törzsek összehasonlító elemzésének eredménye	48
5.1.2 Törzsek összesített spóravizsgálata	50
5.1.3 Méretkülönbségek vizsgálatának eredménye	50
5.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> patogenitási dinamikájának vizsgálata egér modellben	51
5.2.1 Szövettani vizsgálat és károsodás a tüdőben	52
5.2.2 Hifa növekedés vizsgálata az agyban	53
5.2.3 Pulmonális hifák hossza	54
5.2.4 Pulmonális aszpergillózis	55
5.3 <i>Mycoplasma</i> fertőzés korai detektálása dinamikus képelemzési módszerrel	57
5.3.1 A <i>Mycoplasma</i> fertőzés validálása	57
5.3.2 A <i>Mycoplasma</i> val fertőzött sejtenyészetek morfológiája és dinamikája	58
5.3.3 A sejtek felválása, aggregátumok megjelenése, biofilm képződés	60
5.4 <i>Aspergillus fumigatus</i> patogenitási dinamikájának vizsgálata hosszútávú videomikroszkópos rendszerrel.....	62

5.4.1 Brown mozgás megszűnése.....	63
5.4.2 Hifázás kezdetének vizsgálata	65
5.5 <i>Candida albicans</i> izolátumok tapadási és fertőzési dinamikájának összehasonlítása dinamikus képelemző technikák segítségével	67
5.5.1 Csoportos spóravizsgálatok	67
5.5.2 Egyéni spóravizsgálatok.....	73
5.6 Eredmények megbeszélése	79
5.6.1 Pulmonális aszpergillózis	80
5.6.2 Mycoplasma fertőzés time-lapse mikroszkópos kimutatása	80
5.6.3 Hifa elágazás megjelenése és gátlása antimikotikumokkal	81
5.6.4 Klinikai <i>C. albicans</i> izolátumok	82
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	83
7. KONKLÚZIÓ.....	84
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	85
9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	96
10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
11. TÁRGYSZAVAK.....	98

1. BEVEZETÉS

Az invazív gombák micéliális morfológiai változásainak vizsgálata elengedhetetlen a fonalas gombák patogenitásának mélyebb megértésében. Egyrészt ez hasznos ipari szempontból, mivel a micéliális folyamatok bizonyos típusai összefüggésben vannak az ipari fermentációk termelékenységével, másrészt orvosbiológiai szempontból is fontos, mivel az invazív gombás megbetegedések egyre gyakoribbak és halálos fertőzéseket is okoznak immunhiányos betegekben. A morfológiai változások kvalitatív és kvantitatív dinamikai paramétereinek meghatározása azonban továbbra is jelentős kihívást jelent a tudomány jelenlegi eszközeivel. A spórák letapadási dinamikájának pontosabb megismerése lehetőséget biztosíthat a fermentációs rendszerek termelékenységének növelésére, illetve az invazív gombás megbetegedések elleni védekezésre.

A dolgozatban bemutatott digitális képelemző technikák ezt a szakadékot hivatottak áthidalni. A statikus és dinamikus képelemző technikák felhasználhatók olyan gombapopulációk vizsgálatára is, melyekben az egyedi spórák jelentősége nő meg a tenyésztési ciklus alatt és ezek kitapadási és/vagy spórázási dinamikája követhető.

Megfelelő időbeli felbontás mellett a hosszú távú videómikroszkópos vizsgálatok segítségével definiált mikrobiológiai paraméterek valós időben és hosszú ideig vizsgálhatók. Ilyen paraméterek a spóranövekedés, letapadás, osztódás, biofilm képződés, konfluencia, mobilitás. Optimális esetben ezek a paraméterek a megfigyelés teljes időtartama alatt követhetőek és ez által összefüggéseikben is vizsgálhatóak lesznek. A videómikroszkópos rendszer által készített felvételek feldolgozása során nyert adatok specifikusan adaptált dinamikus képanalízist alkalmazva, egy vizsgált osztódási vagy szaporodási szakasz pontosabban modellezhetővé válhat.

A képanalízis során kvalitatív és kvantitatív szempontok szerint is tanulmányozhatjuk az egyes folyamatokat. A videómikroszkópia egy olyan, hosszú ideig (hetekig) folytatható monitoring-módszer, amelyet a célszerűen kiválasztott digitális képelemzéssel és adatfeldolgozással kombinálva olyan kísérleti elrendezést kapunk melynek fő előnye, hogy a változások időbeli lefutása dinamikusán vizsgálhatóvá, illetve modellezhetővé válik, így hűen tükrözi az időben lezajló folyamatokat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A jelenleg használatban lévő képelemzési technikák, valamint a Time-Lapse Imaging System (TLS) kombinációjával olyan metodika létrehozását tűztük ki célként, mely segítségével a mikrobiológiai mintákat időbeli paraméterek mentén tanulmányozhatjuk. E rendszerek együttes alkalmazása lehetővé teszi, hogy egyszerűen, sokoldalúan, reprodukálhatóan és időbeni dinamikájukat megőrizve, noninvazív módon figyelhessük meg a fonalas gombák életfolyamatait. Modellrendszerünk az alábbi mikroszkópos vizsgálatokra épül:

Statikus, snap-shot elemzések:

A dinamikus morfológia vizsgálatához először pillanatfelvétel-szerű (snap-shot) adatok alapján határozzuk meg a patogenitásra jellemző morfológiai paramétereket és elemzési algoritmusokat.

Pásztázó elektronmikroszkópia

A pásztázó elektronmikroszkóppal készített statikus fotókon képelemzést végzünk genetikailag módosított *Aspergillus nidulans* törzseken. A tömlősgombák (*Ascomicota*) spóráiból kialakuló haploid micéliumok végén sarjadó konidiospórák segítik a faj vegetatív szaporodását. A spórák morfológiai vizsgálatával feltérképezzük a vizuálisan detektálható változásokat a konidiofóron belül, illetve összefüggéseket keresünk az alaktani változások és a genetikai módosulások között.

Fénymikroszkópia

A statikus képelemzés következő lépcsője a fénymikroszkóppal készített szövettani metszetek vizsgálata. A metszetek *Aspergillus fumigatus* szelével kezelt egerekből származnak. A hifa méretek és átmeneti alakok kvantitatív digitális képelemzésével leírjuk a gomba terjedési dinamikájára jellemző hifamorfológiákat a különböző szövetekben megfigyelhető aszpergillómák alapján.

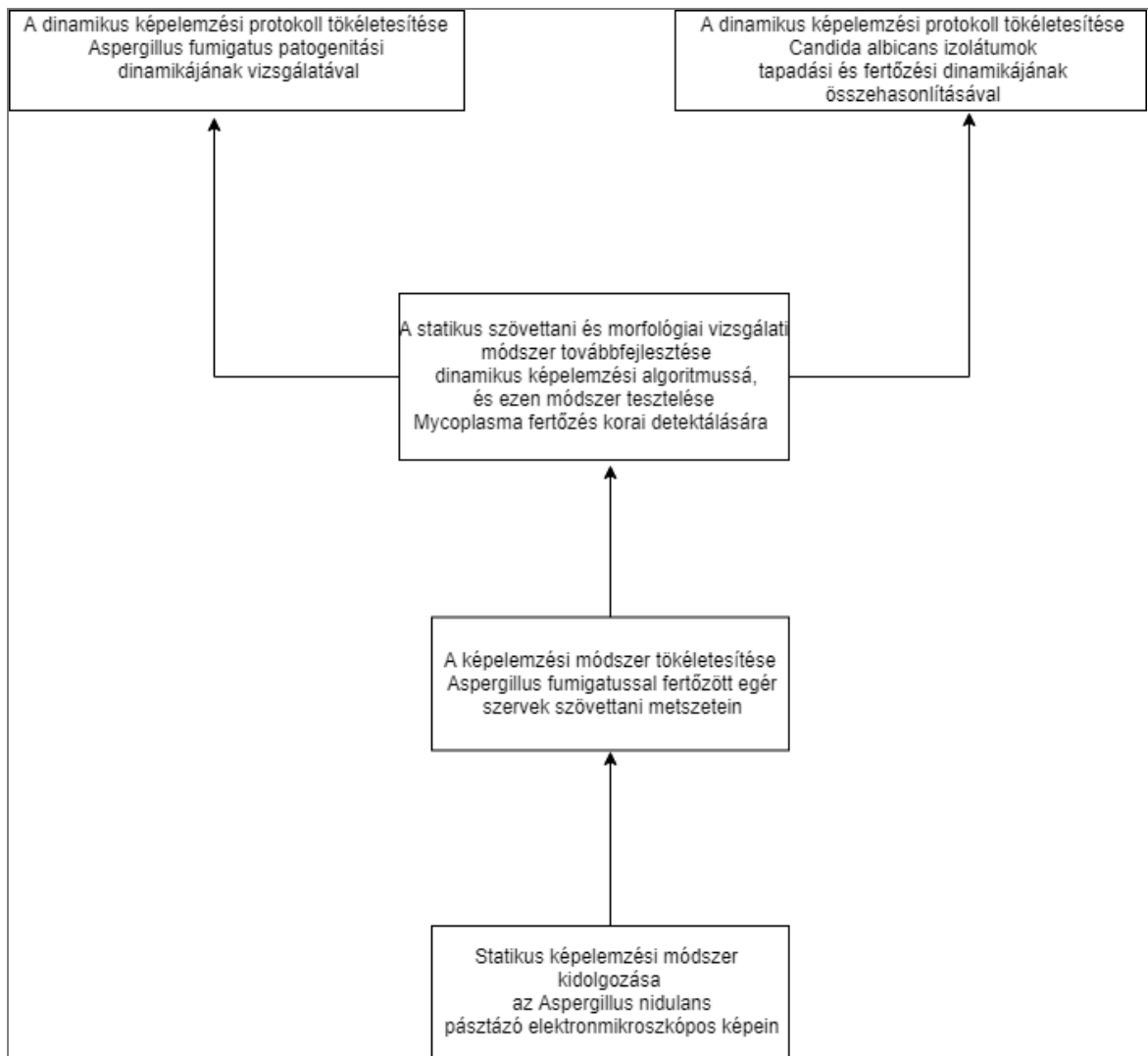
Dinamikus képelemzés

A statikus szövettani és morfológiai vizsgálatok alapján dinamikus képelemzési protokollok kerülnek továbbfejlesztésre *Mycoplasma* fertőzés korai felismerésének vizsgálatához.

Képelemzési módszerek fejlesztése

1. A képelemzési protokollok fejlesztéséhez egy már statikus képelemzési módszerrel korábban vizsgált fajt választottunk. Ebben a fázisban a fonalas gomba *Aspergillus fumigatus* letapadását és növekedési mintázatának változását vizsgáljuk dinamikus képelemzési módszerrel. Célunk az, hogy az antifungális szerek hatását kövessük az *Aspergillus fumigatus* letapadási és növekedési dinamikája alapján.
2. Képelemzési módszereink fejlesztését nemcsak a fonalas gombákon végezzük, hanem kiterjesztjük élesztő gomba vizsgálatára is. A statikus spóravizsgálatokról való áttérést a dinamikus vizsgálatokra alkalmazzuk klinikai *Candida albicans* izolátumok összehasonlítása során is. Vizsgálatainkban mérjük a Brown mozgás megszűnését, mint a felülethez való adhézió indikátorát, valamint az első hifa megjelenését és az első hifa elágazásának kezdetét. Az elemzések kiterjednek a fonalas gomba (*A. fumigatus*) spóráinak és az élesztő (*C. albicans*) izolátumok növekedési dinamikáját jellemző paramétereinek összehasonlítására is. Feltételezzük, hogy a *C. albicans* és az *A. fumigatus* spóraletapadási dinamikái egyaránt vizsgálhatók a Brown-mozgás megszűnésére alapuló dinamikus adhézióvizsgálati metodikával.

A statikus és dinamikus vizsgálataink közötti kapcsolatokat az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra: A statikus és dinamikus vizsgálataink közötti kapcsolatok folyamatábrán ábrázolva. Az ábrán látható, hogy milyen munkamenet szerint építettük fel modellrendszerünk kifejlesztését, és hogyan függenek össze a különböző vizsgálatok képelemzési módszerei

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Digitális képanalízis

3.1.1. Megjelenése a mikroszkópiában

A számítógépek és egyéb informatikai és technológiai berendezések rohamos fejlődésnek indultak az 1960-as években, főként a NASA-nak és az űrversenynek köszönhetően (1). A folyamat során a célszámítógépek elérték a képfeldolgozáshoz szükséges teljesítményt, és 1964-ben már az űrből érkezett fotókat vetették alá digitális jel/zaj viszony javításnak. Ezután, ahogy egyre jobb minőségű felvételeket rögzítő digitális kamerák jelentek meg, egyre részletgazdagabb képeket is rögzíteni tudtak a kutatók, és relevánssá vált a mikroszkopikus méretű objektumok megfigyelését igénylő tudományágakban a technológia alkalmazása. Megjelentek az ilyen feladatokra specializált programok, plug-inek, és a processzortechnológia fejlődésének köszönhetően az elemzések sebessége is ugrásszerűen javult. Napjainkra az egyik leggyorsabban fejlődő tudományággá nőtte ki magát, mert képes nagymértékben kitolni az eddigi biológiai megismerés határait.

3.1.2 Felhasználása

A digitális képelemzés végső feladata az alakfelismerés és kvantitatív leírás. Ehhez javít a rögzített felvételek minőségén és kijavítja a felvevőberendezések tökéletlenségéből adódó műtermékeket, emellett szűri az úgynevezett digitális zajokat. Nem csak megkönnyíti a kutató munkáját, hanem gyorsítja is, és statisztikailag javítja a kapott eredményeket, mivel időegység alatt sokkal több, vagy nagyobb területű mintát tud megvizsgálni. Ezen felül az emberi hiba lehetőségét is kiiktatja, illetve csökkenti (2,3).

3.1.3 Lépései

3.1.3.1 Megjelenítés, tárolás, tömörítés

A megjelenítés legkisebb egységei a pixelek, (picture element szó rövidítéséből). A feladat első lépéseként a rögzítő berendezés minden pixelhez rendel egy értéket, ami a detektor által a megfelelő helyen detektált fotonok számával arányos. Attól függően, hogy milyen értékeket vehet fel, soroljuk be kategóriákba az egységet. Egy elemzési csatornára vonatkoztatva

ilyenek a bináris (0 és 1 érték), szürkeskálás (0 és 255 közötti érték), 12 bites (0 és 4095), vagy a 16 bites (0 és 65535) rendszer (1,2).

A detekoregységek egymás mellé sorba, majd a sorok egymás alá rendeződve helyezkednek el. Egy kép felbontása a sorok és oszlopok számát jelöli. Például a HD felbontás egy 1920 oszlopból, és 1080 pixel sorból álló kép, mely 1920 x 1080 képpontból áll. A pixelek száma önmagában nem írja le a fénykép minőségét realisan. Ugyanilyen fontos paraméter a pixelsűrűség, aminek a jelölése a Dpi (Dot per inch) vagy a Ppi (pixel per inch). Ennek jelentése: egy inchre eső pixelmennyiség, ahol az inch a 25,4 mm-nek megfelelő hosszúságmérték. A képalkotó rendszer dinamikai érzékenységeinek szempontjából meghatározó paraméter továbbá a pixelek nagysága és az alkalmazott detektorteknológiára jellemző érzékenység és dinamikatartomány. A teljes leképező rendszer minőségét azonban az optikai elemek és a detektor együtt határozzák meg.

A felvételek alakja változó lehet, de általában téglalap alakú. A képelemzésnél az elemzett pontoknak van egy szekvenciája, ami a bal felső sarokban kezdődik és halad jobbra, majd soronként lefelé. A feldolgozás során ebben a sorrendben vizsgálják meg őket az ezzel foglalkozó alapvető programok. Egy konkrét objektum helyzete igen könnyen meghatározható sorának és oszlopának megadásával (1,3).

A pixelintenzitás értékek tárolása a memóriában történik, majd a mentést követően a háttértáron pixelek sorozataként rögzül, melyhez konverzió szükséges. A minőség megőrzésének szempontjából kétféleképpen történhet ez a folyamat.

A) Veszteséges (tömörített) formában: prezentációs célokra, és csupasz szem számára elegendő, kisebb memóriát foglaló formátum, ami általában JPEG algoritmussal tömörített, mely a pixelek hasonlóságán alapulva csökkenti a kezelendő adatok méretét.

B) Nem veszteséges formában: publikáláshoz, vagy vizsgálathoz alkalmazott módszer, ami az eredeti készítési minőségben kerül mentésre. A fájlmérete nagyobb, és a jellemző formátumok a TIFF és a PNG, de mindenképpen bittérkép (bitmap) jellegű formátum.

A képek általában kétdimenziósak (2D), ami azt jelenti, hogy az x és y tengely mentén elhelyezkedő pontokból állnak, de lehetnek háromdimenziósak (3D), amikor az x,y mellett a z tengely mentén térbeli (réteg) paramétert is felvesszünk. Ekkor a képpont neve voxel. Speciális

esetekben vannak 4-és 5 D-s képek is, amiben az extra dimenziókat az idő és a hullámhossz reprezentálja (2,3).

3.1.3.2 Hisztogram, Look-Up Table (LUT)

A hisztogram egy olyan diagram, amin az x tengelyen felvett intenzitásértékek találhatók meg, az y tengelyen pedig az adott értéket felvevő pixelek száma. A LUT az intenzitást (grayscale) helyettesíti egy szemléletesebb színekódolási művelettel. Az x tengelyen ábrázolt értékek határozzák meg a színeket, így a fotonszámból eredeztetett szám alapján egy szint, vagy a greyscale esetén szürkeskála értéket rendel az adott tengelyre. A tárolt információt ez a módszer nem befolyásolja, csak egy színértéket rendel hozzá, amivel az ábrázolást segíti elő. A kapott értéket a kép rögzítésének értékkészlete befolyásolja (8-12-16-24 bites, greyscale, vagy bináris), a színek skálája tehát széles határok között mozogva határozza meg a fotó szemléletességét. A LUT megadható a pixel értékek és intenzitások közötti összefüggés grafikus ábrázolással (2).

Ezek a paraméterek egységesen változtathatóak különböző módszerekkel. Ilyenek a fényerő változtatás, ami lényegében minden intenzitáshozzárendelést egy kiválasztott értékkel egyaránt növel vagy csökkent. A fokozott intenzitás az, ami külön a magasan tárolt számokat növeli egyenlő mértékben. Illetve a kontrasztfokozás, amely a skála középső területén levő pixelek megjelenített intenzitásának különbségét növeli meg (2,3).

3.1.3.3 képét degradáló tényezők és javításuk

A képek minőségét az alábbi faktorok ronthatják:

- Digitális zaj: A detektor jel-zaj viszonyának megfelelő módon jelentkező statikus eltérése a pixelek között mely az elemi érzékelőszegmensek egyedi érzékenységéből fakad.

- Fényszórás: Vastagabb mintáknál fényszórás tapasztalható, a kamera alacsony kontraszttal adja vissza a valóságos képet.

- Ragyogás: a mikroszkópban létrejövő reflexió okozza, a lencsék egymás között torzítják a bemenő fényt, és ezért nem kapunk jó jel-zaj viszonyú képet.

- Színi torzítás (kromatikus aberráció): A fény hullámtermészetéből adódó probléma, ami eltérő fényelhajlást okoz a különböző hullámhosszoknál, és elkenődött, életlen képet ad nem monokróm megvilágítás esetén.

Ezeket, és hasonló képalkotási hibákat a képfeldolgozó algoritmusok képesek kijavítani. A kép egyértelművé és értelmezhetővé tételével a kiértékelés is egzaktabbá válik. A képen található apró hibák beazonosítása és megszámlálása révén információt nyerünk arról, hogy a rendszerünk mennyire hűen képezi le a vizsgált objektumot. A hibajavítás úgy történik, hogy a hibásnak talált pixeleket az algoritmus kicseréli egy, a környezetében található többi képpontokból számított értékre (átlag, medián, stb). Ezzel csökken a zaj relatív mértéke, mivel nő az információhordozó virtuális fotonok száma, amiből az intenzitást kiszámoljuk, ugyanakkor növekedik a virtuális feloldóképesség is, mert a pixel intenzitását a környezetében lévő többi pixel befolyásolja (1,2,3).

Módosítást végző filterek. A filter a szűrés során alkalmazott eljárás, amely a pixeleket módosítja vagy helyettesíti a környezetéből vett értékek alapján. A kernel-mátrix méretei különbözőek lehetnek, például léteznek 3x3, 5x5, és 7x7-es környezetet figyelembe vevő filterek. A leggyorsabb ezek közül a 3x3-as változat, de figyelembe veendő, hogy a mátrixméret növekedésével, rendre nagyobb számítógépes kapacitás, és idő szükséges a feladat elvégzéséhez, ugyanakkor a kép nagyobb szegmenssén hajtható végre művelet. A filterek használatának gyakori céljai közé tartoznak a simítás, él detektálás, és gradiens meghatározás, az elemzési szempontból releváns információk kiemeléséhez.

A szűrők 2 fő fajtája a lineáris és nem lineáris szűrők. A lineárisak közül a legjelentősebb és legtöbbet használt két szűrő típus az átlagszűrő és a felül/alul áteresztő szűrő.

Átlagszűrő: minden pixel esetében alkalmazza a változtatásokat, még hozzá minden képpontnak a kiválasztott területű környezetében levő értékek átlagát helyettesíti be, és ilyen módon, elhomályosítja a határvonalakat.

Felül / alul áteresztő szűrő: A felül áteresztő szűrő eltünteti a képen rögzített apró részleteket, vagyis a kis tárgyakat szűri ki, míg az alul áteresztő szűrő a határértéket meghaladó méretű tárgyakat vagy a háttérrel távolítja el az adathalmazból.

Ezeknek a szűrőknek a használatával megadható az, hogy milyen mérettartományban vizsgáljuk az objektumunkat. Az előlotti, vagy ez alatti objektumokat az algoritmus zajként azonosítja és eltünteti a képről (3).

A nem lineáris szűrők közül említésre méltó a mediánszűrő, aminek a működése a következőképpen zajlik: minden pixelt a környező (pl. 3x3-as) terület értékeinek a mediánjával helyettesíti. Ez a szűrő jobban megőrzi a

határvonalakat, mint a többi filter, ugyanakkor korlátozottabban használható (2,3).

3.1.3.4 Szegmentálás

Háttér eltávolítás. A zajcsökkentésnek, és szűrésnek ebben a lépésben a képet legtöbbször két különálló szegmensre bontjuk: előtérre (foreground) és háttérre (background). Az előtér jelenti a kiértékelni kívánt tartalmat, és ezt vetjük alá további vizsgálatoknak. A háttérrel először eldöntjük, hogy maradt-e rajta érdemleges tartalom. Amennyiben nem, abban az esetben a kiértékelés szempontjából a továbbiakban ez a réteg érdektelennek bizonyul.

Küszöbérték meghatározás. A szegmentálás lépését követően csak kisebb pixelhalmazok maradnak hátra, melyek méretei a program beállításától függenek (pl. a keresett sejtek mérettartománya határozza meg). Ez a lépés lehet automatizált vagy hisztogram alapú, amikor manuálisan megadhatunk egy küszöbértéket, mely megszabja, a megtartani kívánt intenzitástartományt. Ez alatt az intenzitásérték alatt levő pixelek eltűnnek a folyamat következtében, vagyis a háttértartományba sorolódnak. Eredménye egy küszöbérték feletti ún. „Thresholded” kép, többnyire a bináris tartományra redukálva (1,2).

Vízválasztó jellegű a másik módszer, a régió alapú (watershed) szegmentálás, ahol a képet egy felszínnek tekintjük, és a képpontokhoz rendelt értékek jelentik a felszín magasságát. Az objektumok felismerése végbemeget automatikusan is, vagy ha pontosabb eredmények elérésére törekszünk, akkor kijelölhetjük manuálisan a képpontokat. Ha megvan a központ, akkor a további képpontokat a program önmaga kijelöli, és előtérnek veszi. A watershed szegmentálás kiválóan alkalmazható sejtmembrán, mitokondriumok, és egyéb celluláris képletek vizsgálatára.

3.1.3.5 Mérések kiértékelése

Kvantitatív értékek kinyerése. Miután az előtér azonosításra került, vagyis végrehajtottuk a szegmentálást, a kvantitatív értékek kinyerése a következő lépés. Ez azért szükséges, hogy a nagy mennyiségű feldolgozott minta alapján kapott információ numerikusan összevethető legyen. A program hiánytalanul azonosítja és megszámlálja az általunk bevitt paraméterek alapján keresett alakokat. Az értékek kinyerése lényegesen gyorsabb és objektívebb, mintha azt a laboratórium személyzete végezné szabad szemmel.

A számítógépes kiértékelés kiiktatja a rendszerből az emberi hiba (pl. elszámolás) lehetőségét és a megfigyelésekből rövid időn belül statisztikai súllyal bíró mennyiségű adatot szolgáltatathat.

3.1.3.6 Szoftverek

A leggyakrabban használt szoftverek a mikroszkóppal nyert mátrixállapotú számhalmazok feldolgozására alkalmas programok közül az ImageJ és a Fiji.

A Fiji egy olyan változata az ImageJ-nek, amelyet kifejezetten biológiai képanalízisre hoztak létre. Az elmúlt években, az automata mikroszkópoknak köszönhetően, nőtt a képi adatok mennyisége és komplexitása. Így az értelmezésük már nem nélkülözheti a szoftveres támogatást. Emellett a kisméretű, egyedülálló mikroorganizmusok nagy felbontású (2D, 3D) képfeldolgozása is lehetővé válik (6,7,8,9)

3.1.4 Digitális képelemzés felhasználási területei

A digitális képelemzést számos területen használják a biológiai kutatásokban, mivel, egyszerű a kezelése és megkönnyíti a munkát. A digitális képanalízis felgyorsítja az eredmények kinyerését és értékelését (5,11). A biomarkerek elemzése is sokkal könnyebbé és pontosabbá válik ezzel a módszerrel, és így meg tudják határozni a tumorok pontos típusát is, ezzel gyorsítva a szövet-alapú biomarker-diagnosztikát (6,11).

A kutatásom tárgyát képező patogén és nem-patogén fonalas gombák letapadási és növekedési dinamikájának és digitális képanalitikai vizsgálatának ismertetése előtt röviden összefoglalom a vizsgált gombák jellegzetes tulajdonságait.

3.2 *Aspergillus nidulans*

3.2.1 Tulajdonságai

Az *Aspergillus nidulans* a tömlős gombák *Ascomycota* törzsébe közé tartozik. Ez a törzs a gombák legelterjedtebb és legheterogénebb törzse, amennyiben a konídiumos *Deuteromycotákat* nem számítjuk, melyek tulajdonképpen mesterséges taxont alkotnak, azon gombák számára melyek fejlődési ciklusát

még nem ismerjük. A tömlősgombák közé tartoznak az élesztőgombák, penészgombák, lisztharmatgombák vagy éppen kucsma-, illetve szarvasgombák a termőtestes nagygombák köréből. Az *A. nidulans* ezen belül az *Eurtiomycetes* osztályba és az *Eurotiales* rendbe tartozik. A gomba sejtfalában a fő poliszacharid alkotórészt a glükánok képviselik, a sejtfal száraz tömegének 50-60%-át teszik ki. A glükán tartalom 65-90%-át a β -1,3-glükán teszi ki, amely mellett más glükánok is előfordulhatnak (12).

A β -1,3-glükánázok fontos szerepet játszanak a sejtfal plaszticitásának fenntartásában. Számos morfológiai folyamathoz szükségesek ezek az enzimek, mint például csírázás, hifa elágazások, szeptum képzés, párosodás, sporuláció, sarjadzás. A β -1,3-glükánázok fontosak a növénypatogenezis elősegítésében. A növényi patogén gombák által okozott emberi megbetegedések ritkák, viszont annál súlyosabbak. Halálos kimenetelű lehet az *A. fumigatus* és *A. terreus* által okozott humán tüdő aspergillózis.

A további sejtfal alkotók közül a kitin - egy 1,4-glikozidos kötésekkel összekapcsolódó N-acetil- β -D-glükózamin molekulából felépülő polimer - a gombák sejtfalának alkotórésze. A kitin három formája létezik α -, β - és γ -kitin. Az α -kitinben az N-acetil-D-glükózamin láncok antiparallel lefutásúak, β -kitinre a parallel lefutású láncok jellemzőek, míg a γ -kitin az előző kettő keverékéből épül fel. Fonális gombákban 10-20% kitint tartalmaz a sejtfal. A β -1,3-glükánnal együtt a sejtfal szilárdságát határozza meg.

A gombasejtfal felépítésében részt vesznek fehérjék is, melyek szorosan összefonódnak a glükán és kitin alkotta strukturális mátrixszal. Fonális gombákban hozzávetőleg a sejtfal 20-30%-át teszik ki.

Az autolízissel párhuzamosan β -1,3-glükánáz termelődik a sejtfalban jelentős mennyiségű β -1,3-glükánt tartalmazó fajok esetében (12).

3.2.2 Élettani hatás

Aspergillózt, ami egy *Aspergillus* faj hatására kialakuló szisztémás mikózis, főleg az *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* és *Aspergillus terreus* fajok okozhatják.

Az *Aspergillus* fertőzés két típusa különböztethető meg: az invazív és a non-invazív típus, melyek közül az invazív súlyos, olykor halálos kimenetelű. Opportunista fertőzés, amely többnyire immunkárosult embereket betegít

meg. A fertőzés helyétől függően a helyi gombás elváltozások kevésbé károsak, míg a mortalitási (elhalálozási) arány magas tüdő aspergillózisban, ahol eléri a 30-80%-ot.

Az *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 echinocandin B termelése miatt jelentős. A keresett antifungális hatóanyag (az echinocandin B), mivel széles spektrumú, és alacsony toxicitású, felhasználható azol-rezisztens *Candida* fertőzés esetében is. Mivel új antifungális szer, viszonylag kevés a vele szemben rezisztens törzsek száma. Az echinocandinok csoportjába tartozó pneumocandin B0-ból létrehozott caspofungint sikeresen alkalmazzák a gyógyászatban aszpergillózis kezelésére (13).

3.2.3 Szaporodás

Az *A. nidulans* életciklusának döntő többségében haploid, de stabil diploid állapotot is ki tud alakítani. Nagy mennyiségben képez vegetatív, egymagvú konídiospórákat. Ezek eltérő színűeknek köszönhetően - a különböző genotípusú törzsek - szabad szemmel is megkülönböztethetők és elválaszthatók. A termőtest askospórákat tartalmazó zárt gömbölyded kleisztotécium, mely éréskor megkeményedik és feketésbarna színű lesz (13,14). Vegetatív testük egysejtű vagy válaszfalakkal tagolt haploid micélium. A sejtfal anyaga kitin. A szeptumok falán egyszerű pórus van, amelyen keresztül a plazma és a sejtszervek migrációja figyelhető meg. Csak az élesztőszerű tömlősgombáknál áll a telep egy sarjadzással keletkező pszeudomicéliumból vagy sarjsejtekből. A többi tömlősgomba termőtestet képez.

Az ivaros szaporodás alkalmával a haploid micéliumon ivarszervek, anterídiumok és askogóniumok alakulnak ki. Az askogóniumok párzófonalat fejlesztenek az anterídium irányába, melyen keresztül a hím jellegű sejtmagvak az askogóniumba vándorolnak. Az összeolvadást nem követi azonnal kariogámia. Először magpáros sejtek, majd azokból magpáros hifák jönnek létre. A magpáros hifákból jön létre a termőtest. A termőtest kialakulása a tömlősgombákra általánosan jellemző. A kariogámia a dikariotikus hifa végsejtjében horogképzéssel megy végbe. A horogképződés mechanizmusa meggátolja két azonos ivarjellegű sejtmag összekeverését. A folyamat során a zigótát tartalmazó sejt megnyúlik, sporangiummá alakul, majd először meiózissal és azt rögtön követő mitózissal (általában nyolc) spóra alakul ki. Ezt a megnyúlt sporangiumot nevezzük tömlőnek vagy askusznak, a benne kifejlődött spórákat pedig askospóráknak. Az askospórák endogén módon keletkeznek, majd a tömlő felszakadásával vagy annak szabályos nyílásán át jutnak a szabadba. A tömlők a termőtestben elszórtan, vagy réteget alkotva helyezkednek el. Ez a termőréteg az

aszkuszkok tömött sorából és a közöttük elhelyezkedő steril hifákból áll (13,14). A kicsírázó aszkospórák haploid micéliumot (fonalat) hoznak létre, melyeken ivarszervek alakulnak ki. Egyeseknél ugyanazon a fonalon jön létre mindkét ivarszerv, mások esetében csak különböző fonalakon létrejött ivarszervek között jön létre a megtermékenyítés. Az aszkogóniumok párzófonalat fejlesztenek az antherídiumok felé, amelyen keresztül annak sejtmagjai átvándorolnak, létrehozva a magpáros gombafonalat (dikariotikus hifát). Ezekből jön létre a termőtest, melynek termőrétegében (himénium) kialakulnak a tömlők (ascusok). Itt történik a magok összeolvadása (kariogámia), melyet azonnal meiózis, majd mitózis követ, létrehozva a 8 haploid aszkospórát (2). Szilárd vagy folyékony tápközegben olyan gyorsan nő, mint egy fonalas gomba. Genomjának mérete körülbelül 31Mb, 11000-12000 gént tartalmaz. Ebből 900 gént azonosítottak. Ipari és orvosi jelentősége nagy. Sejtbiológiai és génszabályozással kapcsolatos kutatásokban hasznos modellként szolgál, például a mitózis megértésében, a motoros mitotikus kinezinek és citoplazmatikus dineinek funkcióinak tisztázásában. Szén és nitrogén anyagszere szabályozását is tanulmányozták. (12).

3.2.4 Morfológiai változást kiváltó hatások

Az *Aspergillus nidulans* morfológiai tulajdonságait számos tényező befolyásolja. A legújabb kutatások kimutatták, hogy a cAMP-függő protein-kináz genetikai változtatása például egy G-protein szabályzott jelátviteli útvonalban morfológiai és kémiai átalakulást indukál. A gombában egy heterotrimer G-fehérje alfa alegység és RGS domének FadA és flbA fehérje által kódoltak (15).

Szénéhezés következtében is jelentős morfológiai változások figyelhetők meg. Intenzív vakuolizáció mellett a glükóz elfogyását követően megkezdődik a szárazanyag mennyiségének csökkenése. A stacioner növekedési szakaszban, illetve a korai autolitikus szakaszban a még kis, kerek, összetapadó pelletes morfológiát mutató micélium degradálódik, ami a pelleték átmérőjének folyamatos csökkenésében, majd teljes dezintegrálódásában mutatkozik meg. Magas kitináz és proteináz aktivitás jellemzi a szakaszt. Ekkor a tenyészetek légzése visszaesik, megnő az anaerob légzés aránya, a reaktív oxigénformák mennyisége is nő. A tenyészet vitalitására folyamatos csökkenés jellemző és a sejtek apoptotikus pusztulását több apoptotikus marker jelenléte jellemzi (membráninverzió, DNS fragmentálódás, megváltozott morfológiájú sejtmagok kialakulása). Az autolízis szabályozottságára utal, hogy számos jelátvitelben illetve a

transzkripció szabályozásában sérült mutáns esetében megfigyelhető az autolízis folyamatának megváltozása (16).

3.3 *Aspergillus fumigatus*

Az *Aspergillus fumigatus* az Ascomycota osztály Trichocomaceae családjából származó gomba. Először 1863-ban Fresenius írta le. Ismert, hogy stabil haploid genomját 29,4 millió bázispár alkotja. Az *Aspergillus* fajok mindenütt jelen vannak a természetben, a levegőben, és a talajban. Az emberek belélegzik a gombák spóráit. Betegséget azonban rendszerint csak immunhiányos betegeknél okoz. Az immunrendszer fontos szerepet játszik nemcsak a belélegzett penészgomba felismerésében és a növekedés szabályozásában, hanem a szervezet allergiás és gyulladásos válaszreakciójának szabályozásában is. Az *A. fumigatus* fertőzések gyakran magas halálozási rátával járnak; ezért a korai diagnózis és az immunsuppresszált populációban történő kezelés fontos (17).

3.3.1 Életciklusa

Az éhezés során az *A. fumigatus* konídiumokat termel (asexuális spórák) a speciális hifa struktúrán az úgynevezett konidiofórokon, amelyek egymást követően konídiumot képeznek a konídiumtartókon. Az aszexuális *A. fumigatus* konídiumainak terjedése a környezetben hatékonyabb, mint más *Aspergillus spp.*-nél, mivel az *A. fumigatus* konídium hidrofóbicitás nagyobb, mint a más fajok által termelt konídiumoké (17,18). Becslések szerint az emberek naponta 100-1000 konídiumot lélegeznek be, melyek közül néhány (2-3 μm -es) kis méretük miatt eléri az alveolusokat a tüdőben. A légutak csillószőrös hengerhámsejtjei és a rezidens alveoláris makrofágok eltávolítják az belélegzett konídiumokat. Azoknál, akik nem tudják a belélegzett konídiumokat eltávolítani, bent maradhatnak a tüdőben, csírázhatnak és invazív fertőzést okozhatnak. Az emberi test 37 ° C - os hőmérséklete optimális az *Aspergillus spp.*-ek számára. 4-6 órán belül már kisebb hifák is megjelenhetnek, amelyeket csíra tömlőnek neveznek (18).

A közelmúltig azt gondolták, hogy az *A. fumigatus* csak aszexuálisan szaporodik. A szexuális szaporodás feltételei nagyon egyediek. Bár az aszkospórákat soha nem figyelték meg a természetben, a hipotézisek (17,18,19) szerint kedvezőtlen környezeti körülmények között a túlélés elősegítése miatt megjelenhetnek például olyan komposztokban, ahol a

hőmérséklet magas az erjedési folyamatok következtében. Az aszkospórák szerepe az *A. fumigatus* életciklusában nem teljesen tisztázott. Ezek csak egy 65 ° C-os hősok után képesek csírázni, ilyen állapot nem található meg az emberi szervezetben.

A csírázás után a hifa vagy micélium növekedése megkezdődik, és a gomba kolóniát képez. Az *A. fumigatus* kolóniát sokmagvú sejtek alkotják. Egy telepen az *A. fumigatus* hifái extracelluláris mátrixba (ECM) ágyazva találhatók, amikor biofilmet képeznek. Az ilyen biofilmeket statikus növekedési körülmények között vagy *in vivo* körülmények között alakítják ki az aszpergillómák kialakulása során. Az aszpergillóma egy gombadaganat (mycetoea), mely a testüregekben főleg az orrmelléki üregekben és a tüdőben fordul elő. A hifa sejtfal összetétele és szerkezete lényegesen eltérő lehet az egyedileg vagy biofilmben növekvő hifáknál. A fonalas gombák vegetatív formájának, sejtfalának szerkezete különbözik a konídiumok és a konidiospórák sejtfalszerkezetétől, amelyek csak a terjedéshez szükségesek. Az *A. fumigatus* az egyik leggyorsabb növekedési rátával rendelkező faj, amely számos más szaprotróf fajra is jellemzőt. Korai tanulmányok szerint az *A. fumigatus* különböző izolátumainak növekedési üteme arányban áll az egyes izolátumok virulenciájával (18).

3.3.2. Az *Aspergillus fumigatus* sejtfal

A sejtfal elengedhetetlen a gomba növekedéséhez, valamint a környezeti hatások és a gazdaszervezet védekező mechanizmusaival szembeni ellenálló képességhez. Az *Aspergillus fumigatus* sejtfala (Deacon, 1997) lúgban oldhatatlan fibrilláris vázból áll, melyet egy elágazó láncú β -1,3-glükán/ β -1,4-glükán épít fel (43 %), ehhez kovalensen kötődik a kitin (19 %), a galaktomannán (2%), de tartalmaz fehérjét (11%) és lipidet (5 %) is. A sejtfalban lévő fehérjék átjuthatnak a sejtfalon keresztül, majd szekretálódhatnak, vagy lehetnek glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) -regulált fehérjék, amelyeket egy endogén foszfolipáz C képes leadni (18). A sejtfal jellemzői miatt a gombák sejtfalának bioszintetikus enzimeji fontos célpontjai lehetnek az antifungális gyógyszereknek, mint a β - (1,3) –glükánszintézist gátló echinocandinok. Az echinocadin B szintéziséért felelős gén klasztert az *Aspergillus nidulans*-ban írták le (Hüttel et al. 2016).

A felszíni mannán réteg radiális pálcikaszerű elemei (rodlet) a konídium felületét borítják és a hidrofób jelleg kialakításáért felelősek. A konídium sejtfalában az β -1,3-glükán-20, a melanin és a RodA hidrofobin sűrű réteget

képez a konídium körül. Az *Aspergillus fumigatus*-nak hét hidrofobin génje van (19,20). A belső rétegek a sejtfelszínnel párhuzamos kötegekbe rendeződnek.

A hifa sejtfala lényegesen különbözik a konídium sejtfalától a szénhidrátok eloszlásának tekintetében. A sejtfal összetétele és szerkezeti felépítése folyamatosan átrendeződik. A csírázást követően a gomba külső melaninréteget és rodlet réteget képez, és ezután a hifa növekedés folytatódik. Ez a növekedés azonban nem eredményezi a melanin vagy a hidrofobin teljes elvesztését a hifa sejtfalából. Az *A. fumigatus*-t aerob körülmények között agaros táptalajon tenyésztik, ekkor gyorsan nő, az extracelluláris mátrixban melanint és hidrofobinokat tartalmazó biofilm alakul ki. Az *A. fumigatus* és más gombák vegetatív növekedésének egyik jellemzője a multicelluláris és többrétegű hifákkal jellemzett kolóniák kialakulása, amelyek össze vannak "ragasztva". Ezért ezt a struktúrát gyakran biofilmnek nevezik, mivel a baktériumok vagy élesztők által létrehozott biofilmek tipikus jellemzőivel rendelkeznek. Az összes *A. fumigatus* fertőzésben, valamint a szilárd szubsztrátumú környezetben a hifák ezen többrétegű gomba-struktúrákba extracelluláris mátrixba vannak ágyazva, amely galaktomannánból, GAG-ból, β -1,3-glükánokból, melaninból és fehérjékből áll, amelyek elősegítik a fertőzést. Az *A. fumigatus* számos külső antifungális hatásnak van kitéve, ami ellen a sejtfalszerkezete módosításával védekezhet. Például olyan vegyületek, amelyek megzavarják a sejtfal felépítését vagy szintézisét. Antifungális szerek hatóanyagai aktiválják a sejtfal integritást (CWI), amely függ a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonaltól. A CWI útvonal jelentős szerepet játszik a sejtfal karbantartásában, és meghatározza a stresszválaszokat és az energiafogyasztást a sejtes folyamatokban, amelyek a növekedéshez és fejlődéshez szükségesek. Egy másik fontos út az antifungális környezeti stressz ellen magas-ozmolaritású glicerin (HOG) út, amely alacsony pH-értéket, reaktív oxigénformákat (ROS), hipoxiát és a gomba elleni hatóanyagokat érzékeli. A kalciummal közvetített jelátvitelt a sejtfal enzimek aktivitásának szabályozásában, különösen a sejtfalat célzó fungicid gyógyszerekre adott válaszként is leírták. A kalcium jelátvitel magában foglalja a kalciumkötő fehérje kalmodulint és a szerin / treonin protein foszfatáz kalcineurint. Ezek az adaptív folyamatok és az *Aspergillus spp.*-ek morfológia megváltozása fontos a gazdaszervezet és a gombák közötti komplex kölcsönhatások megértésében (20).

A biofilmek a mikroorganizmusok multicelluláris közösségei amelyeket, extracelluláris mátrix vesz körül. A közösségekben való növekedés előnyöket biztosít a mikroorganizmusok, köztük a gombák számára, a szubsztrátum

kolonizációjának egyszerűségét, a környezeti hatások elleni védelmet, az ellenállást a fizikai és kémiai stresszel szemben, az anyagcserében tapasztalható-együtműködésben és a génexpresszió szabályozásában (20). Statikus körülmények között az *A. fumigatus* micélum agglutinált és hidrofób hifák hálózataként nő, így a krónikus aszpergillózisban is. Az *A. fumigatus* biofilmet képez, mely extracelluláris mátrixba ágyazott micélium szövedéket, krónikus hámszövet alatti fertőzést, mycetoma-t hoz létre. A biofilmképzéssel szemben a hifák agglutinációja kevésbé fontos az invazív aszpergillózisban. A hifa hálózat felületén kimutatták a poliszacharidokban gazdag extracelluláris mátrix (ECM) jelenlétét. Mind a krónikus, mind az invazív aszpergillózisban kimutatták, hogy a hifák ECM-et állítanak elő. Az ECM olyan poliszacharidokat tartalmaz, mint a GM, GAG és egy (1,3) -glukán. Ugyanazok a poliszacharidok vannak jelen *in vivo* krónikus és invazív aszpergillózisnál. A GAG és a β - (1,3) -glukánok fontos szerepet játszanak a hifák egymáshoz való tapadásában. A poliszacharidok mellett *in vitro* az ECM hidrofobinokat és melanint is tartalmaz (19).

3.3.4 Patogenitás

Aspergillus spp.-ek mindenütt jelen vannak a környezetben. Az *Aspergillus fumigatus* a leggyakoribb kórokozó az *Aspergillus spp.*-ek között és fertőzést okozhat a szervezet több pontján a tüdőben, az orrmelléki üregeken, a központi idegrendszerben, a fülön és a bőrön. A felső légutakban a konídiumok kellemetlen érzést okozhatnak irritáció és allergiás reakció következtében. Az invazív tüdő-aszpergillózis (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) egyre gyakoribb gombafertőzés, amelynek magas a mortalitási aránya immunhiányos betegekben. Az IPA korai felismerése továbbra is kihívást jelent, nem specifikus klinikai tünetei és radiológiai kimutathatóságának korlátai miatt (21). Az *Aspergillus*-fertőzés elsődleges útvonala légúti, konídium belégzése útján történik. Az *A. fumigatus* konídium átlagos mérete 2,0-3,0 μm . Kis mérete miatt a konidia könnyedén terjed a levegőben. Az *A. fumigatus* konídium termelése rendkívül gyors és folyamatos, ezért a fertőzés veszélye is folyamatosan fenn áll (22).

A makrofágok általi fagocitózis fontos tényező az *A. fumigatus* fertőzés és így a patogenitás elleni védekezésben. E folyamat során a fagocita külső sejtmembránján szórtan elhelyezkedő receptorok először felismerik az ellenanyagot, majd az idegen testtel való kötődés során fészekszerűen összetömörülnek. Ezt követi a pseudopódium membránkiemelkedések kiterjesztése, hogy körülfogják és a célpontot a sejten belül egy zipzárszerű mechanizmussal lezárják. Ezután következik a lizoszómákkal történő fúzió, a

fagolizoszóma, a szuperoxid és a hidroxilgyök generálása és a célpont degradálása (23).

A közelmúltban kutatások igazolták (24) hogy a polimorfonukleáris leukociták (PMNL-ek) a belélegzett konídiumok ellen is felveszik a harcot. Ellentétben az alveoláris makrofágokkal, a PMNL-ek a légutakban a konídiumok körül aggregálódnak, és megakadályozzák a csírázást NADPH-oxidáz-tól független módon, mely az elsődleges granulákból lactoferrin felszabadításával jár.

A vérlemezék az *A. fumigatus* konídiumok és a hifák károsodását okozzák, a belőlük felszabaduló szerotonin segítségével. A légzőszervben jelen lévő antimikrobiális peptidok közé tartoznak a felületaktív fehérjék, a laktoferrin, a lizozim és a defenzinek. Az első védelmi vonalon átjutó konídiumok kicsírázhatnak miközben konidiális duzzanatot (izotróp növekedést) okoznak, amelyet a konidiális sejtből (poláris növekedés) a hosszúkás tömlő kialakulása követ. A konidiális duzzadások jelzik ezeknek a sejteknek nyugvó állapotba térését. A csírázás meleg, nedves és tápanyagban gazdag környezetben történik, melynek jellemzőit a tüdő alveolusok és az *Aspergillus* fajok sajátos ökológiai tulajdonságai határoznak meg. A poláris növekedés mitózissal történik, amely a csírázási tömlő alján lévő szeptum kialakulását idézi elő. Az alveoláris makrofágok által ténylegesen fagocitált konídiumokkal ellentétben az *A. fumigatus* hifák túlságosan nagyok ahhoz, hogy a makrofágok bekebelezzék őket, ezért a hifákat elsősorban a PMNL-k célozzák meg őket. Ezek a PMNL-ek a hifák köré csoportosulnak, és antimikrobiális peptid granulátumok extracelluláris felszabadításával károsítják őket (23,24).

3.4 *Candida albicans*

3.4.1 Tulajdonságai

A *Candida* fajok az Ascomycota törzsbe tartoznak, és általában az egészségre ártalmatlan élesztőgombák. A *C. albicans* a sarjadzó gombák közé tartozó dimorf gomba, amely képes fonalas szerveződéssel válaszolni egyes stresszhatásokra, ezáltal erősítve fertőzőképességét (25,26).

A *C. albicans* blasztospórákat termel, melyek aszexuális spórák, melyek a sarjadás közben képződnek. A blasztospórának szerepe van a felületen való megtapadásban, és a későbbi kolóniális fejlődésben (27).

Sokáig nem találtak szexuális ciklusra utaló jelet a *C. albicans*-nál, majd kimutatták a *Saccharomyces cerevisiae* párosodási-típus génjeihez (MAT) nagyon hasonló, párosodási-típus-szerű (MTL) géneket (28). A MAT lókuszon elhelyezkedő gének a transzkripció szabályozásában, a feromonok létrehozásában és a feromon érzékeléséért felelős receptorok felépítésében játszanak szerepet. Az MTL lókuszt hasonlatosságot mutat az *S. cerevisiae*-ben lévő MAT-hoz, mert egyrészt hasonló transzkripciószabályozó fehérjéket kódol, másrészt heterozigóta (28,29).

A *C. albicans* szaporodása túlnyomórészt koloniális, azonban van paraszexuális ciklusa is, amely során a diploid szülők párosodnak, ami tetraploid utódokat eredményez. A tetraploid utódok később szintén diploidok lesznek kromoszómavesztéssel. Ez a ciklus a természetben csak ritkán figyelhető meg, valószínűleg a stresszfaktorok váltják ki (28,30). A paraszexuális ciklusban a gomba hím- és nőspecifikus feromonokat szekretál, melyek az ellenkező nemű sejtekből párosodási választ indukálnak, ami sejt-sejt konjugációhoz és sejtmagok összeolvadásával kariogámiához vezet (31).

3.4.2 Morfogenezise

A virulencia szempontjából nagyon fontos a *C. albicans* azon képessége, hogy váltani tud az élesztő, a pszeudohifa és hifa növekedési formák közt. Egyes mutáns *C. albicans* fajok, melyek képtelenek a hifa létrehozására, általában fertőzni sem képesek (32,33). A polimorf gomba képes ovális alakú sarjadzó élesztőként is nőni, illetve hosszúkás ellipszoid sejtnek is, ahol vagy a szeptumnál kapcsolódik (pszeudohifa), vagy párhuzamos falakkal rendelkezik, mint a hagyományos hifa. A további morfológiai változatok közé tartoznak a fehér és az áttetsző, opálos sejtek, amelyek polimorf átalakulás közben jönnek létre, illetve a klamidospórák, melyek vastag falú, spóra-szerű struktúrák (32,34).

Morfológiai változások hatása a virulenciára:

Csökkent virulencia figyelhető meg azoknál a fajoknál, melyek nem képesek élesztő formában nőni (35). Ha a gomba átesik a morfogenezisen, akkor pszeudohifális vagy hifális formában fonalakat állíthat elő (33). A *C. albicans* a gazdaszervezetben megtalálható fonalas- és élesztőgombaként is, míg más dimorf patogén gombák általában fonalasként növekednek az emberi testen kívül, de az emberi szövetbe bekerülve átváltnak az élesztő formára (36). A hifa forma a fertőzésben játszik kulcsszerepet, képes behatolni a szövetbe és megmenekülni az immunsejtektől. Ez a morfológiai váltás kapcsolódik a

virulenciához, mivel az ezeket irányító gének együtt fejeződnek ki azokkal a génekkel, amelyek a virulencia faktorokat kódolják (37). Az élesztőből a hifába való átmenetet több anyagcserefolyamat és környezeti jelenség okozhatja, például a szérum, neutrális pH, magas hőmérséklet, éhezés és a tapadás is (38,39,40,41).

A hifa fejlődése során az adenilát cikláz Cyr1 érzékeli és integrálja a hifa változást serkentő jelzést, mely nélkülözhetetlen a hifa fejlődéséhez. A Cyr1 célpontja a cAMP-függő protein kináz A (PKA). A cAMP-PKA útvonal és további jelátviteli utak, illetve transzkripciós faktorok fontosak a hifa növekedés megkezdéséhez és fenntartásához (37). Ebben a folyamatban a szükséges gyors alkalmazkodás a gyakori fenotípusos változáshoz köthető (33). A sejt ~~fehérről~~ áttetszővé válása kritikus lépés a morfogenezisben (32,43).

3.4.3 Patogenitása

C.albicans sokféle szövet fertőzésére képes, mely a virulencia faktorok széles skálájának és ~~fitnesznek~~ alkalmazkodó képességének (fitnesz) köszönhető. Virulencia faktornak tekinthető a morfológiai átmenet az élesztő és a fonális forma között is (32,44).

A fitneszhez tartozik a gyors alkalmazkodás a környezet ingadozó pH-jához, a gomba anyagcsere folyamatainak rugalmassága, hatékony tápanyagfelvevő rendszere és az erős stresszválasz mechanizmusa (45,46). A hifa forma invazívabb, mint az élesztő forma (47). Viszont ez utóbbi nélkülözhetetlen a terjesztésben és fontos szerepet játszik a betegség korai szakaszában (32,48).

A *C. albicans* virulencia faktorai közül az adhezinek egy speciális csoportja a proteineknek, melyek a tapadást biztosítják más mikroorganizmusokhoz, abiotikus felületekhez és a gazdasejtekhez (49). Ezek egyik csoportja az agglutinin-szerű fehérjék (ALS), amelyek egy nyolc tagból álló családot alkotnak. Az adhézióhoz a legfontosabb az Als3, melynél a legnagyobb fenotípusos változást figyelték meg (50). Az ALS termelődése megnő a száj és a hüvely epiteliális sejtek fertőzése során (51,52). Másik fontos virulencia faktor adhezin a Hwp1, egy hifa-specifikus felszíni fehérje. Ez stabil kötődést biztosít a csíratömlő és az emlős sejtek közt (53). Mindkét adhezin hozzájárul biofilm képzéséhez is (32,54).

Szubsztrátummal való érintkezéskor az élesztősejtek hifázni kezdenek. Bizonyos felületeken - pl. agar, nyálkahártya - ezek a hifák képesek bejutni. Szilárd felülettel való érintkezés szintén biofilm képzést indukál (55). A sajátos topológiák megfelelő felületeivel érintkezve irányított hifális

növekedés (tigmotropizmus) következhet be (32). A gazdasejthez való tapadás és a hifázást követően a gomba hidrolázokat szekretálhat, melyek elősegítik a behatolást (56). A gomba hidrolázok három fő fajtája: proteázok, foszfolipázok és lipázok (32,33).

3.4.4 Biofilmképzése

Biofilm leggyakrabban katétereken, műfogsorokon (abiotikus) és a nyálkahártyán (biotikus) képződik (57).

Fogsoron a korai szakaszban a *C. albicans* blasztospóráként, azaz élesztősejtként nő, így hozzá tud tapadni a felszínhez, de különálló kolóniákként nőnek a spórák. A középső szakaszban a gombasejtek vastag sávokká állnak össze, mivel szabálytalan felület mentén nőnek, és így egy nem-sejtes, poliszacharidban gazdag filmet hoznak létre, ami a kolóniákat lefedi.

A biofilmképzés kialakulása több, egymást követő folyamatból áll:

- 1) az élesztősejtek kitapadása,
- 2) a sejtek osztódása,
- 3) a hifa képzés a biofilm tetején,
- 4) az extracelluláris mátrix anyag felhalmozódása
- 5) az élesztősejtek diszpergálása a biofilm komplexről.

Az érett biofilmek, az apró sejtekhez képest, sokkal ellenállóbbak az antimikrobiális szerekkel és a gazdaszervezet immunrendszerével szemben. A megnövekedett rezisztenciáért a biofilm komplex felépítése a felelős. Az élesztősejtek biofilm képzése a hozzájárul a virulenciához, mivel ezeknek a sejteknek a fertőzőképessége erősebb (58). A Hsp90 hősokk fehérje felelős a szétszóródásért, illetve a biofilmek gombaellenes szerekkel szembeni rezisztenciáért is felelős (32,59).

Az érett biofilmek sűrű hálózatot alkotnak, amely élesztősejtekből, csíratömlőkből, pszeudohifákból és hifákból áll, és ezek felületén extracelluláris polimer anyagok lehetnek. *In vitro* a gombasejtek magas poliszacharid tartalmú extracelluláris mátrixba ágyazva találhatók. Az *in vivo* termelt, vagy páciensekből származó mintákban a biofilmek olyan

molekulákat is tartalmaznak, melyek a gazdaszervezetből származnak, például fibrinogén és elhalt sejtek (27).

3.5 *Mycoplasma*

3.5.1 Tulajdonságai

A mycoplasmák tárgyalására azért kerül sor, mert a biofilm képzés jó modelljei. A *mycoplasmák* Gram-pozitív eredetű baktériumok, de nincs szilárd sejtfaluk, így ellenállnak a Gram-festésnek. A sejtfal hiánya miatt különböző formáik lehetnek (gömb, ovális alakú, szálak, gyűrű, stb.), de hiányoznak a csillók és a spórák. A mikrobát borító membrán érzékeny a környezeti változásokra fiziológiás oldatokban vagy Bouillon médiumban (60).

A *Mycoplasma* fajok azonosítása később történt, mint a baktériumoké és a vírusoké. A *mycoplasmák* emberre vonatkozó patogenitását először az 1950-es években írták le. Széles körben elterjedt baktériumok: az emberek, az állatok és a növények szöveteiben és sejtjeiben is élhetnek (49). Vélhetőleg egy olyan organizmusból származnak, amely hasonló a nagy Adenin-Timin tartalmú Gram-pozitív baktériumokhoz, mint például a *Clostridium* és a *Bacillus* fajok. A *Mycoplasma* fajok paraziták, életciklusuk ezen életmód széles skálájához igazodott (61). A legtöbb *Mycoplasma* genom mérete körülbelül 1 Megabázis (Mb) (62). Bár a *Mycoplasmák* viszonylag kevés metabolikus útvonallal rendelkeznek, fejlettek a gazdaszövetekben történő internalizálási, membránszállítási, gazdaszövet-tapadási rendszerek, valamint rendelkeznek az ostorok nélküli kigyózó képességgel (sliding motility) (60).

Ezek az élőlények a legkisebb (0,3-0,8 µm) és a legegyszerűbb önreplikáló mikroorganizmusok, amelyek szelektív szubsztrátumokon növekedhetnek. A *Mycobacteriumok* súlyos betegségeket, például tuberkulózist (*Mycobacterium tuberculosis*) vagy leprát (*Mycobacterium leprae*) (63) okozhatnak.

3.5.2 Patogenitás

A *Mycoplasma* fertőzés leggyakrabban légúti rendellenességeket okoz, mely többször is kialakulhat. Emellett a mycoplasmák az urogenitális traktus bizonyos betegségeit is okozhatják, amelyek szexuális úton terjednek (65,66).

A laboratóriumi körülmények között a *Mycoplasma* fertőzések jelentős károk okozói lehetnek. A sejtekben nehéz a detektálásuk, kontrollálásuk, elpusztításuk. A mycoplasmák által okozott fertőzések a sejt kultúrákban különféle változást okozhatnak. A növekedés sebességbeli, morfológiai és metabolizmusbeli változásait indukálhatják, kromoszómális rendellenességeket okozhatnak, és végső soron a sejtvonalak pusztulását eredményezhetik a fertőzések.

A *Mycoplasma* általában az eukarióta sejt felszínéhez kötődik, amely összeolvadhat a fogadó sejtrel, vagy közvetlenül megtámadhatja azt (64,65) *Mycoplasmák* különböző biológiai folyamatok megzavarása révén (66) okoznak fertőzést laboratóriumi állatokban (67) és sejt kultúrákban (68). A sejtek támadását követően, a *Mycoplasmák* lebontják a médium anyagait, megzavarva a gazdasejt életfolyamatait (64,69). Az eukarióta sejtek fertőződése megszakítja az anyagcsere-folyamatokat, (65) megváltoztatja a sejt morfológiát, gátolja a gazdasejtek replikációját, sejtes transzformációkhoz vezet (71,72) és emellett a szervezetben serkenti az immunrendszer reakciókat (70,71). Az első *Mycoplasma* sejt kultúrát viszonylag későn, 1956-ban írták le (73).

A legtöbb *Mycoplasma* fertőzés fertőzött állati szérumból származik, de a fertőzött laboratóriumi aeroszolok használata is hozzájárul a fertőzések terjedéséhez. A *Mycoplasma* detektálhatóság a sejtenyészetekben attól függ, hogy mekkora periódus telt el a fertőzés és a mintavétel között (66).

3.5.3 A *Mycoplasma* kimutatása

Számos *Mycoplasma* teszt előnyeivel és hátrányaival együtt azt is jelzi, hogy nincs általánosan elfogadott módszer, amely felhasználható a fertőzés korai stádiumában való azonosítására. Sajnos a *Mycoplasma* fertőzés követésének módszerei se nem egyszerűek, se nem gyorsak és speciális eszközparkra van hozzájuk szükség. A *Mycoplasmák* orcinnal, fluoreszcens mikroszkóppal történő azonosítása a fluoreszcencia jelölés után időigényes módszerek, melyek nem alkalmasak a *Mycoplasma* fertőzés dinamikájának megfigyelésére.

3.6 Vizsgálati módszerek

3.6.1 Pásztázó elektronmikroszkóp

A pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electronmicroscope, SEM) elektronoptikai eszköz, a vizsgált tárgy felszínének meghatározott területét irányított, vékony elektronnyalábbal végigpásztázza. Az elektronsugár és a tárgy kölcsönhatásából származó jeleket és visszavert elektronokat erre alkalmas detektorokkal érzékeli, és ezeket megfelelően feldolgozva, az elektronsugár mozgásával szinkronizálva képileg kijelzi. Lehetőség van a minta felszínén található anyag alapján a vizsgált objektum fizikokémiai tulajdonságainak meghatározására (74,75).

A pásztázó elektronmikroszkóp legáltalánosabban használt sajátossága az, hogy a vizsgált anyagok felszínének alaki tulajdonságairól nagy felbontású és nagyítású, ugyanakkor nagy mélységélességű képet tud alkotni.

A vizsgálathoz elektromosan vezető mintára van szükség, a minta felszínén az elektron töltés halmozódás elkerülése érdekében. Ez a töltés torzítja a képet, különösen a szekunder elektronokkal létrehozott kép esetében. Ha a minta eleve vezető, akkor vezető ragasztóval rögzítjük a földelt mintatartó asztalhoz. A rögzítés céljára kapható szén- vagy ezüstpaszták, amelyek elektromosan vezetnek, rögzítik a mintát, ugyanakkor viszonylag egyszerűen megoldható az eltávolításuk is. Rögzítés céljára kapható kétoldalasan ragasztós vezető szalag is (76).

A biológiai minták rossz vezetők, felületüket ezért vékony vezetőréteggel szokás bevonni. Ez a réteg általában arany vagy szén, amelyet párologtatással vagy plazmával lehet a felületre felvinni. Fontos, hogy a vezetőréteg egyenletes vastagságú és a lehető legvékonyabb legyen. A felvitt réteg megnöveli a felületről visszavert másodlagos elektronok számát, ezzel növeli a kép fényességét, sőt a felbontást is. A gőzölés előtt a felület tisztítása is szükséges lehet (74,75,76).

3.6.2 Minták általános előkészítése

A vizsgálni kívánt mintákat először fixálni kell. Erre a legáltalánosabban az elektronmikroszkópos technikákban jól bevált, a finomszerkezet megőrzésére alkalmas aldehid-ozmium kettős rögzítés használatos. Bizonyos fokig eltérést jelent az, hogy a felszín vizsgálatoknál nem a belső szerkezet megőrzése, hanem a zavaró szennyezésektől mentes felszín nyerése a cél. Alapvető fontosságú ezért a vizsgálni kívánt felszín gondos letisztítása a fixálóba merítés előtt. Ugyancsak hasonlóan fontos, hogy a fixálás, illetve a további előkészítés során a felszín szennyeződés- és sérülésmentes maradjon. Általában előnyösebb SEM vizsgálatokhoz az általános szövettani eljárásnál hosszabb, a szövet keménységét jobban fokozó fixálást alkalmazni, és

esetenként még jobb eredmény érhető el speciális, az anyagot merevítő hatású impregnálási eljárásokkal (74,77).

3.6.3 Szárítás

A vákuumtérben történő vizsgálathoz az anyagokat szárítani kell. Az általában folyékony nitrogénnel lehűtött tárgyasztalokra helyezett fagyasztott, de kémiaiilag nem módosított minták vizsgálata analitikai célokra használható. A morfológiai felbontóképesség az ilyen mintákon igen szerény, és csak az analizálandó terület kiválasztására szolgál (78).

A szárítás a lágy szövetek esetében igen kritikus eljárás a szerkezet megtartása szempontjából. A sejtek, szövetek finomszerkezetének fenntartásában a hidrofób és hidrofil csoportok kölcsönhatásainak igen nagy szerepe van, és ez az érzékeny egyensúlyi állapot a víz eltávolításával megbomlik.

A lágy szövetek szárítása közben azonban a folyadék és a gőzfázis felületére az anyag szerkezeti elemein áthalad, ami az igen erős felületi feszültségi effektusok következtében molekuláris átrendeződéseket okoz (76,78).

A végeredmény a szövet zsugorodása és torzulása. Ezek a nem kívánatos hatások gyakorlatilag elhanyagolhatóra csökkenthetők a megfelelő fixáló szerekkel végzett erőteljes („merevítő”) kezeléssel esetleg valamilyen impregnációs módszerrel, valamint olyan szárítási módszerekkel, amelyek a felületi feszültség hatását csökkentik, vagy kiküszöbölik.

Fagyasztva szárítás: Ez azzal küszöböli ki a szerkezetváltozásokat, hogy a jég vákuum-szublimálásával a felületén jelentkező felületi feszültségi hatásokat kiiktatja. Itt azonban egy másik probléma jelent hátrányt; nevezetesen az, hogy a fagyasztás közben képződő jégkristályok károsítják az anyag szerkezetét. Ez a jelenség csökkenthető, ha a fagyasztva szárítás valamilyen apoláros oldószerrel (alkohol, amilacetát, butanol) történik. Ez azonban bonyolítja, eszköz- és munkaigényessé teszi az eljárást (74,78).

Kritikus ponton szárítás: a kritikus pont a folyadékoknak és telített gőzeiknek azt a hőmérsékleti és nyomásértékét jelenti, amelyen a folyadék és telített gőzeinek sűrűsége azonos, így a két fázis közötti határfelület eltűnik. A kritikus ponthoz tartozó hőmérséklet a kritikus hőmérséklet, e fölött az anyag csak gázhalmazállapotban létezik, semmilyen nagy nyomáson sem cseppfolyósítható. Ha egy folyadékot zárt térben kritikus hőmérséklete fölé melegítünk, a kritikus ponton átlépve a folyadék halmazállapottal azonos

sűrűségű gázhalmazállapot jön létre. Eközben a folyadék úgy alakul gázzá, hogy fázishatár nem jelentkezik: a folyadékban lévő folyadékkal átitatott anyag, gázzal átitatottá válik, azaz megszárad anélkül, hogy a folyadék-gőz fázishatár áthaladásával járó felületi feszültségi hatások jelentkeznének. Az eljárás gyakorlati kivitelezése szempontjából fontos az, hogy olyan anyagokból történjen a szárítás, amelyeknek kritikus pontjához nem túl magas hőmérséklet és nyomás tartozik. Továbbá az is fontos, hogy az anyag ne károsodjon, és a művelet laboratóriumi körülmények között viszonylag könnyen kivitelezhető legyen. Erre a vizes közeg az igen magas kritikus hőmérséklete és nyomása (+344 °C; 217,7 atm) miatt nem alkalmas. A gyakorlatban a széndioxidos eljárás vált be. (Használtak ugyan Freon-13-at is, ma azonban ez környezetvédelmi okokból nem jöhet szóba) (78,79).

3.6.4 Long term scanning rendszer, time-lapse imaging videómikroszkópia

A time-lapse felvételek fogalma leginkább makroszkopikus események megörökítéséből ismert. Nagy időbeli felbontásban készült felvételek sorozatát jelenti, mely képkockák filmként lejátszva betekintést engednek olyan folyamatokba, melyek lefolyása az emberi léptékhez képest lassan zajlanak. Az 1990-es évek elején viszont megszületett a mikroszkopikus világ megfigyelésére használt eszköz, a time-lapse videómikroszkópia, amelynek célja a mikrokultúrák *in-vitro* hosszú távú megfigyelése, ideálisan, számukra optimális körülmények között.

A time-lapse felvételek elkészítésére képes mikroszkópok megalkotását olyan igények indokolták, amelyeket csak az időbeli korlátok feloldásával lehetett vizsgálni, szükségessé vált a tenyészetek megfigyelése kisebb időbeli felbontásban, például *in vitro* toxikológiai vizsgálatokban. A folyamatos megfigyeléssel szolgáltatott adatok áttörést eredményezhetnek a biotechnológiai kutatásokban, a gyógyszer-technológiai kutatások *in vitro* fázisaiban, jelentősen csökkentve ezzel az ezt követő *in vivo* fázis költségeit.

Ahhoz, hogy a szükséges adatok előállítására képesek legyünk, szükség volt egy olyan eszközre, amely képes megfigyelni a sejtenyészeteket, illetve egy számítógéppel összekötött kamerára, mely automatikusan rögzíti a felvételeket a beállított időpontokban.

Az eTox munkacsoport long term scan rendszerének múltja és jelene

A long-term scan mikroszkópok fejlesztése, építése több mint 15 éves múltra tekint vissza munkacsoportunkban. A scan-rendszerek létrejöttének célja, hogy a sejt kultúrák folyamatos megfigyelésén keresztül, digitális képanalízissel, értelmezhető kvantitatív adatokat szolgáltatassanak kutatásaink során, mely adatok más megfigyelési módszerekkel nem nyerhetőek ki.

A korábban használt mikroszkópjaink fejlesztésében fő szempontjaink a mikroszkóp hosszú távú használhatósága és alacsony költségű lecserélhetősége, valamint a vizsgálatok időbeli limitációinak csökkentése. Ahhoz, hogy ezeket a tulajdonságokat érvényesíteni tudjuk mikroszkópjainkban, el kellett térnünk a hagyományos upright- felső megvilágítású-, és inverz fénymikroszkópok felépítésétől és eszköztárától. Ennek eredményeként jöttek létre a long-term scan generációk, melyek hatékonyabban közelítik meg a hosszú távú megfigyelés problémáit. Mikroszkópjainkat 4 generáción keresztül a következőképpen fejlesztettük:

1. Generáció

- Egyedileg készített fém állványzat
- Hagyományos halogén mikroszkópizzó
- Analóg kamera
- Upright, szabvány objektív

2. Generáció

- Célszerűen módosított hagyományos mikroszkóp statív
- Látható fény, monokróm LED
- Nagy érzékenységű CCD holdfény kamera
- Inverz, szabvány objektív

3. Generáció

- Polikarbonát rack polcok fém vázon
- Közei infravörös LED, 940 nm hullámhossz
- Nagy pixelméretű CCD érzékelő, mikroszkópkamera
- Inverz, szabvány objektív fix fókuszos leképezéssel

4. Generáció

- Könnyített mikroszkóp statív
- közei infravörös LED, 940 nm fény emisszió
- CCD érzékelő, HD felbontású digitális mikroszkópkamera
- Inverz, szabvány objektív

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Statikus képelemzési módszer kidolgozása *Aspergillus nidulans*on

4.1.1 *Aspergillus nidulans* általános minta előkészítése SEM-hez

Mintáink előkészítésénél a nemzetközi irodalomban leírt, általános mintaelőkészítési módszereket használtuk (74,75,76,77).

- a mintákat 4%-os glutáraldehid oldatba tettük egy éjszakára PBS-ben,
- majd polilizin fedőlemezre átvittük őket,
- etanolban dehidratáltuk,
- végül arany-palládiummal fixáltuk őket a vizsgálathoz

4.1.2 *Aspergillus nidulans* törzsek genotípusai

- tNJ11:** *biA1, argB2, metG1, veA1, argB⁺*
- tNJ36:** *pyrG89, AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺*
- tNJ12:** *biA1, argB2, chiB:argB⁺, met G1, veA1*
- tNJ 34.8:** *pyrG89, pyroA4, ΔengA:AfupyrG⁺, ΔchiB:AnpyroA⁺, veA⁺*
- tNJ76.7:** *pyrG89; ΔpepJ:AfupyrG⁺ pyroA4 veA⁺*
- tNJ 77.16:** *pyrG89; ΔprtA:AfupyrG⁺ pyroA4 veA⁺*
- tNJ 78.4:** *pyrG89, pyroA4, ΔpepJ:AfupyrG⁺, ΔprtA:AnpyroA⁺, veA⁺*

4.1.3 Törzsek rövid jellemzése:

- **tNJ 11 kontroll:** a TNJ 12 (delta-chiB) kontroll törzse
- **tNJ 36 kontroll:** egy általánosan használt kontroll törzs

-tNJ12: A szénéhezés hatására indukálódó sejtfalbontó kitináz (chiB) delécioja. A fehérje jelenléte lehetővé teszi a sejtfal tápanyagként való hasznosítását.

- **tNJ 34.8:** A *chiB* és az *engA* génben is sérült mutáns. Hasonló fenotípus, mint az előzőeknek.

- **tNJ 76.7:** A *pepJ* extracelluláris proteáz gén deléciója. Jelenléte az autolízis alatt a tápközegbe került fehérjék hasznosítását teszi lehetővé.

- **tNJ 77.16:** A *prtA* extracelluláris proteáz gén deléciója. Jelenléte az autolízis alatt a tápközegbe került fehérjék hasznosítását teszi lehetővé.

- **tNJ 78.4:** A *prtA* és a *pepJ* extracelluláris proteáz gének deléciója. Jelenlétük az autolízis alatt a tápközegbe került fehérjék hasznosítását teszi lehetővé.

4.1.4 Statikus képanalízis

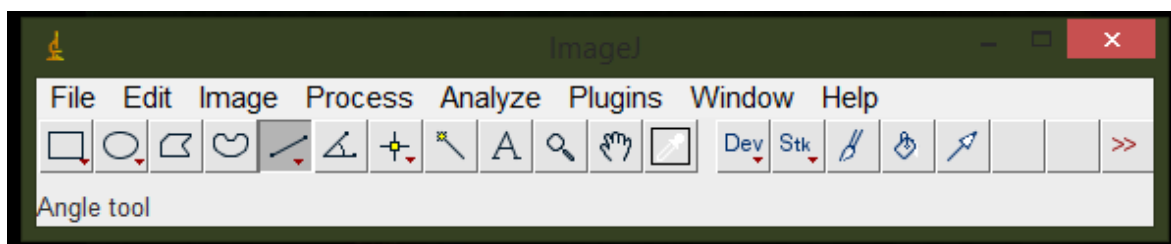
A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) által készített képek információkat szolgáltatnak a gomba spórákról, azok szemmel látható morfológiai jellegzetességeiről. Ahhoz azonban, hogy számszerű adatokhoz jussunk, számítógépes szoftverek alkalmazása elengedhetetlen, melyek lehetőséget nyújtanak kvalitatív és kvantitatív mérések elvégzéséhez az adott képeken. A digitális képfeldolgozó technikák által a spórák összehasonlító vizsgálatához szükséges információkhoz is jutunk.

Digitális képanalízis során a SEM által készített képeket az ImageJ számítógépes programmal elemeztük ki.

Az ImageJ egy nyilvános, Java alapú képfeldolgozó program, melyet a NIH (National Institute of Health) fejlesztett ki. Online, de letöltve, asztali alkalmazásként egyaránt használható. Felhasználóbarát, hiszen plugin-okkal, makrókkal egyaránt bővíthető, így számos képfeldolgozó és elemzési lehetőséget biztosít. Előnye, hogy igen széles számú képformátumot támogat, mint a GIF, BMP, TIFF, JPEG, valamint 3D és 4D képek elemzésére egyaránt alkalmazható, miközben beállíthatjuk a képméretet és javíthatunk a minőségén a beépített funkciók segítségével.

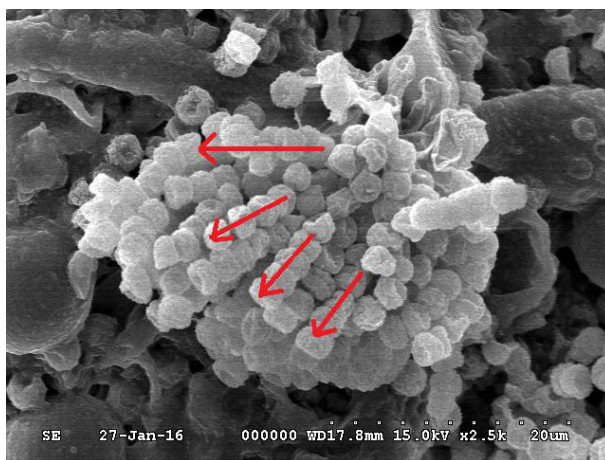
Képelemzés folyamata:

1. Program futtatása során betöltöttük az elemezni kívánt képet:
File→Open→kép kiválasztása →Megnyitás (1. ábra)



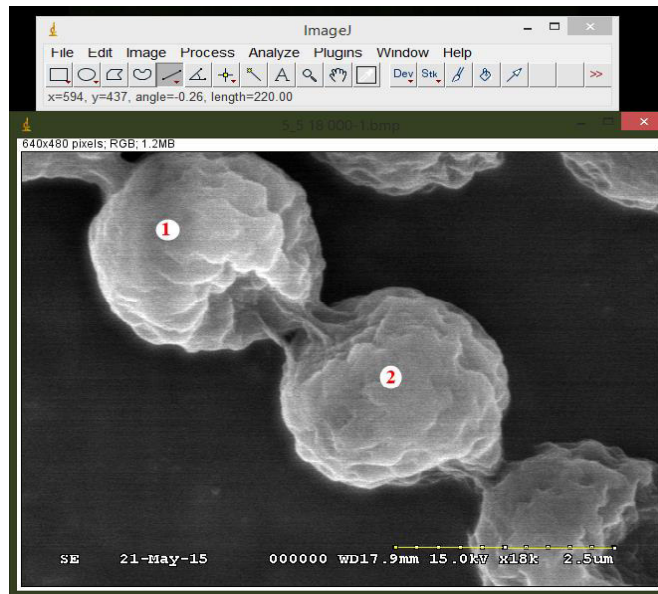
1. ábra: ImageJ program fejléce

Ezután meghatároztunk az ép spórák elemzési sorát konidiofóron belül (2a. ábra).



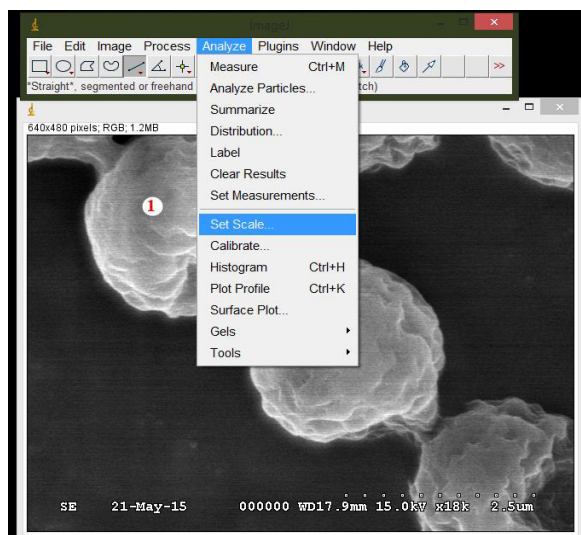
2.a ábra: Konidiofór SEM képe

2. Menüsoron lévő „Straight”=egyenes ikonra kattintunk → a megjelenő (+) kurzorral a kép jobb alsó sarkán lévő pontozott vonal elejére kattintunk, majd annak mentén végighaladva egyenest húzunk az utolsó pontig. Ez a vonal mutatja, hogy egy adott mértékegységhez hány pixel tartozik (2b. ábra).



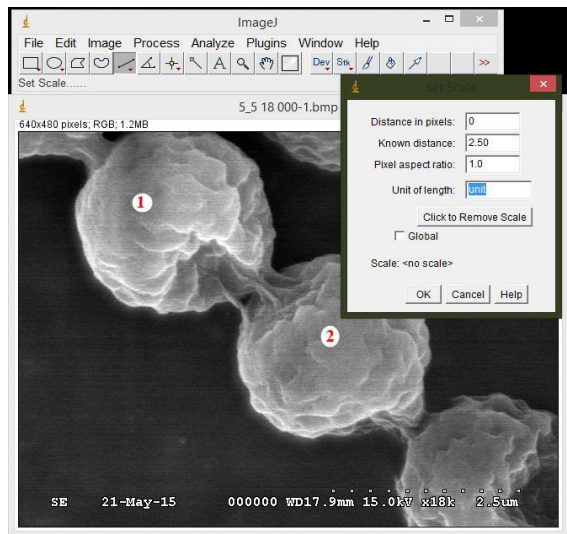
2b. ábra: egyenes felvétele

3. Beállítjuk a képről leolvasható nagyítás értékét és a hozzá megfelelő mértékegységet, melyet átkonvertáltunk pixelről μm -re (3. ábra)



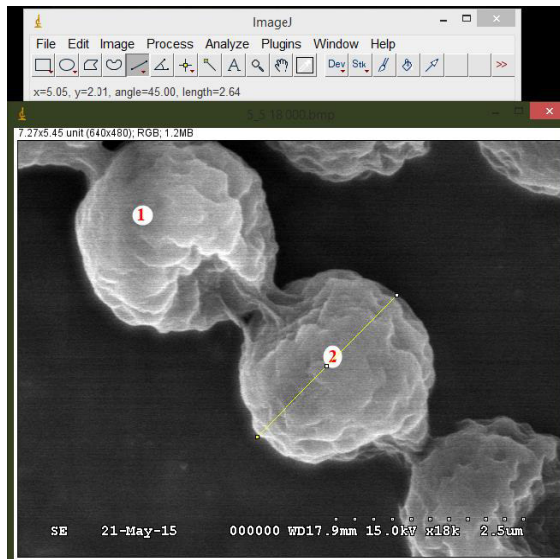
3. ábra: A nagyítás mértékének beállítása

Majd az Analyze → Set scale parancssorral (4. ábra) a Known distance értékhez beírtuk a kép jobb alsó sarkában lévő értéket + Unit of Length-nél [μm]-unit egységet állítottunk be.

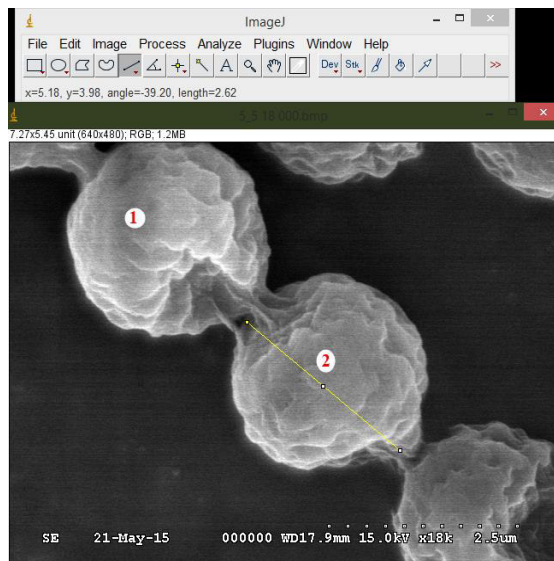


4. ábra: konvertált érték beírása

4. Lemértük a fókuszban lévő, ép, a konidiofórban elhelyezkedő spórák átmérőjét (5. ábra) és vastagságát (6. ábra), mely adatokat táblázatba rendeztük és diagramon ábrázoltuk.



5. ábra: spóra átmérőjének mérése



6. ábra: spóra vastagságának mérése

4.2 képelemzési módszer tökéletesítése *Aspergillus fumigatus*al fertőzött egerek szövettani metszetein

4.2.1 *Aspergillus fumigatus* izolátum tenyésztési és növekedés feltételei

Mivel az *A. fumigatus* elsősorban a tüdőben okoz aszpergillózist, ezért az Af293- (FGSCA1100, IHEM18963) klinikai izolátumot választottuk, mely emberi tüdőszövetből származik, és ezt tenyésztettük 37 ° C-on nitrát minimál táptalajon (NMM) (80). A konídiumok fertőzéseikhez az *A. fumigatus*t 6 napig NMM-en tenyésztettük. Ezt követően a konídiumokat 1 ml-es 0,01 térfogat% Tween80-ot tartalmazó sóoldattal mostuk (81). Centrifugálás (1500 g, 4 perc) után szuszpendáltuk, majd sóoldatban Bürker-kamrában számoltuk a konídiumokat.

4.2.2 Kísérleti állatok tenyésztési feltételei

Mindegyik egércsoportot (10 db) PI műanyag ketrecbe (425/135/120 mm) helyeztünk, a 2010/63 / EU irányelvek szerint. Az állatokat pelletált egértáppal (Purina, LabDiet, St. Louis, MO, USA), és vízzel *ad libitum* tápláltuk. Automatizált megvilágítást (12 órás sötét-világos ciklusokkal) és szobahőmérsékletet (22-25 ° C) tartottunk fenn.

4.2.3 Kísérleti állatok fertőzése, humán fertőzés elleni védelem

Az *A. fumigatus* törzs patogenitását három különálló kísérletben vizsgáltuk. A kísérlethez 8-10 hetes nőstény és hím BALB/c egereket használtunk. Az egércsoportokat *i.p.* (intraperitoneálisan) adott ciklofoszfamiddal (CP) (250mg/kg) tettük neutrofil sejtszám hiányossá (neutropeniássá) illetve s.c.(szubkután) adott hidrokortizonnal (HC) (125 mg/kg) tettük mind aneutrophilok, mind a lymphocyták számának csökkentésével leukopéniássá. Pozitív kontrollnak egészséges egereket, negatív kontrollnak pedig immunszuppresszált, fertőzött egereket használtunk.

Az első immunszuppresszáns kezelés a fertőzést megelőző 3. napon, míg a második ugyanilyen koncentrációban 1 nappal a fertőzést követően történt meg. Az első immunszuppresszáns kezelés után az egerek Gentamicin profilaxist kaptak (5 mg/kg ivóvízbe), hogy megelőzzük a bakteriális fertőzéseket. A fertőzést röviden úgy végeztük, hogy a Nembutal-lal (100mg/kg) elaltatott egerek $3,5 \times 10^6$ db konídiumot kaptak 50 µl-enként a

fertőzéskor egyszer, intranazálisan. Ilyen körülmények között az inokulum normál légzéssel érte el a tüdőt.

Az *A. fumigatus* inhalációval szembeni humán védelem esetében minimálisra csökkentettük a penészgombákkal való expozíciót az előírás szerinti légzésvédelmi védőfelszerelés alkalmazásával, az Egészségvédelmi Ügynökség arcvédő irányelveinek betartásával és az N95 HEPA szűrővel egyenértékű FFP2 szabvány alkalmazásával. A kísérleti állatokat 3 alcsoportra osztottuk:

- a) nem fertőzött, immunszuppresszánt nem kapott
- b) immunszuppresszált, nem fertőzött
- c) immunszuppresszánt nem kapott megfertőzött egerek.

A kísérletekben CP immunszuppresszánt alkalmaztuk. Az állatokat nyaki diszlokációval öltük meg 6, 12, 14, 24, 30, 48, 72 és 96 órával a fertőzés után. Minden alcsoporthoz 10 egeret használtunk. Az állatokat napi kétszer ellenőriztük a fertőzés után, a túlélők számát feljegyeztük. A tüdőt, veséket, májat és agyat eltávolítottuk a szövettani vizsgálathoz.

4.2.4 Szövetminták előkészítése

A szövetminták előkészítésénél és festésénél a nemzetközi irodalom által elfogadott, általános festési eljárásokat használtuk (89,90,91). A szövetmintákat 4% pufferezt formaldehidben fixáltuk 24 órán át és paraffinba ágyasztuk. A 4µm vastagú metszeteket, melyeket minden kezelési csoport szerveiből elkészítettünk, hematoxylin-eosinnal (HE) vagy perjóddsavas Schiff bázissal (PAS) festettük meg vagy Gömöri-Grocott ezüstimpregnációt (GMS) végeztünk. Az alveoláris elváltozásokat/ ödémákat és bevezéréseket egy 0-3-ig terjedő skálán értékeltük öt véletlenszerűen kiválasztott látótéren minden mintánál. A mintákról felvételeket készítettünk.

4.2.5 A statikus képelemzés

A kalibrációhoz méretezett képeket (10µm/div) és a NIH ImageJ nyílt forrású programját használtuk. Gyors Fourier transzformációt és sávszűrést alkalmaztunk, hogy elkerüljük az egyenetlen megvilágítást. A kontrasztokat felerősítettük.

A válogatást ezután kiterjesztettük minden képpontra addig, amíg a pixel értékek közötti különbségek elérhetőek voltak. Ezt úgy értük el, hogy egy pontra kattintottunk egy olyan képen, ami nem érte el azt az értékhatárt, ami a relatív szürke és telített színárnyalatokon alapult. Részecske analízist végeztünk, hogy megszámoljuk és megmérjük az alakokat a bináris képen. A $2\ \mu\text{m}^2$ -nél kisebb tárgyakat figyelmen kívül hagytuk. A tárgyakon felfedezni vélt lyukakat a tárgy részének tekintettük, ugyanis ezek létrejöhetnek a nem egyenletes festés következtében is.

Minden tárgy felületét kiszámoltuk. A hifák hosszának tagoltságát belső grafikon szerkesztővel vizsgáltuk, nyomon követve a növekedési paramétereket.

A különbségnormát az adateloszlás mértékének számításához a középértékből és t tesztből kalkuláltuk ki. Az adatok átlagosan $\pm SD$ értéket mutattak. $p < 0,05$ -t statisztikailag jelentősnek, míg $p < 0,01$ -t igen jelentősnek ítéltük.

4.3 *Mycoplasma* in vitro fertőzés dinamikai képelemzése

A *Mycoplasma* fertőzés nyomonkövetéséhez 3 különböző sejtkultúrát fertőztünk meg, hogy a *Mycoplasma* biofilmképzésének dinamikáját különböző közegben vizsgáljuk.

4.3.1 Sejtkultúrák

- HaCaT sejtek. Emberi bőr hámsejtekből származik, melyek spontán *in vitro* átalakultak a hosszú inkubáció során (82,83).
- OCM-1 sejtek. Rosszindulatú OCM-1 (emberi choroidea melanoma-1) sejtvonal a helyi klinikai Szemészet Osztályról származik (84). Az OCM1 sejtvonal érhártya melanoma biopsziával nyert mintájából származik (85). Az OCM-1-ből származó xenografról azt találtuk, hogy elsősorban orsó B-típusú melanoma sejtekből áll (85).
- Laphámrák (SCC) sejteket (86)

4.3.2 Sejtnövekedés

Az egészséges sejtek RPMI-1640-es médiuma (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország) 100 IU penicillint/ml, 50 μg strptomycin-szulfátot/ml, 2 mM L-glutamint és hő által inaktivált (56°C, 30 perc) 5%-os szarvasmarha borjú szérumot (Hyclone, Logan, UT) tartalmazott. A kontaminációt

mycoplasmával fertőzött 5%-os szarvasmarha borjú szérummal indukáltuk, mely a helyi vágóhídról származott. A szarvasmarha borjú szérumot szűréssel sterilizáltuk. A mycoplasma eltávolításához 0,1µm sterilizáló minőségű szűrőt használtunk. A gyakorlatban használt 0,2 µm-es baktériumszűrők az ennél kisebb átmérőjű mycoplasmákat átengedik. Az élő gazdasejtek számát tripánkéék festéssel Bürker kamrában határoztuk meg. A kis méret miatt a *Mycoplasma* sejtek láthatatlanok maradtak a fénymikroszkóp alatt.

4.3.3 Time-lapse scanning mikroszkópia (TLS)

Vizsgálatunkat egy olyan mikroszkópos rendszeren végeztük, amelyet munkacsoportunk hozott létre a korábban leírt módon, és amely lehetővé teszi citotoxikus anyagok hatásának valós idejű, celluláris szintű vizsgálatát a teljes sejtciklus alatt. A standard tenyésztési körülmények között tartott tenyészetek mikroszkópos megfigyelése akár 168 órás intervallumban, 6 másodperces időbeli felbontásban is történhet. Az így nyert kép szekvencia videófelvétellé alakítható, mely a citotoxicitás közvetlen, celluláris és populációs szintű tanulmányozására alkalmas. A vizsgálatok időtartamában rögzített képadatbázis statisztikai képelemző módszerekkel történő feldolgozása nagy időbeli felbontású adatokat biztosít a toxikus folyamatok dinamikai vizsgálatához (87). Három fő paraméter alapján kivizsgáltuk a *Mycoplasma* fertőzést time-lapse mikroszkópiával szén-dioxid inkubátorban 37°C-on, 95% - os páratartalom és 5%-os CO₂-tartalom mellett:

- mycoplasmák valós idejű megjelenése
- fertőzés időtartama,
- megtámadott emlős sejtek bomlása.

Berendezések rövid leírása:

a) *Inkubátor.* A szén-dioxid inkubátorba (Sanyomco18-AC Wood Dale, IL, USA) telepített négy, egyedi építésű inverz mikroszkóp.

b) *Mikroszkóp:* Olympus (Tokyo) mikroszkópok inverz módon (tehát fejjel lefelé) használva és forgó tornyok módosítva, helyettesítve az eredeti megvilágítást, csökkentve a fototoxicitást alacsony szintű infravörös megvilágítást használva. Töltés-csatolt eszközt (charge-coupled device, CCD camera) szereltünk az egyes tornyok monokuláris adapterének aljához. A

tárgyasztalok irányító szerkezetét eltávolítottuk, mint feleslegek a kísérleti szempontból. Új fényforrások kerültek beépítésre a mikroszkópokba.

c) *Megvilágítás*: A led diódák 940 nm közeli infravörös fényt emittálnak (5 mm átmérőjű, 1,2 V, 20 mA, stabilizált 5 V-on soros kapcsolású 220 Ohm-os ellenállással, kapcsolóüzemű tápegységgel meghajtva) megvilágítva a sejteket, minimalizálva a hő-, és fototoxicitást. A hosszabb hullámhossz lehetővé teszi a mélyebb behatolást a sejtrétegekbe (maximum 3 mm). Ahhoz, hogy elérjük a lehető legalacsonyabb szintű hő -, illetve fototoxicitást, egy önirányító rendszer került beépítésre a fényforrásba, ami a fényt csak a felvétel és a fókuszálás alatt kapcsolja be. A felbontás elméleti határa az Abbé – egyenleten alapszik, ami $1.88 \mu\text{m}$, 940 nm hullámhossz, 0.25 numerikus apertúra mellett. Iterációs optimalizálás biztosította a széles látómezőt, hosszú munkatávolságot, alacsony fototoxicitást. A koherens megvilágítást egy 5 mm-es fényt kibocsátó dióda (LED) gömb alakú feje szolgálta, mint egy hosszú munkatávolságú kondenzor. A optikai tengely és a fényforrás központosítása próba-hiba meghatározással történt élőképen, létrehozva egy homogén, egyenletes megvilágítást a látómezőben, hogy elkerüljük az 'izzó-hatást' (a kép közepének intenzívebb megvilágítását).

d) *Mikroszkópok objektívei*. Carl Zeiss (Jena, Németország), száraz objektíveket (x10:0.25 NA) használtunk, biztosítva egy széles látóteret és hosszú munkatávolságot, a sejttenyésztő flasks 2 mm vastag alja miatt.

e) *Kamerák*. Célszerűen módosított 2 megapixeles (1600x1200 pixel) UVC USB 2.0 kamerákat (Asus Nemzetközi Számítógép, Fremont, CA, USA) használtunk infravörös szűrők eltávolítása mellett.

4.3.4 A Dinamikus elemzés

A képelemzéshez a Fiji képelemző szoftvert használtuk. A thresholdingot (képfeldolgozás), a kép szegmentálás legegyszerűbb módszerét alkalmaztuk ott, ahol a tárgyak pixelei láthatók voltak a fotókon elválasztva a szürke skálán való intenzitási értékeik alapján. Így a felület (pl. a sejt monolayer) megkülönböztethető és elválasztható a kép többi részétől. A kiválasztott területek mennyiségi paramétereit ezután jellemeztük, majd ábráztuk diagramokként.

A sejtpázsit méretének meghatározásához a monolayert elválasztottuk a megfigyelt felületek háttérétől. Ezután a szegmentált területet -azaz a sejtek

kötődését a tenyésztő felszínhez – a látótér százalékában kifejeztük. Hasonló módszert alkalmaztunk, amikor a *Mycoplasma* fertőzés biofilmjének kiterjedését határoztuk meg. Csak a *Mycoplasma* fertőzés biofilmje volt látható, az egyedi *Mycoplasma* sejteket nem lehetett látni a time-lapse képelemzés során a megvilágításra használt hullámhossz fizikai behatároló hatása miatt.

Ahhoz, hogy az emlős sejtek mozgékonyágát elemezni tudjuk, először a háttérrel távolítottuk el a képekből. Így csak az elemezni kívánt struktúrák maradtak. Az egymást követő képek különbsége biztosított információt a mozgó sejtekről. Ezeket az információkat pixelekben fejeztük ki. Az így szerzett motilitási értékeket felhasználtuk az osztódási idő meghatározására is, amikor a sejtek leváltak a tenyésztési felületről.

Ily módon az egyes sejtek leválásának ideje meghatározható. Digitális képelemzést alkalmaztunk öt, véletlenszerűen kiválasztott, reprezentatív régióra az egyes sejtenyészetekben.

4.4 Dinamikus képelemzési módszer fejlesztése *Aspergillus fumigatus* patogenitási dinamikájának vizsgálatához

Az *Aspergillus fumigatus* AF293 törzsét használtuk, melyet a fent leírt módon tenyésztettünk. Nagy felbontású videomikroszkópos technikánkat digitális képelemzéssel kombinálva már korábbi kísérleteinkben teszteltük, melyekben antimikotikumokkal, valamint genetikai mutációkkal befolyásoltuk a csírázást, hifanövekedést valamint a letapadást (87). Az opportunista kórokozó *A. fumigatus*on vizsgáltuk a szisztémás gombaellenes gyógyszerek hatását a spórák letapadásának sebességére, az első hifa megjelenésének időpontjára, valamint az első hifa elágazás kialakulásának sebességére. A vizsgálatokhoz olyan gomba elleni szereket választottunk, mint az Amphotericin-B, illetve vorikonazol, melyek hatásmechanizmusa már ismert. Az antimikotikumokat 0.25 µg/ml-es koncentrációban használtuk.

4.4.1 Digitális képfeldolgozás

Az LTS rendszerek a számozott képsorozatot egy specializált (barebone) Windows 7 operációs rendszert futtató egyéni számítógépre (Biological

Image Processing Station, BIPS) továbbítják. A képfeldolgozást az USA Országos Egészségügyi Intézet ImageJ szoftvercsomagja (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>) segítségével végeztük el, egyedi fejlesztésű bővítmények és makrók használatával. Az egyes, gomba morfológiát ábrázoló képekre használt algoritmust az alábbiakban ismertetjük.

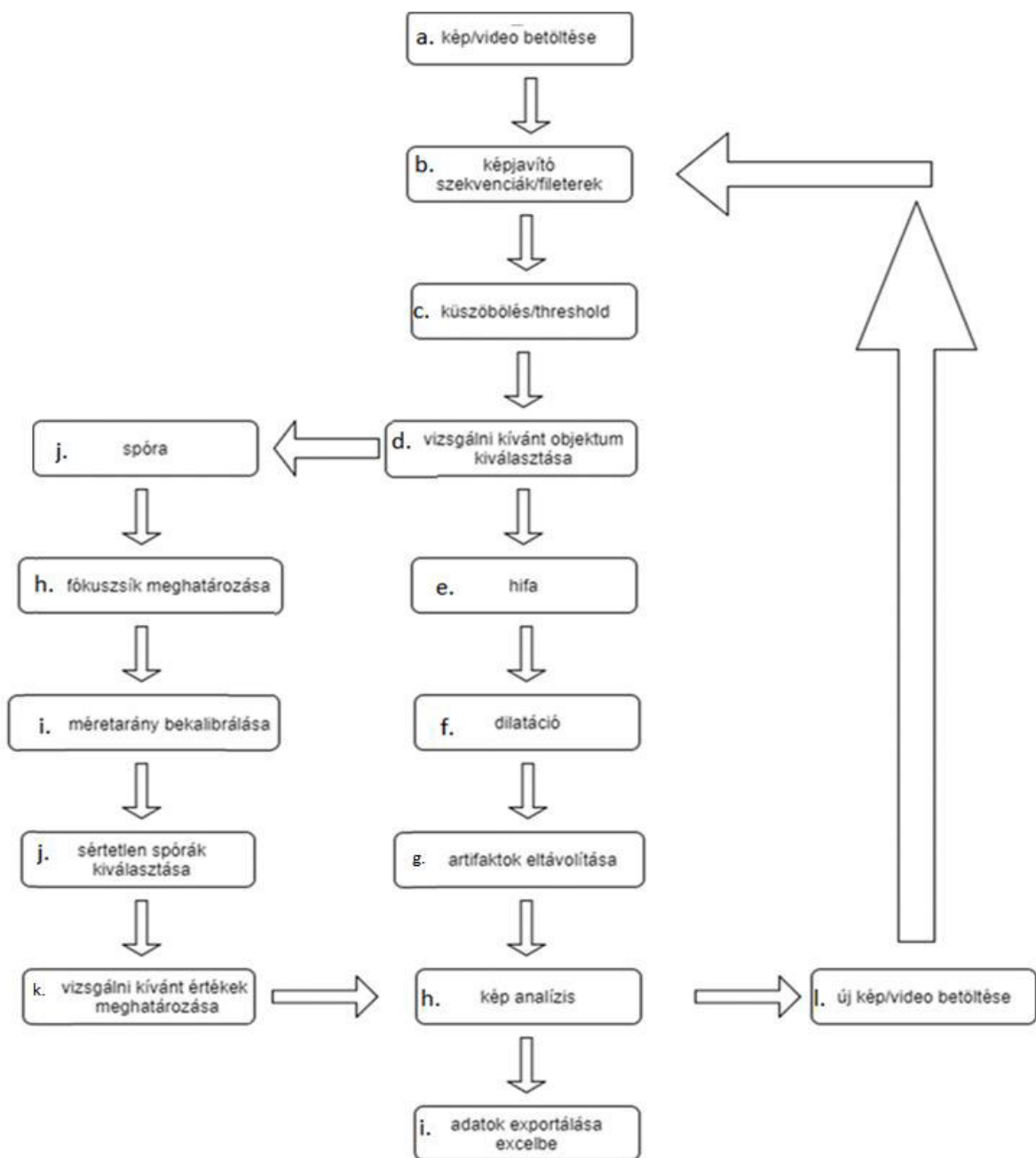
4.4.1.1 Képjavító szekvenciák

A képek betöltése (7. a ábra) után az elemzés a a képszűréssel/ a kép filtrációjával kezdődik (7. b ábra), hogy kompenzáljuk a fourier-térben jelentkező, zavaró alacsony frekvenciát, egyenletlen megvilágítást, ami árnyékolást és nem egységes háttérrel eredményezhet. Ez bonyolítja a szegmentálási folyamatot, mivel a képen belül szürke szintek lehetnek, amelyek mind az objektum, mind a háttér vonatkozásában közösek, ezért egy olyan küszöbérték (7.c ábra) kiválasztása, amely a kettőt elválasztja, nehéz lenne.. Ha egy ilyen szürke színű képre küszöbértékeket alkalmazunk, az sok műterméket eredményez a vizsgálni kívánt szekvencián.

A háttér szürke szintjének változásait úgy javíthatjuk, hogy a képet, mint 2D jelet kezeljük és high-pass filter/féligáteresztő szűrésnek tesszük ki, amely az ImageJ beépített "Bandpass Filter" funkciójával valósul meg. Ezáltal eltávolítjuk a képzajt Gauss szűréssel Fourier-térben. A szűrő sugara 40 μ m-es pixel-ekvivalensre van beállítva (40 képpont a hifák képéhez, 200 képpont a spórákhoz), ami nagy relatív paraméter a tipikus hifák szélességéhez képest (körülbelül 2-4 μ m). Minden magas frekvenciájú speckle (foltos) zajt ezt követően eltávolítunk a mediánszűréssel.

A képet ezután súlyozottan három, 8 bit-es szürkeárnyaltos képre osztjuk, amelyek a három elsődleges színt komponens (piros, zöld és kék) reprezentálják. A szürke szintű küszöb, amelyet az ImageJ az izoadat-algoritmussal számít - bináris képet eredményez (7. c ábra).

A képanalízis következő szakasza attól függ, hogy a spórák vagy a hifák a vizsgálat elsődleges tárgyai (7. d ábra). Az életképes spórák és hifák ugyanazon a képen ritkán lesznek jelen, ugyanis a ki nem hifázott spórákat vagy elfedik a hifák, vagy a hifaelemzésnél műtermékként érzékeli őket a rendszer, és eltávolítja.



7. ábra: A gomba morfológiájának jellemzésére használt algoritmus.

4.4.1.2 Spórák elemzése

Spórák esetében (7.e ábra) a " Watershed " funkciót (7. f ábra) használtuk, az egymáshoz érő objektumok elválasztására (7. g ábra). A parancs először elvégzi az euklideszi távolság méréseket (Euclidean distance. mapping, EDM), és megtalálja a végső erodált pontokat (ultimate erosion point, UEP). Ezután a lehető legnagyobb mértékben meghosszabbítja az egyes UEP-eket (az EDM csúcsai vagy helyi maximum pontok) - akár a részecske széléig is, vagy akár egy másik (növekvő) UEP régiójáig. Az ismertetett eljárás illeszkedik a legjobban a sima, domború tárgyakhoz, amelyek túlságosan nem fedik át egymást.

Az ImageJ "Particle Analyzer" -t a kvantitatív képelemzésére (7. h ábra) használja. Az Analyze Particles-t háromféle képpen használhatjuk

- Küszöbölt képen komponens detektálás
- Méret és morfológia alapján történő válogatás
- Szegmentált kép kvantitatív analízise

a terület (A) és körkörösség (B) adatainak alapján, az utóbbit a következőképpen definiálják: $B = 4 \cdot \pi \cdot A/P^2$

ahol, A_p a szóban forgó tárgy kivetített területe, és P a mért kerület.

Kör esetén $A_p = \pi r^2$ és $P = 2\pi r$, tehát $B = 1$.

Minél nagyobb a P az A_p -hez képest, annál kevésbé kör alakú az objektum, és így a B értéke csökken. Számos iparilag releváns gomba spórája, mint például az Aspergillus spórái viszonylag gömbölyűek. Az ettől eltérő alakokat ellipszoidnak vagy geoidnek nevezzük. A meghatározott minimális értéket (A_p , min) meghaladó vetített területekkel rendelkező tárgyak melyek továbbá a küszöbértéknél (C_s , min) nagyobb körkörösséggel rendelkeznek spóráknak tekinthetők; a fennmaradó tárgyak műtermékek/artifaktumoknak minősülnek, és kizárandók az elemzésből. Miután azonosítottuk a spórák vetített területét és körkörösségét feljegyeztük, az algoritmus tovább halad a mappában lévő következő képre.

4.4.1.3 Hifák elemzése

Ha hifák a vizsgálat tárgyai (7. j ábra), akkor egy bináris zárás (binary closing) műveletet hajtunk végre az analízis során, hogy eltávolítsuk az objektumok apró hibáit. Ezt követően a "Particle Analyzer" kiválogatja azokat az objektumokat, amely A_p , min fölötti vetített területre esik, és a kerektség kisebb, mint egy második küszöbérték (7.h,i ábra). Azokat a tárgyakat, amelyek nem felelnek meg ezeknek a kritériumoknak, kizárja az elemzésből. A hifa elemek bináris képét ezután vázstruktúrákig erodáljuk

(„skeletonisation”) (7. j ábra). Ez egy gyors párhuzamos algoritmus a digitális minta elvékonyításához, amelyben egy keresőfunkció jelzi a 256 lehetséges 3×3 szomszédos konfigurációt minden előtér pixelnél. Az algoritmus kiszámítja az indexek számát minden objektumra, és a keresési táblázatot használja annak eldöntésére, hogy a képpont kiküszöbölhető-e. A "skeletonisation" a képelemzés során időnként artifakt pontokat vagy ágakat eredményezhet. A műtermék pontok (olyan helyek, ahol a pixel nagyobb, mint egy képpont szélesség) az ágpontok helytelen osztályozásához vezethetnek, amik az artifakt ágak a hifák hosszának és a hifa csúcsok számának túlbecsléséhez vezethetnek (7. k ábra). Ezek eltávolíthatók „metszés” (7. b ábra) útján, ez az eljárás továbbá eltávolítja a megmaradt apró hibákat is a képről.

4.4.1.4 Digitális Analízis

Brown mozgás megszűnése, nem letapadt spórák mozgása,

A spórák mozgékonyságának értékeléséhez a nem releváns információkat a fent említett módon távolítottuk el a videóról, és a különbségeket az egymást követő mozgó képek területeinek kivonásával pixelben fejeztük ki. Ezek a numerikus értékek biztosítják az információt a spórák helyzetváltozásáról, a mozgás korábbi állapotához viszonyítva. A mozgékonyági értékeket szintén felhasználtuk az idő meghatározására, amikor a spórák letapadtak a tenyésztőedény aljához.

A Brown mozgás megszűnésének ideje így meghatározható. A digitális képelemzést öt, véletlenszerűen kiválasztott, reprezentatív régióon alkalmaztuk minden egyes spóránál, 3 független kísérlet során, mind a kontroll, mind pedig a kezelt tenyészetek esetében. Az értékeket diagrammon ábrázoltuk.

Hifa növekedés elemzése

A hifák növekedésének vizsgálatához hasonló módszert választottunk. A digitálisan javított bináris képsorozat vizsgálatánál a spórák területeit vizsgáltuk. Egy spóra területének vizsgálatánál a terület drasztikus emelkedése jelentette a hifanövekedés elindulását. Az összemosódó hifák elkerülése érdekében egy a felhasználó által irányított tér- és időbeli elkülönítő módszert használtunk. A módszer lényege, hogy a spórát egy 10×10 pixeles négyzetben vizsgáltuk, így a hifák kiterjedésének területét egységnyi időben és térben határoztuk meg. Ezáltal kiszűrtük a felülethez

rosszul kitapadt hifákat, lebegő részecskéket és hifa részleteket az elemzendő területen, melyek eltorzítják a vizsgálat eredményét. Így csak azokat az egyedi spórákat vizsgáltuk, amelyek azonos fókuszszíkon végeztek mozgást.

4.5 Dinamikus képelemző módszer tökéletesítése *Candida albicans* izolátumokon

A fent leírt rendszereket és képelemzési módszereket használva megvizsgáltuk, hogyan detektálható a *Candida albicans* klinikai izolátumok növekedési és letapadási dinamikája. Itt is azt a 3 fontos szempontot vizsgáltunk, amely a növekedési és letapadási dinamika alapját képezi: a Brown mozgás megszűnését, az első hifa elindulásának idejét és az első hifa elágazás kezdetét.

A kísérletre felhasznált klinikai izolátumok és kódolásuk a következő:

1VAD- ATCC 14053- kontroll törzs. Ebből a törzsből állítottak elő más törzseket (American Type Culture Collection)

1MUT- AF06- tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs. 6 mmol L⁻¹ tBOOH- val kezelt mutáns

2VAD - 8387- 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátum

2MUT - 8387T- 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns

3VAD - 10934- 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátum

3MUT - 10934T- 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns

4VAD -19890- 59 éves nő sebváladékból vett klinikai izolátum

4MUT - 19890T- 59 éves nő sebváladékból vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns

5VAD - 20072- 34 éves férfi hasüri drain-jéből vett klinikai izolátum

5MUT - 20072T- 34 éves férfi hasüri drain-jéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns

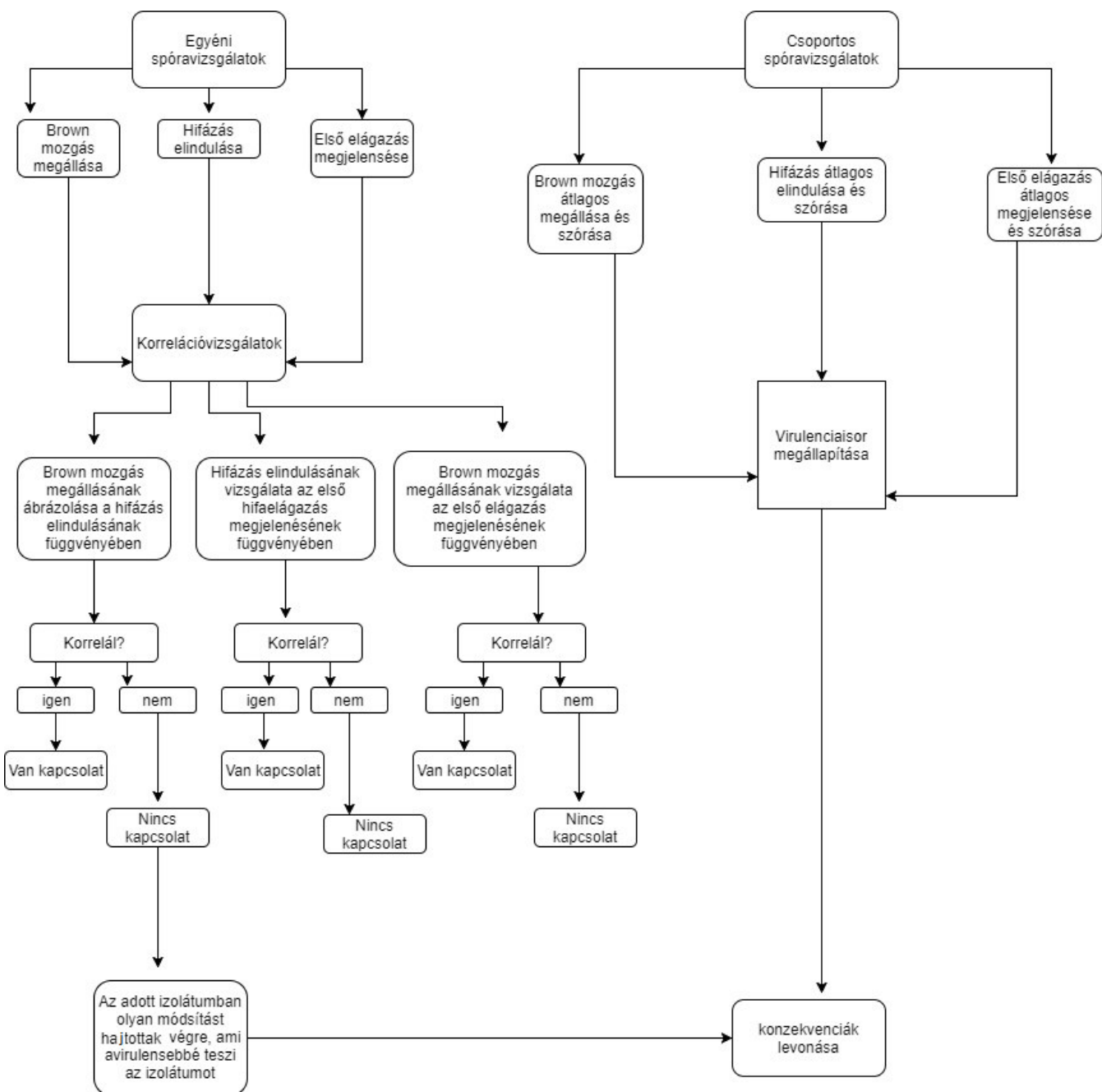
6VAD - 4774- 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátum

6MUT - 4774T- 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns

Az irodalmi adatok alátámasztják azt a hipotézist, hogy: a) fonalas gombák letapadási ideje, b) dinamikája és c) növekedési üteme között szoros kapcsolat van, amely összefügghet virulencia faktorukkal. Ezt a három vizsgálati tényezőt elemeztük az egyedi spórákra nézve.

A mutáns és klinikai törzsek tapadási és fertőzési stratégiája közötti eltérés vizsgálatához: rendszerünket CO₂ inkubátorban közel fiziológiás körülmények között állítottuk be és ezekkel hasonlítottuk össze.

A képelemzési metodikánk alapja egy olyan algoritmus, amivel a digitális képelemzés során meg tudjuk határozni azt a valós időpillanatot, amikor a letapadás és a hifázás történik. Ezzel ki tudjuk zárni azokat a változókat, amelyek befolyásolják a digitális képelemzésből származó következtetések hibáit. Képelemzési módszerünket az alábbi folyamatábra szerint alkalmazzuk



8. ábra: Képelemzési módszer használata *Candida albicans* izolátumok vizsgálatában

Külön vizsgáltuk az egyéni és csoportos spórákat törzsenként. A fent említett kritériumok alapján tudjuk legjobban detektálni egy spóra vagy spóracsoport letapadási és hifázási dinamikáját, amelyek a virulenciafaktor befolyásoló tényezői. Ezután egymás függvényében vizsgáltuk ezen értékeket, hogy megtudjuk, mennyire korrelálnak egymással eredményeink. Erre azért volt szükség, hogy meghatározzuk a vizsgált tényezők közötti kölcsönhatásokat.

4.5.1 Korrelációs számítás és szignifikancia analízis

A megfelelő algoritmus megtalálásához korrelációs számítást és szignifikancia analízist végeztünk. A statisztikában a korreláció jelzi két tetszőleges érték közötti lineáris kapcsolat nagyságát és irányát (avagy ezek egymáshoz való viszonyát). Az általános statisztika használat során a korreláció jelzi azt, hogy két tetszőleges érték nem független egymástól. Az ilyen széles körű használat során számos együtttható, érték jellemzi a korrelációt, alkalmazkodva az adatok fajtájához.

A korreláció csak a lineáris kapcsolatot jelzi. A normális eloszlású valószínűségi változókra jellemző, hogy ha nem korrelálnak, akkor függetlenek is. Így a korreláció jól alkalmazható normális eloszlásúnak tekinthető mérhető mennyiségek közötti kapcsolat erősségének mérésére.

A korreláció a következő képlettel számítható:

$$R(X, Y) = \frac{\text{cov}(X, Y)}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_X \sigma_Y}$$

ahol, E a várható érték, σ a szórás, μ_X az X , μ_Y az Y valószínűségi változó várható értéke.

A képletben x és y a 2 változónk, amiknek az összefüggésére kíváncsiak vagyunk. A felsővonal az átlagot jelenti. Szummával a mögötte álló adatok összegét jelöljük, pl. $\sum(X_1, X_2, X_3)$ azt jelenti, hogy az x -ek közül az első hármat adjuk össze.

A $\sum$ melletti i jelöli azt a jelenleg x -et vagy y -t, ahonnan elkezdjük az adatok összegzését, a szumma felett látható jelenleg n pedig azt az x -et vagy y -t, ami az utolsó az összeadási sorban. Itt $i=1$, tehát az 1. adattól számolunk, egészen n -ig, tehát az utolsó darabszámig.

Szignifikancia számítás

A statisztikában a sokaság azon objektumok, egyedi értékek, megfigyelések vagy más elemek teljes adathalmazát jelenti, amelyekből mintákat vettük.

A szignifikancia kiszámításához t eloszlású statisztikát használunk. Ennek képlete:

$$t = r * \sqrt{\frac{n - 2}{1 - r^2}}$$

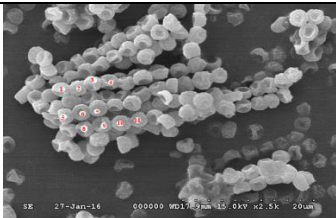
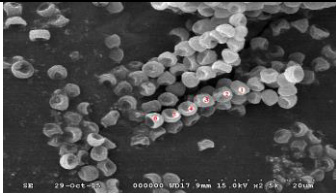
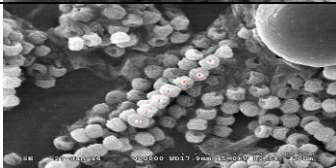
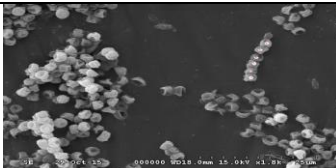
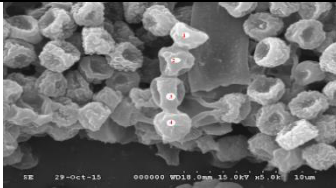
Az egyenlet eredményének és a t eloszlású változó eloszlásának statisztikai táblája segítségével határozhatjuk meg, hogy eredményünk szignifikáns-e, és ha igen, akkor milyen mértékben. Ha $|t| > t_{\text{table}}$, elvetjük H_0 -t és azt mondjuk, hogy a populáció korrelációs együtthatója különbözik 0-tól. Tehát, ha a kapott eredményünk abszolút értéke nagyobb, mint a táblázatban az adott szabadságfokhoz és szignifikanciaszinthez (ez általában 0,95) tartozó szám, akkor 95%-os bizonyossággal elutasíthatjuk a nullhipotézist.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Genetikailag módosított *Aspergillus nidulans* gombatörzsek spóramorfológiájának összehasonlító vizsgálata

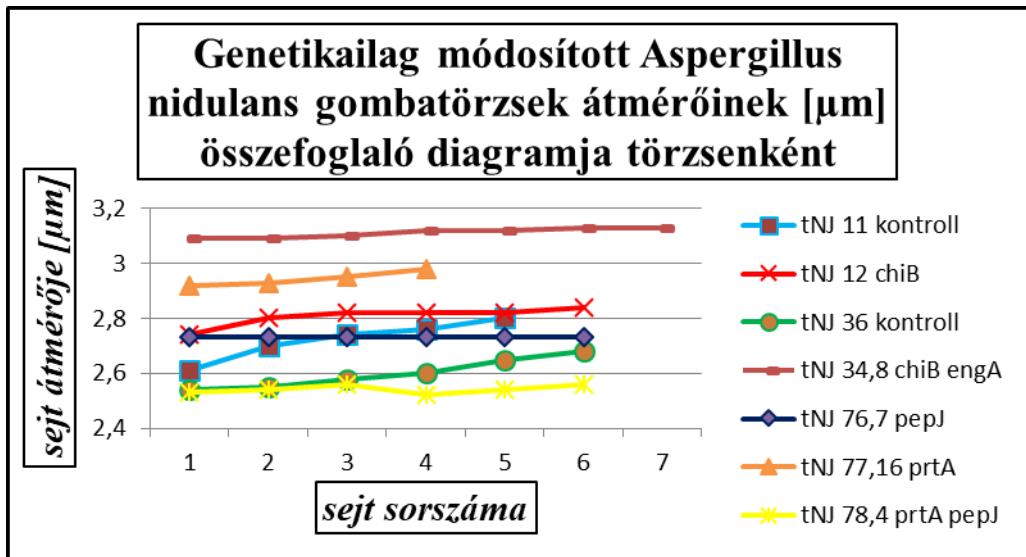
5.1.1 Törzsek összehasonlító elemzésének eredménye

Az *Aspergillus nidulans* törzsek elektronmikroszkópos képét és eredményeit egy összefoglaló táblázatban ábrázoltuk a könnyebb átláthatóság érdekében. A táblázatban a spórák méretét legjobban szemléltető képeket használtuk fel. A fotózási méretkülönbségeket már a digitális képanalízis legelső fázisában, a korábban leírt módon küszöböltük ki.

Genetikailag módosított törzs neve	Törzsről készített pásztázóelektronmikroszkópos felvétel	Összefoglaló táblázat	Táblázati eredmények																											
NJ 11 kontroll		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,54</td><td>2,45</td></tr><tr><td>2</td><td>2,56</td><td>2,53</td></tr><tr><td>3</td><td>2,56</td><td>2,51</td></tr><tr><td>4</td><td>2,58</td><td>2,56</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,54	2,45	2	2,56	2,53	3	2,56	2,51	4	2,58	2,56	Spórák általános mérete [μm]: 2,56 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,04									
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,54	2,45																												
2	2,56	2,53																												
3	2,56	2,51																												
4	2,58	2,56																												
tNJ 12 chiB		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,74</td><td>2,72</td></tr><tr><td>2</td><td>2,80</td><td>2,73</td></tr><tr><td>3</td><td>2,82</td><td>2,72</td></tr><tr><td>4</td><td>2,82</td><td>2,72</td></tr><tr><td>5</td><td>2,82</td><td>2,72</td></tr><tr><td>6</td><td>2,84</td><td>2,76</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,74	2,72	2	2,80	2,73	3	2,82	2,72	4	2,82	2,72	5	2,82	2,72	6	2,84	2,76	Spórák általános mérete [μm]: 2,81 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,10			
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,74	2,72																												
2	2,80	2,73																												
3	2,82	2,72																												
4	2,82	2,72																												
5	2,82	2,72																												
6	2,84	2,76																												
tNJ 36 kontroll		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,54</td><td>2,40</td></tr><tr><td>2</td><td>2,55</td><td>2,41</td></tr><tr><td>3</td><td>2,58</td><td>2,45</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,54	2,40	2	2,55	2,41	3	2,58	2,45	Spórák általános mérete [μm]: 2,55 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,04												
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,54	2,40																												
2	2,55	2,41																												
3	2,58	2,45																												
tNJ 34,8 chiB eng A		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>3,09</td><td>2,71</td></tr><tr><td>2</td><td>3,09</td><td>2,76</td></tr><tr><td>3</td><td>3,10</td><td>2,79</td></tr><tr><td>4</td><td>3,12</td><td>2,72</td></tr><tr><td>5</td><td>3,12</td><td>2,76</td></tr><tr><td>6</td><td>3,13</td><td>2,71</td></tr><tr><td>7</td><td>3,13</td><td>2,74</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	3,09	2,71	2	3,09	2,76	3	3,10	2,79	4	3,12	2,72	5	3,12	2,76	6	3,13	2,71	7	3,13	2,74	Spórák általános mérete [μm]: 3,11 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,02
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	3,09	2,71																												
2	3,09	2,76																												
3	3,10	2,79																												
4	3,12	2,72																												
5	3,12	2,76																												
6	3,13	2,71																												
7	3,13	2,74																												
tNJ 76,7 pep J		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,73</td><td>2,39</td></tr><tr><td>2</td><td>2,73</td><td>2,39</td></tr><tr><td>3</td><td>2,73</td><td>2,37</td></tr><tr><td>4</td><td>2,73</td><td>2,39</td></tr><tr><td>5</td><td>2,73</td><td>2,37</td></tr><tr><td>6</td><td>2,73</td><td>2,37</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,73	2,39	2	2,73	2,39	3	2,73	2,37	4	2,73	2,39	5	2,73	2,37	6	2,73	2,37	Spórák általános mérete [μm]: 2,73 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,00			
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,73	2,39																												
2	2,73	2,39																												
3	2,73	2,37																												
4	2,73	2,39																												
5	2,73	2,37																												
6	2,73	2,37																												
tNJ 77,16 prtA		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,92</td><td>2,31</td></tr><tr><td>2</td><td>2,93</td><td>2,30</td></tr><tr><td>3</td><td>2,95</td><td>2,32</td></tr><tr><td>4</td><td>2,98</td><td>2,32</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,92	2,31	2	2,93	2,30	3	2,95	2,32	4	2,98	2,32	Spórák általános mérete [μm]: 2,94 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,06									
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,92	2,31																												
2	2,93	2,30																												
3	2,95	2,32																												
4	2,98	2,32																												
tNJ 78,4 prtA pepJ		<table><tr><th colspan="3">Mért adatok</th></tr><tr><th>sejt</th><th>átmérő[μm]</th><th>vastagság[μm]</th></tr><tr><td>1</td><td>2,53</td><td>2,00</td></tr><tr><td>2</td><td>2,54</td><td>2,01</td></tr><tr><td>3</td><td>2,56</td><td>2,05</td></tr></table>	Mért adatok			sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]	1	2,53	2,00	2	2,54	2,01	3	2,56	2,05	Spórák általános mérete [μm]: 2,54 Spórák méretkülönbégei [μm]: 0,03												
Mért adatok																														
sejt	átmérő[μm]	vastagság[μm]																												
1	2,53	2,00																												
2	2,54	2,01																												
3	2,56	2,05																												

5.1.2 Törzsek összesített spóravizsgálata

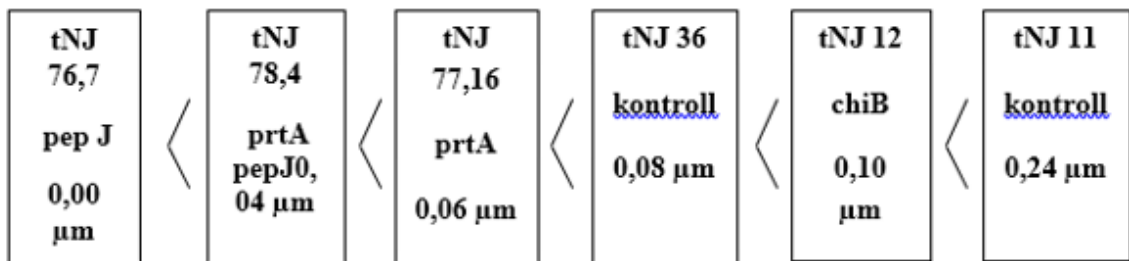
A 7 törzs spóráinak átmérőire vonatkozó adatokat összesítve egy közös diagramon jól látható, hogy az egyes törzsekhez tartozó spórák átmérői lineárisan növekvő egyeneseket alkotnak (9. ábra).



9. ábra: Átmérők összefoglaló diagramja

5.1.3 Méretkülönbségek vizsgálatának eredménye

A genetikai módosítások befolyásolhatják a képződő spóra sejtek morfológiájának kialakulásának bizonyos szakaszait, ezzel egyedi jellegzetességeket képesek kialakítani. Az általános méretkülönbségekkel, melyeket a legnagyobb és legkisebb spóra átmérőjének különbsége ad, ez a különbség számokkal is igazolható (10. ábra).



10. ábra: gombatörzsek spóráinak általános méretkülönbségeinek növekedése

A legnagyobb méretnövekedést a tNJ kontroll törzs spóráinál tapasztaltuk (0,24μm), a többi törzs esetén is adódtak spóra méretbeli változások. Azonban a tNJ 76,7 pep J törzs esetében 0,00 μm az egyes átmérők közötti különbség, vagyis a pep J gén deléciója nem okoz változásokat spóramorfológia terén.

A genetikailag módosított *Aspergillus nidulans* gombatörzsekről pásztázó elektronmikroszkóppal készített képeken csak a mikroszkóp fókuszába eső spórák átmérőjét és vastagságát mértük le ImageJ programmal, így kizárólag az azonos fókusz síkban lévő, pontos méret adatokhoz jutottunk. Az eredményeket tartalmazó táblázatok és vonaldiagramjaik jól szemléltetik, hogy a spórák átmérője lineárisan növekszik. A legkisebb és legnagyobb átmérőjű spóra közötti méretkülönbség elérheti akár a 0,24μm-t is.

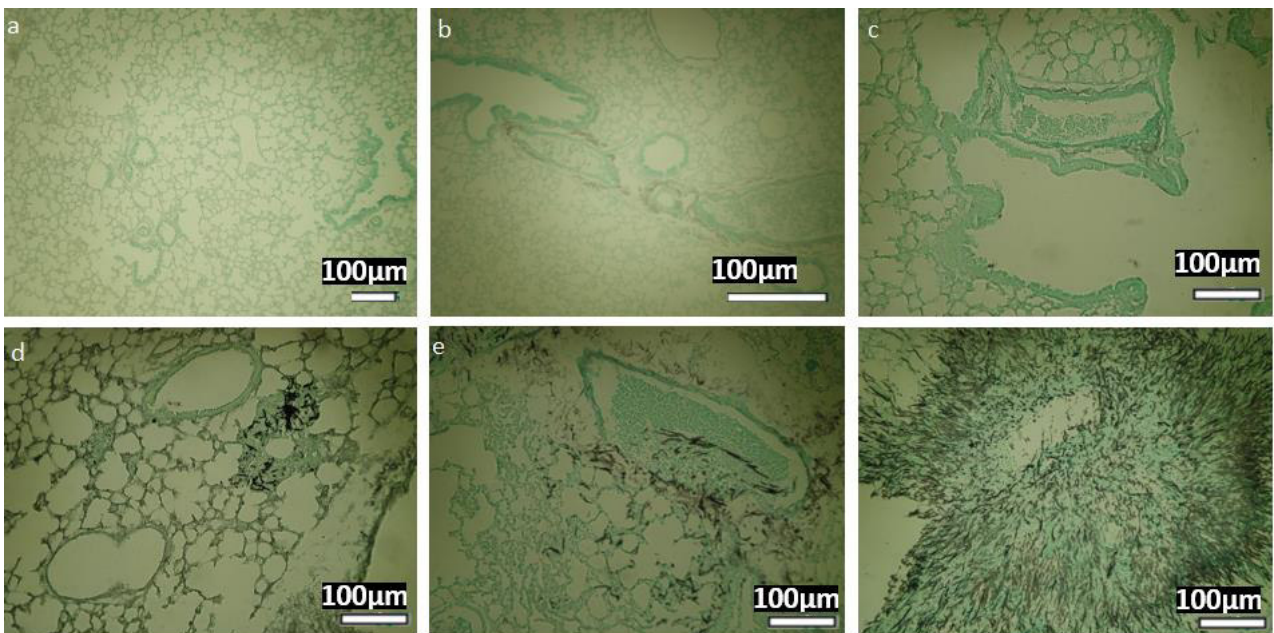
Ebből arra következtethetünk, hogy az egyes genetikai változtatások olyan folyamatokat indítanak el a törzsek életfolyamataiban, melyek akár nagymértékben befolyásolhatják a későbbi morfológiai heterogenitást, beleértve a spórák méretét is.

5.2 *Aspergillus fumigatus* patogenitási dinamikájának vizsgálata egér modellben

A patogenitási dinamika állatkísérletes meghatározásához elsőként két különböző támadáspontú immunuszuppresszív kezelés fertőzési dinamikára gyakorolt hatását vizsgáltuk egereken. A kontroll csoporthoz viszonyítva a hidrocortizonnal (HC) kezelt egerek 40%-a elpusztult 3 nappal, és 70%-a 6 nappal a fertőzés után. Magasabb volt a halálozási ráta a ciklofoszfamiddal (CP) kezelt egereknél: 50%-uk 3 nappal, 80%-uk 6 nappal a fertőzés után pusztult el. Továbbá, a CP immunuszuppresszánszal kezelt egyedek súlyuk 20-25%-át veszítették el 3-4 nappal a fertőzést követően. A fertőzés önmagában, CP beadása nélkül nem járt súlyvesztéssel.

5.2.1 Szövettani vizsgálat és károsodás a tüdőben

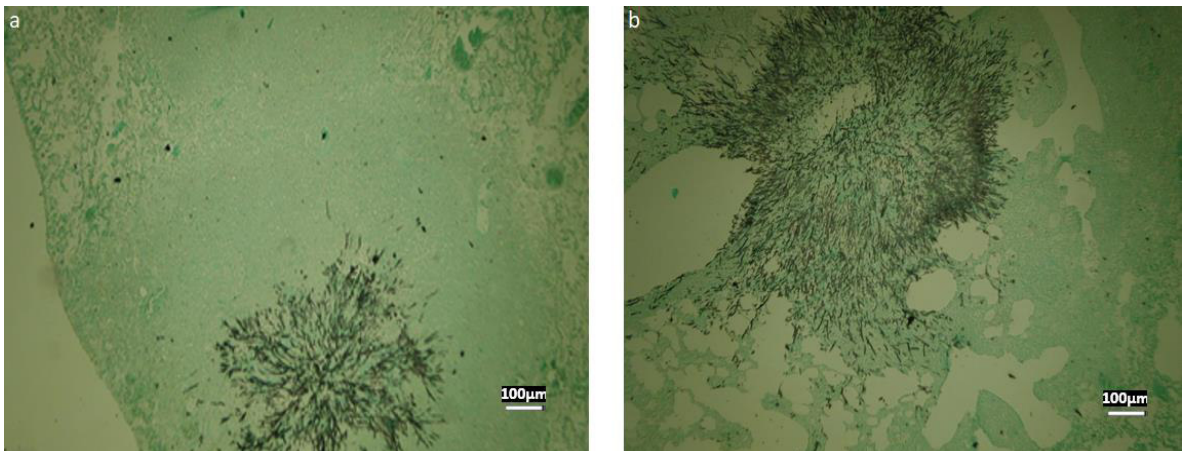
A tüdőben lévő hifák fejlődését Gömöri-Grocott ezüstimpregnációval (GMS) is láthatóvá tettük. Az immunkompetens egerek tüdejéből nyert szöveti metszetekben nem látható konídium vagy hifa (11. a ábra). A CP immunuszuppresszált egerek szöveti metszetében GSM konjugátum már 6 óra elteltével megfigyelhető volt (11 b. ábra), a hifák 14 óra után jelentek meg (11 c. ábra), a hifák mérete fokozatosan nő 30 óra elteltével (11 d ábra), 48 óra (11 e. ábra) és 96 óra fertőzés után (11 f. ábra).



11. ábra: A tüdőszövet metszetei Gömöri-Grocott ezüstimpregnációval (GMS).

a; kontroll tüdő metszet; b: fertőzött tüdő metszete 6 h; c: 14 h; d: 30 h; e: 48 h; f: 96 h; a fertőzés után

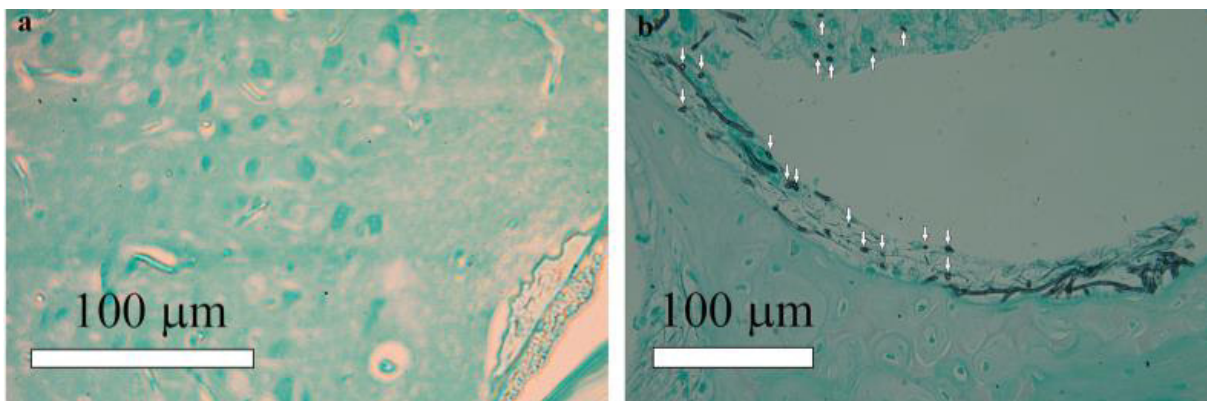
A HC (12 a. ábra) és az CP (12 b. ábra) immunszuppresszió után 96 órával az immunszuppresszáns által indukált hifák növekedésének összehasonlítása egyértelműen kimutatta, hogy a CP tüdőben való immunszuppresszív hatása sokkal erősebb volt, mint a HC.



12. ábra: HC (a) és CP (b) immunszuppresszív hatásának összehasonlítása az *A. fumigatus* hifális kiterjedésével a tüdőszövetben.

5.2.2 Hifa növekedés vizsgálata az agyban

Néhány egégnél hifa fejlődést figyeltünk meg az agyban a GMS után. Az immunkompetens, megfertőzött egerekben nem látható sem konídium, sem hifa (13 a. ábra). A CP-vel kezelt egerek mintáiban a fertőzés után 96 órával konídiumok, és hosszú hifák láthatók, azonban a konídiumok 50%-a nem mutatott hifanövekedést (13 b. ábra).



13. ábra: Agyszövetek festése GMS-sel

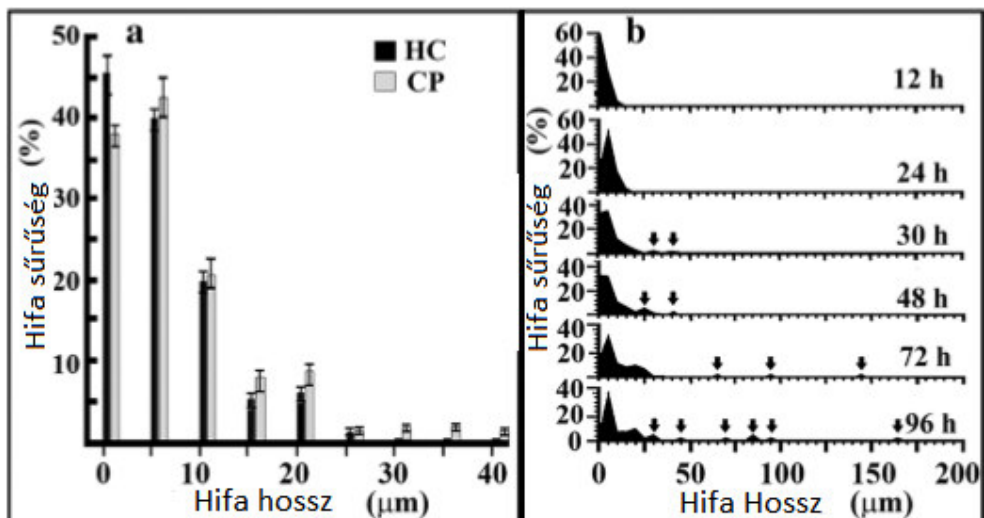
a: Kontroll agy szövet

b: Agytörzs festése 96 h fertőzés után.

A fehér nyilak azt mutatják, hogy a konídiumok nem hifális növekedést mutatnak. A fekete vonalak hifa növekedést jeleznek.

5.2.3 Pulmonális hifák hossza

Sem a hifanövekedést, sem a plakk képződést nem vizsgáltuk a megfertőzött, immunkompetens egereknél, mivel nem alakult ki plakk. **A** hifafonalak növekedésének összehasonlítása immunszuppresszánsok jelenlétében megmutatta, hogy 4 nappal a HC kezelés után kb. a hifák 40%-a 5µm-nél rövidebb volt. A hifa hosszabb volt a CP-vel kezelt egereknél a HC-vel kezeltékhez képest, ezért a további kísérletekhez CP-t használtunk, HC helyett. A maximális hifahossz nagyobb, mint 40µm volt CP-vel kezeltéknél, és csak 26 µm volt HC-vel kezelték esetében (14.a) A hossz eloszlása a CP kezelés után fokozatos növekedést mutatott (14. b ábra).



14. ábra: A hifa növekedés változása pulmonáris aszpergillózis egérmodellben.

a: Hifa eloszlást 4 nappal 125 mg / kg HC után és 4 nappal a 250 mg / kg CP kezelés után.

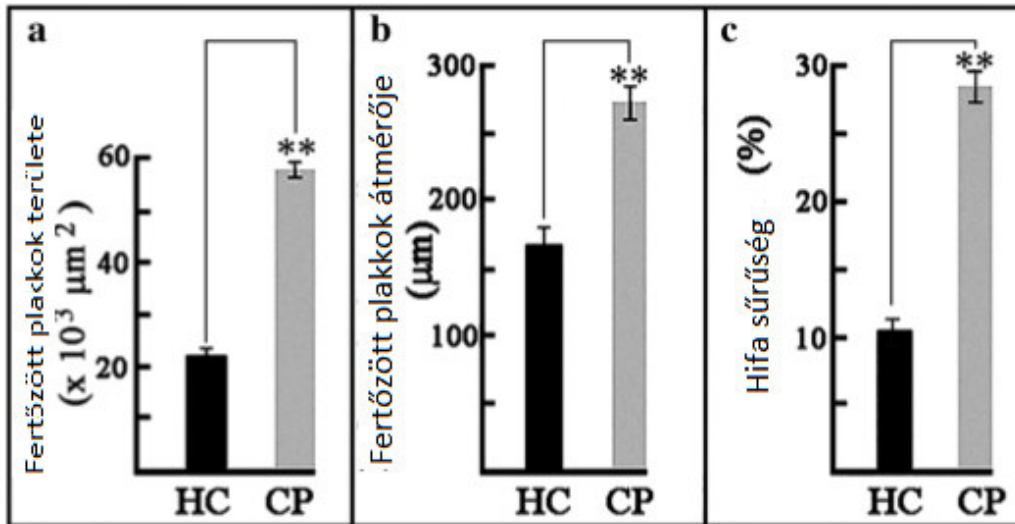
b Hifahossz eloszlás egerekben, CP immunszupresszáva különböző időpontokban: 12, 24,30,48, 72 és 96 óra

A fertőzés után 12 órával a nyugvó konídiumok elkezdtek csírázni, de a hifák 40%-a 5 μm-nél rövidebb volt (átlagosan 7μm, de maximum 15μm hosszúak voltak). Enyhe növekedést figyeltünk meg a fertőzés utáni 24. órában átlag 9,6μm-es hifahosszal. Az eloszlás jobbra tolódott el, és a konídiumok nagy része kicsírázott. 30 óra után az átlaghossz 10,8 μm volt, egyenetlen, jobbra tolódott eloszlással. 48 órával később az átlag hossz 11,2 μm volt, és morfológiai különbségeket is felfedeztünk. 72 órával a fertőzés után a hifák 10%-a elérte az átlag 15-30 μm-es hosszt, és kevesebb, mint 2%-a akár 145 μm-esre is megnőtt. A maximális hossz 165 μm volt a 96 óra elteltével.

5.2.4 Pulmonális aszpergillózis

A hifák hossza mellett a plakkok átmérőjét és a hifa sűrűséget is összehasonlítottuk az immunszupresszált állatokban (15 a-c ábra). A plakkok által fertőzött területek több mint kétszer nagyobbak voltak a CP kezelésnél, mint a HC-nél (15. a ábra). Az átlagos pulmonális plakkátmérők a HC-nél szignifikánsan kisebbek voltak, mint a CP-kezelt egereknél (15b. ábra). A hifa sűrűség a tüdőben többnyire nagyobb volt, mint a CP kezelt egereknél

(15 c. ábra). Hosszabb fertőzés esetén immunszuppresszánsok jelenlétében a pulmonális aszpergillózis jelentősen súlyosbodott. A hifális sűrűség a tüdőben közel háromszor magasabb volt CP kezelés után, mint HC kezelést követően.



15. ábra: Plakk területe, plakkátmérője és a hifák sűrűsége pulmonális aszpergillózis egérmodellben. Hat nappal 125 mg / kg HC (fekete négyzet) és 6 nappal 250 mg / kg CP-kezelés (szürke négyzet) után.

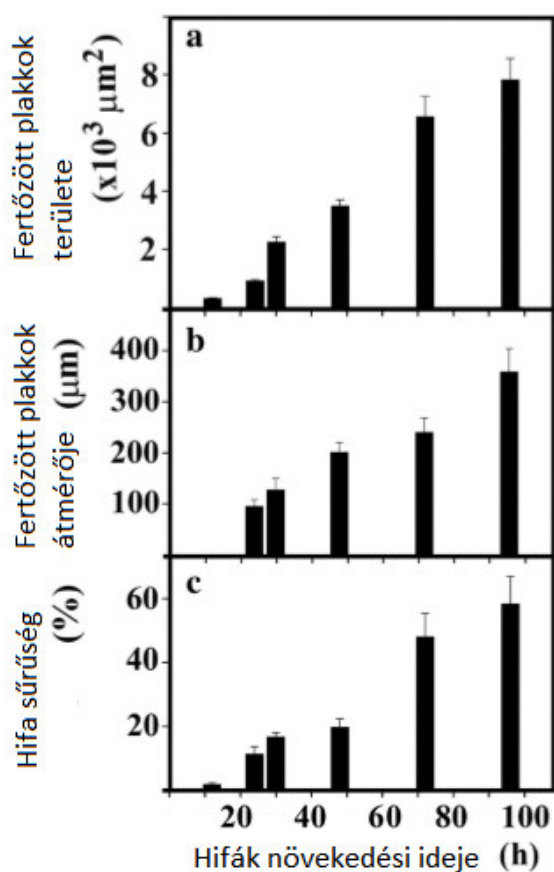
a: Fertőzött plakk területe

b: Plakk átmérője

c: Hifa denzitás HC és CP kezelés után.

A méréseket öt véletlenszerűen kiválasztott területen végeztük. Statisztikai analízis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

A fertőzés korai stádiumában nem találtunk hifákat, csak duzzadt konídiumokat. Az első hifák 12 óra múlva jelentek meg, átlagos hosszuk $4,6 \pm \mu\text{m}$ volt. A későbbi szakaszokban a fertőzés után (48 h) a tüdő szövetének lízise látható volt. 96 óra elteltével a fertőzések után a leghosszabb hifák $15 \mu\text{m}$ hosszúak voltak. Elhatárolható aszpergillómát nem lehetett megkülönböztetni. A hifák maximális hosszának megállapítása a hifák szétdarabolódása miatt lehetetlen volt.



16. ábra: Hifális növekedés CP immunszuppresszált, pulmonális aszpergillózisban szenvedő egerekben.

a: fertőzött plakk területének növekedése a fertőzés utáni idő függvényében

b: a fertőzött plakkátmérő vastagodása

c: a CP-immunszuppresszált egerekben 12, 24, 30, 48, 72 és 96 órával a fertőzést követően a hifa sűrűséget mértük.

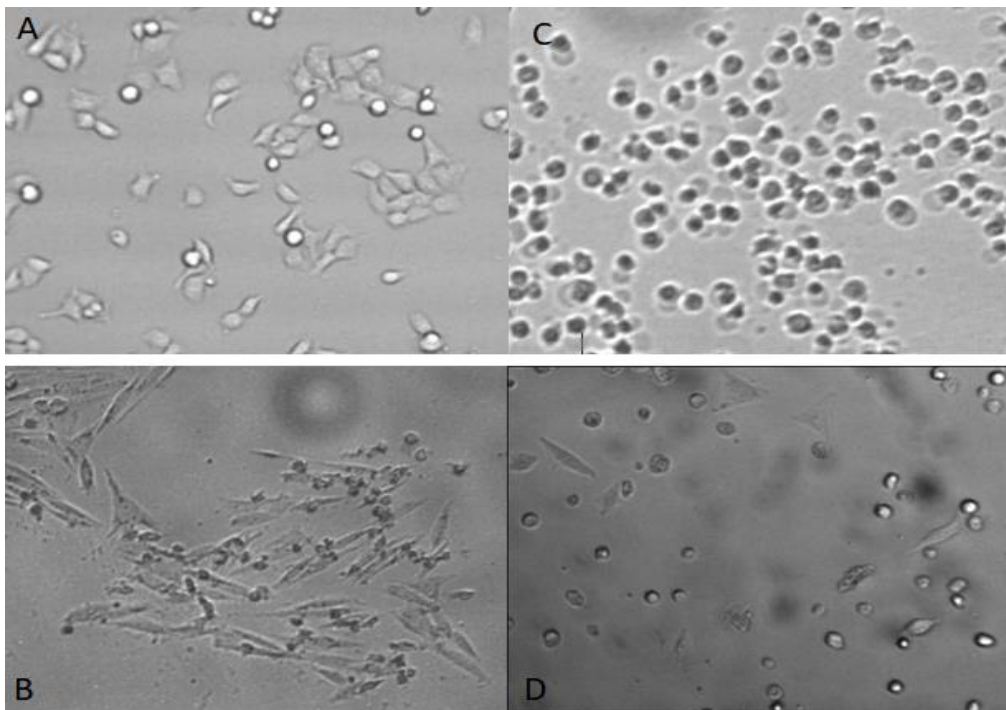
5.3 Mycoplasma fertőzés korai detektálása dinamikus képelemzési módszerrel

5.3.1 A *Mycoplasma* fertőzés validálása

A *Mycoplasma* fertőzés kimutatását megfelelő körülmények között három sejtenyészetben vizsgáltuk (HaCaT, OCM-1, SCC) time-lapse mikroszkópia segítségével. A fertőzés ellenőrzéséhez *Mycoplasma* PCR-tesztet alkalmaztunk, majd agaróz gélelektroforézissel értékeltük ki a kapott eredményeket. A nem fertőzött sejtek negatív eredményt adtak. A time-lapse mikroszkópia (TLS) alkalmazhatóságát *Mycoplasma* fertőzés kimutatására *Mycoplasma* teszt Kit segítségével validáltuk. Belső pozitív kontroll szolgáltatva az eredmények igazolását.

5.3.2 A *Mycoplasma*val fertőzött sejtenyészetek morfológiája és dinamikája

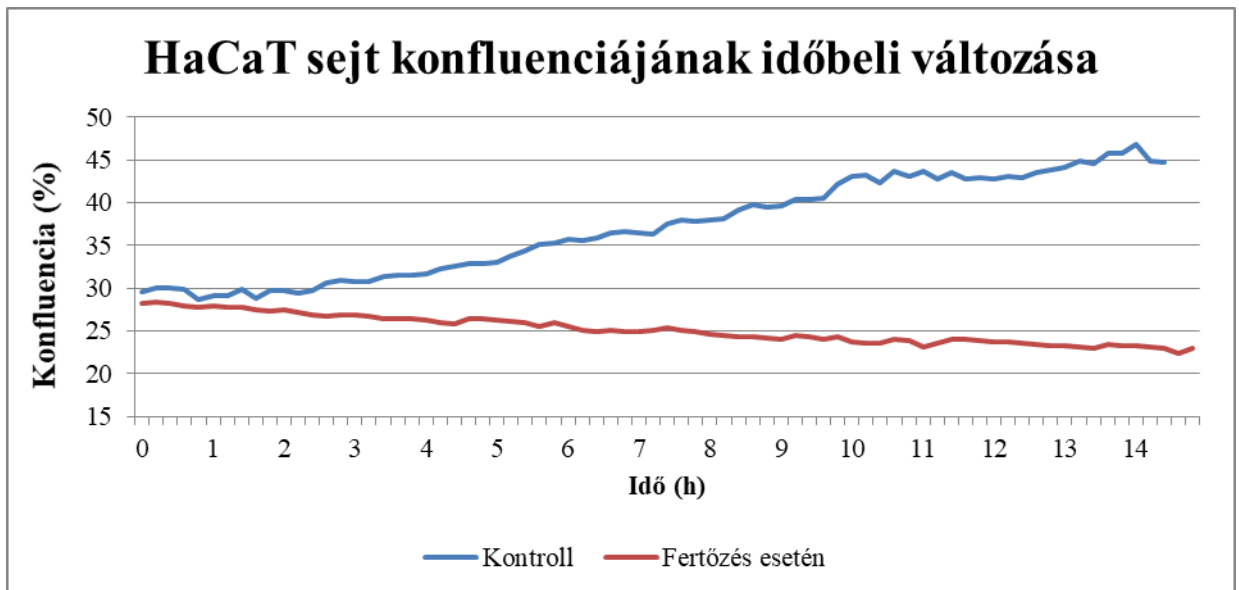
A fertőzést követő első 15-20 órában a baktérium jelenlétére a tenyészetben a megváltozott sejtmorfológia, illetve a csökkent motilitás és osztódási képesség alapján következtethettünk. Egészséges (17. A és 17.C ábra) és *Mycoplasma*val fertőzött (17.B és 17.D ábra) HaCaT és OCM sejtek összehasonlítása során látható, hogy a kontroll tenyészzel ellentétben a fertőzött sejtek nem létesítenek adhéziós kapcsolatokat egymással, így nem alkotnak telepeket, ezen kívül nem képesek felvenni a rájuk jellemző ellapult, illetve megnyúlt morfológiát sem. A fertőzött HaCaT kultúrában több helyen a citoplazmából kitüremkedő sejtmagot láthatunk.



17. ábra: HaCaT (A, B) és OCM (C, D) sejtek fagyasztásból történő felvétel után 6 órával.

A, C: egészséges tenyészet B, D: *mycoplasmával* fertőzött tenyészet

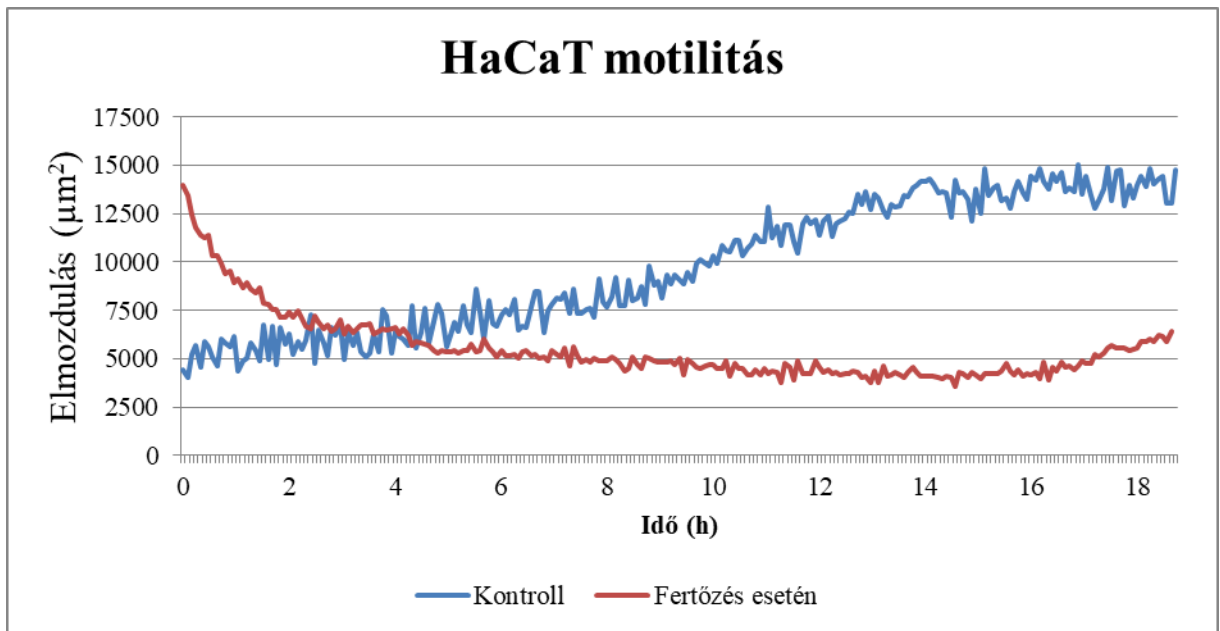
Mycoplasmával fertőzött és kontroll emlős sejtenyészetekről készült TLS felvételek digitális képelemzésével diagramon ábrázoltuk a tenyészetek motilitását és a konfluencia időbeli változását a fertőzés kezdeti szakaszában. Az ábrákon a kontroll tenyészetek konfluenciájában fokozatos növekedést, míg a fertőzött sejtek esetében lassú csökkenést láthatunk, ez utóbbi a sejtek csökkent vagy teljesen megszűnt osztódási képességének és a kismértékű sejtpusztulásnak köszönhető.



18. ábra: HaCaT sejt konfluenciájának időbeli változása

A fertőzött sejtenyészet mozgása is jellegzetesen eltérő dinamikát mutat a tiszta tenyészetétől. A sejtek csökkent adhéziós képességének köszönhetően a tenyészet indításakor 1-2 óráig azok nem képesek letapadni a tenyésztőedény felületére. Ez idő alatt a sejtek sodródásából adódóan erős mozgást figyelhetünk meg a kontroll sejtkultúrához képest. A letapadást követően a fertőzött sejtek migrációja jelentősen alulmarad az egészséges tenyészetéhez viszonyítva. A diagramon a 17-18. óránál látható növekedés már a fertőzött

sejtek adhézión kapcsolatainak megszűnését, így a tenyésztő felületről történő felválását jelzi.



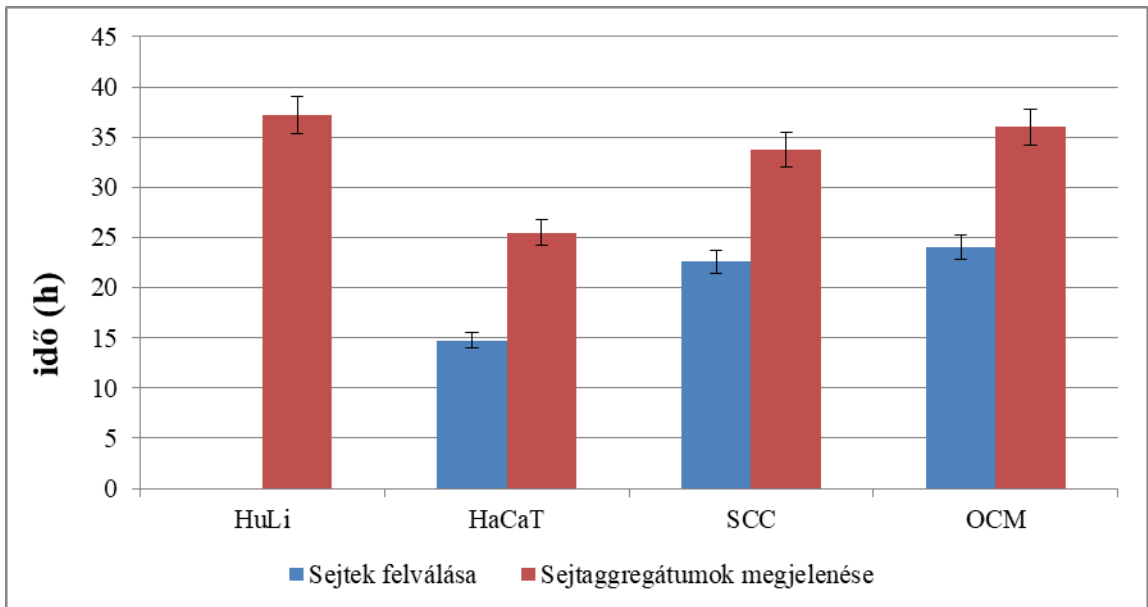
19. ábra: HaCat sejtek motilitása

5.3.3 A sejtek felválása, aggregátumok megjelenése, biofilm képződés

A fertőzés további, már a sejtek pusztulásával járó jelei sejttypustól függően a fertőzés bekövetkezte után 15-25 órával jelentek meg. Ennek első jele, hogy a sejtek felváltak a tenyésztőedény aljáról, miközben elkezdődött a *Mycoplasma* fertőzésre jellemző biofilm képződése. Kb. 10 órával a sejtek felválását követően nagy mennyiségű *Mycoplasma* sejtaggregátum jelent meg a tenyésztőedényben. A sejtek felválása és az aggregátumok megjelenése kis szórással mindig egy időpontban történt az egész látótéren, a tenyészet különböző részei a fertőzés fázisait tekintve szinkronban voltak. Az említett események időpontját általunk választott reprezentatív régiók (n=5) megfigyelésével határoztuk meg minden sejttypusnál, ezt a 20. ábrán ábrázoltuk.

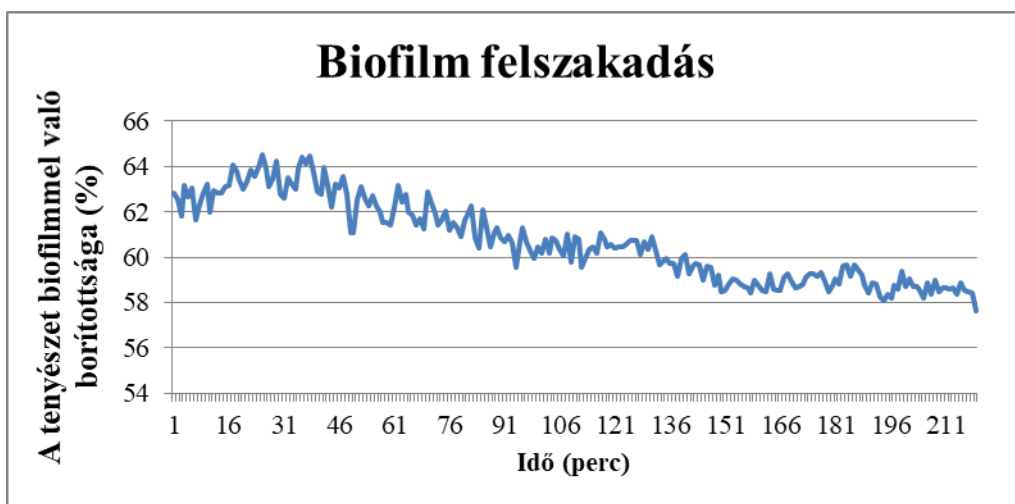
Az egyes sejttypusok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a *Mycoplasma* fertőzés fázisainak megjelenése eltér az egyes sejtvonalaknál. Humán Limbus sejtvonala esetén a sejtek felválása a tenyésztőflaska aljáról elmarad, ez valószínűleg a limbus sejtek erős adhézión tulajdonságaiból adódik.

A sejtek felválása és a sejtaggregátumok megjelenése közötti idő a különböző sejtípusoknál közel megegyezik, az adatok alapján ez 20-23 órát jelent.

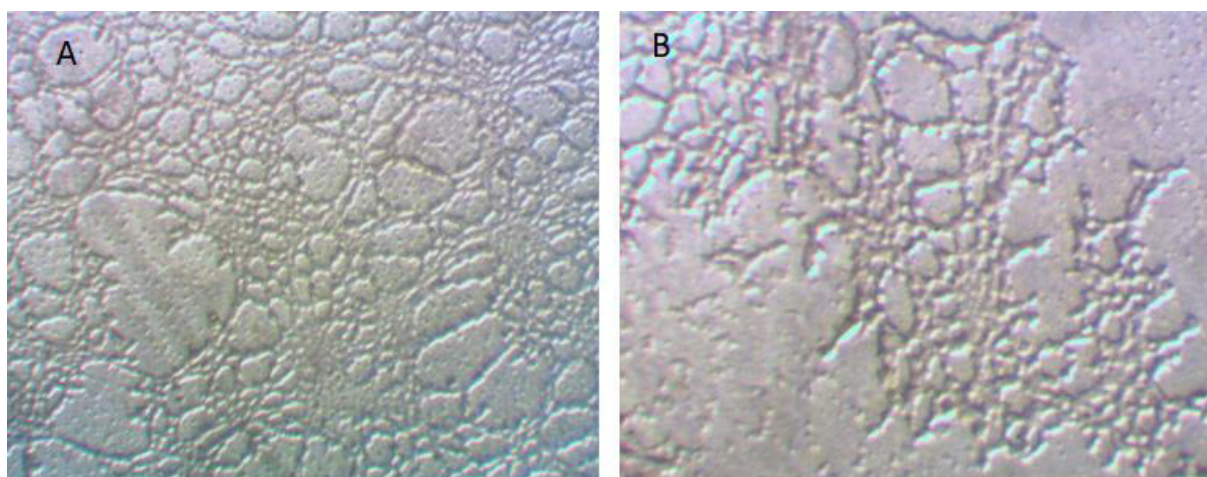


20. ábra: A sejtek felválása és a sejtaggregátumok megjelenése a különböző sejtípusoknál.

A sejtaggregátumok megjelenése után (azaz a fertőzés kezdete után 35-40 órával) a létrejött biofilm fokozatosan felszakadozik és sajátos, hálózatos szerkezetet alakít ki. Ez a látóteret borító összefüggő biofilm réteg területének csökkenésében is megjelenik, melyet a 21. ábra szemléltet. Az így kialakult morfológia a *Mycoplasma* fertőzés egyedi elkülönítő jellege lehet más típusú fertőzésektől.



21. ábra: Biofilm felszakadásának dinamikája



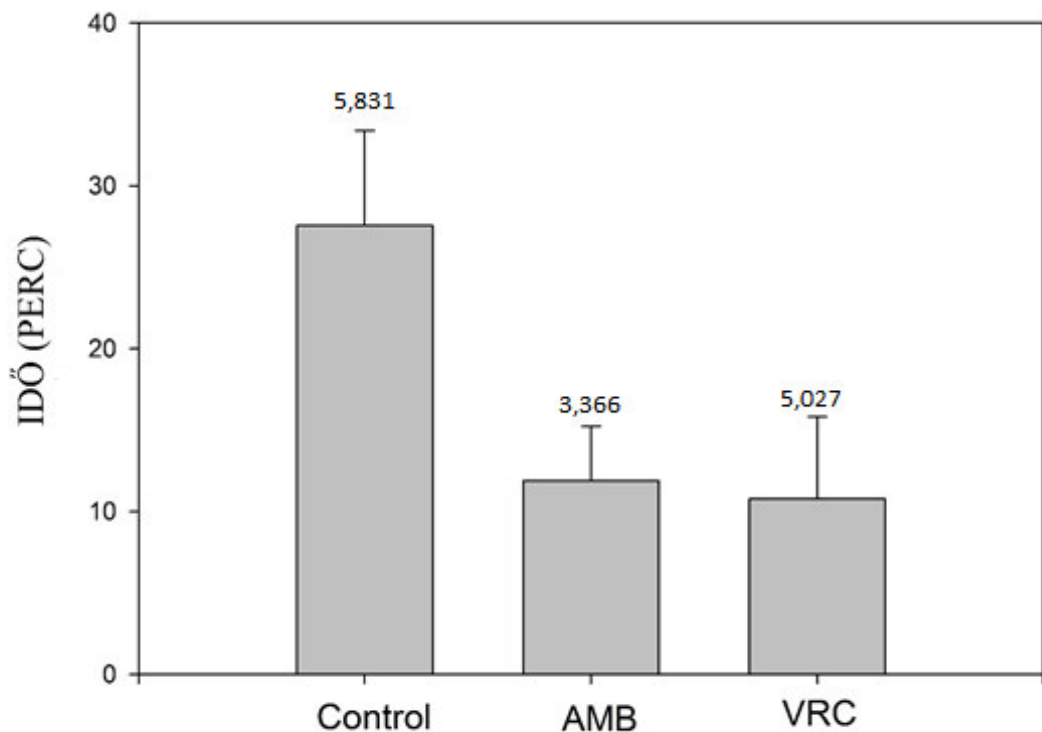
22. ábra: A biofilm kialakulása (A) és felszakadása (B)

5.4 *Aspergillus fumigatus* patogenitási dinamikájának vizsgálata hosszútávú videomikroszkópos rendszerrel

Miután az *Aspergillus fumigatus* spórákat Amphoterin-B-vel (AMB) és vorikonazole-lal (VRC) kezeltük, megfigyeltük a spóramozgást time-lapse mikroszkóppal. Az első tényező, amit figyeltünk a Brown mozgás megszűnése volt, ami a letapadás kezdetét jelezte. Ezt követte a hifázás megkezdése, és az első hifaelágazás megjelenésének ideje. Ezek a paraméterek a gomba letapadási és patogenitási dinamikájának mutatták gátlószerek jelenlétében.

5.4.1 Brown mozgás megszűnése

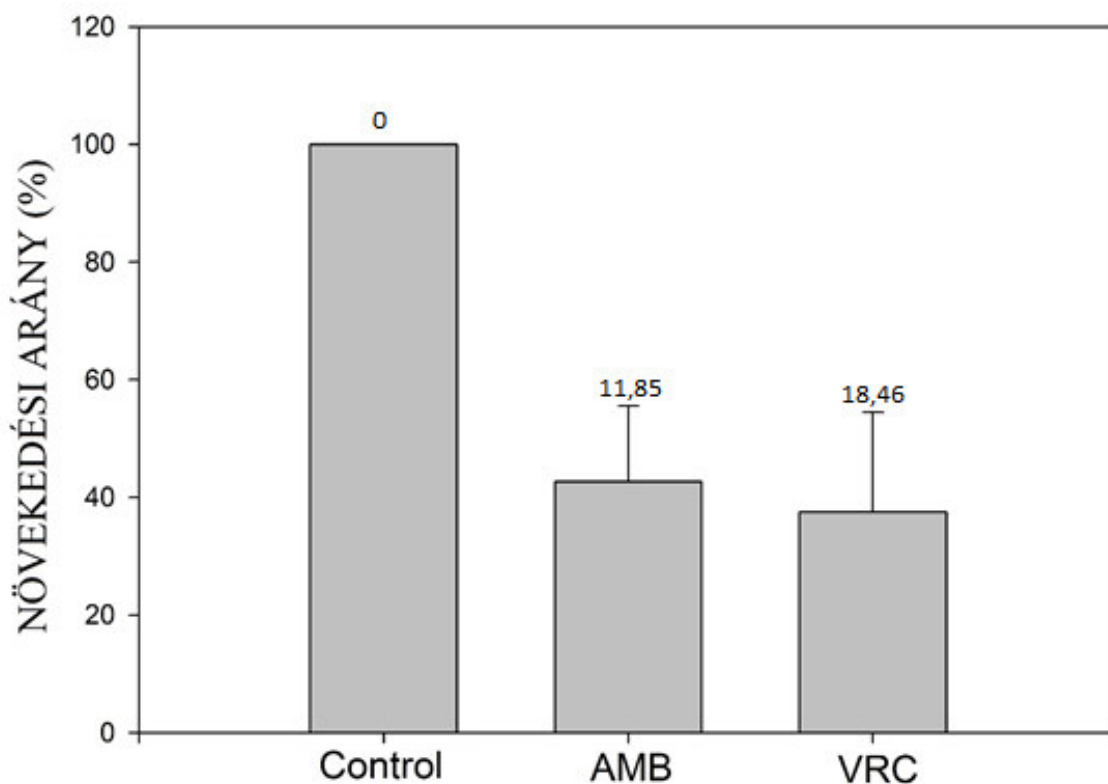
Brown mozgás leállításának időpontja a letapadás kezdete. A Brown mozgás átlagos befejezési ideje kevesebb volt az AMB-vel kezelt (12 perc) vagy a VRC-vel kezelt (11 perc) spórák esetében, mint a kontroll tenyészetnél (28 perc) (26. ábra), de az eltérés maximális értéke hasonló volt a kontrollhoz. Az AMB és a VRC kezelésnek köszönhetően a Brown mozgás hamarabb állt meg, így a spórák felülethez való tapadása hamarabb bekövetkezett.



23. ábra: Brown mozgás megszűnésének átlagos ideje. Az oszlopok tetején feltüntetett értékek a szórást jelentik

A kontroll spórák letapadási ideje körülbelül 27 perc volt, az AMB-vel kezelt spórák átlagos tapadási ideje körülbelül 12 perc volt, és a VRC-vel kezelt konídiumok átlagos tapadási ideje körülbelül 11 perc volt. Az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált antimikotikumok, serkentik a letapadási folyamatokat. A szórások különbségei elhanyagolhatóak voltak a vizsgált anyagoknál.

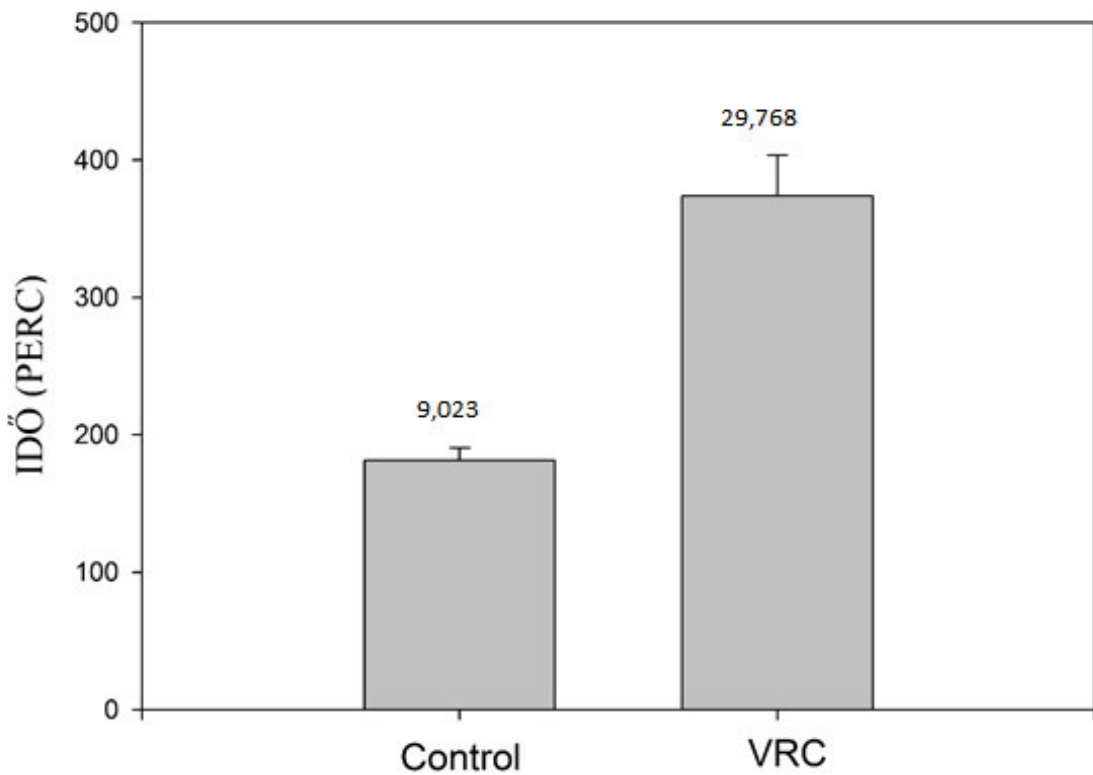
A különböző kezelések után az adhézió időpontját a kontroll százalékában vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az AMB vagy VRC kezelés után mért értékek hasonlóak voltak (24. ábra).



24. ábra: Brown mozgás megszűnésének százalékos aránya a kontrollhoz viszonyítva. Az oszlopok tetején feltüntetett értékek a szórást jelentik. Az AMB és VRC értékei hasonlóak voltak.

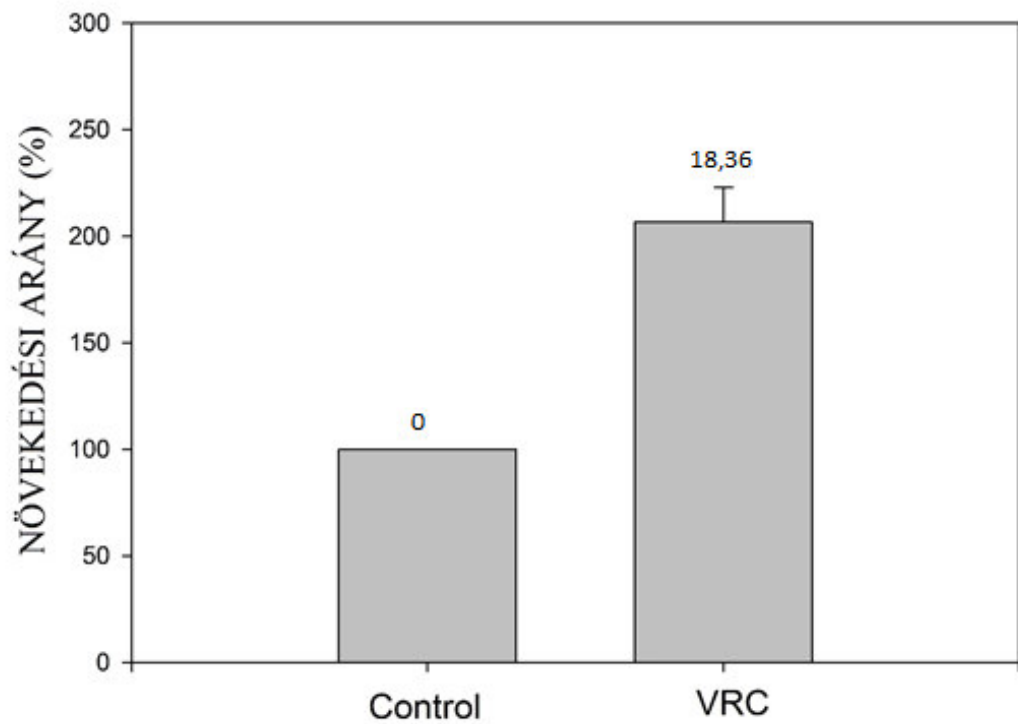
5.4.2 Hifázás kezdetének vizsgálata

A Brown mozgás megszűnése után a csírázás elindulását vizsgáltuk. Az AMB gátolta a konídiumok csírázását, ezért a hifák növekedését a kontroll és a VRC-vel kezelt spórák esetében tanulmányoztuk (25. ábra). Az első hifák megjelenésének átlagos időtartama 181 perc volt a kontrollban és 374 perc a VRC kezelés után. A VRC tehát késlelteti a csírázást, de a gomba képes kialakítani az első hifáit. Az első hifák megjelenése a patogén gombák fontos virulencia faktora. Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a vizsgált gomba elleni szerek (AMB, VRC) a konídiumok letapadását serkentik, a hifák megjelenését késleltetik, a hifák növekedését pedig akadályozzák.



25. ábra: Az első hifa megjelenésének átlagos időtartama. Az oszlopok tetején feltüntetett értékek a szórást jelentik.

Amikor a konídiát 0.25 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú AMB-vel kezeltük, a konídium nem csírázott. Amikor a konídiumokat VCR-vel kezeltük, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban nem gátolta, csak késleltette a csírázást.



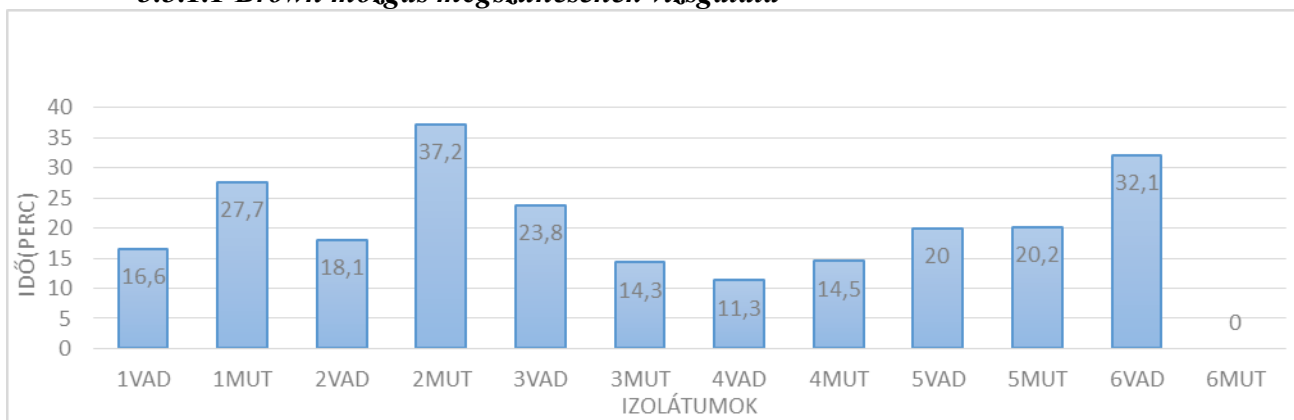
26. ábra: Az első hifa megjelenési ideje a kontroll százalékában. Az első hifa megjelenésének időtartama kettős kontroll volt. Az oszlopok tetején feltüntetett értékek a szórást jelentik.

5.5 *Candida albicans* izolátumok tapadási és fertőzési dinamikájának összehasonlítása dinamikus képelemző technikák segítségével

5.5.1 Csoportos spóravizsgálatok

Az *Aspergillus fumigatus* fonalas gomba spórák letapadásának, kinövésének és hifázásának vizsgálatát kiterjesztettük *C. albicans* élesztő gombák klinikai izolátumaira is.

5.5.1.1 Brown mozgás megszűnésének vizsgálata



27. Ábra: A Brown mozgás megszűnésének átlagos ideje. Az izolátumok neveinek rövidítését az X tengelyen, a Brown féle mozgás megszűnésének idejét az Y tengelyen tüntettük fel.

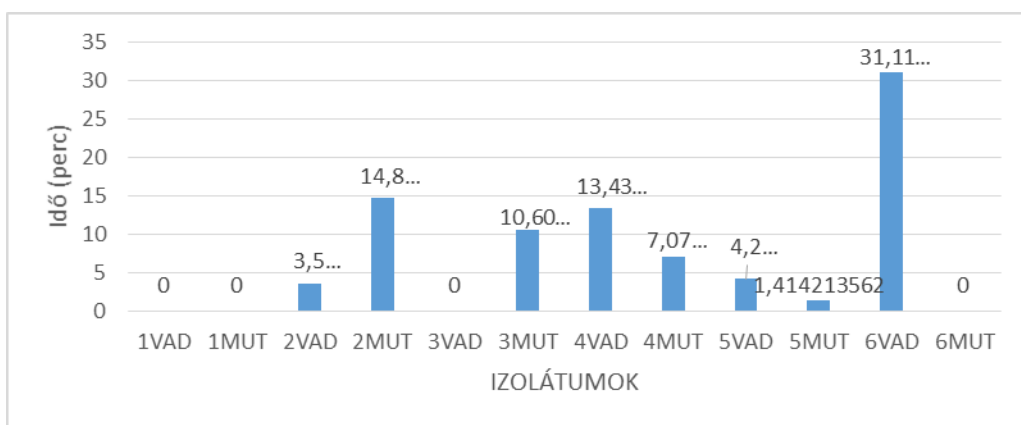
A Brown mozgás megszűnésének átlagos ideje alapján meghatározható a letapadási faktor a vizsgált törzseknél.

Brown mozgás megszűnése alapján a letapadási faktor látható csökkenő sorrendben:

4VAD 3MUT 4MUT 1VAD 2VAD 5VAD 5MUT 3VAD 1MUT 6VAD 2MUT
11,3 14,3 14,5 16,6 18,1 20 20,2 23,8 27,7 32,1 37,2

A Brown mozgás megszűnésének átlagos ideje megmutatja, hogy milyen gyorsan tapadtak le az egyes izolátumok spórái. A vizsgálatnál fordított arányosság áll fenn a Brown mozgás megszűnésének ideje és a letapadási

faktor között. Minél kisebb a Brown mozgás megszűnésének átlagos ideje, annál nagyobb lesz a letapadási faktor. A vizsgálat esetében a 6MUT kódolású törzs nem mutat konzekvens eredményt, mivel a spórák egyáltalán nem tapadtak le. A letapadási faktor dinamikáját vizsgálva megállapítható, hogy a legjobb letapadást elérő izolátumok az 59 éves nő sebváladékból vett klinikai izolátum (4VAD), illetve a 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (3MUT) voltak. Ezzel szemben a legkevésbé virulens izolátumok a 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT), illetve a 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátum (6VAD) voltak.



28. Ábra: A Brown mozgás megszűnési idejének szórása.

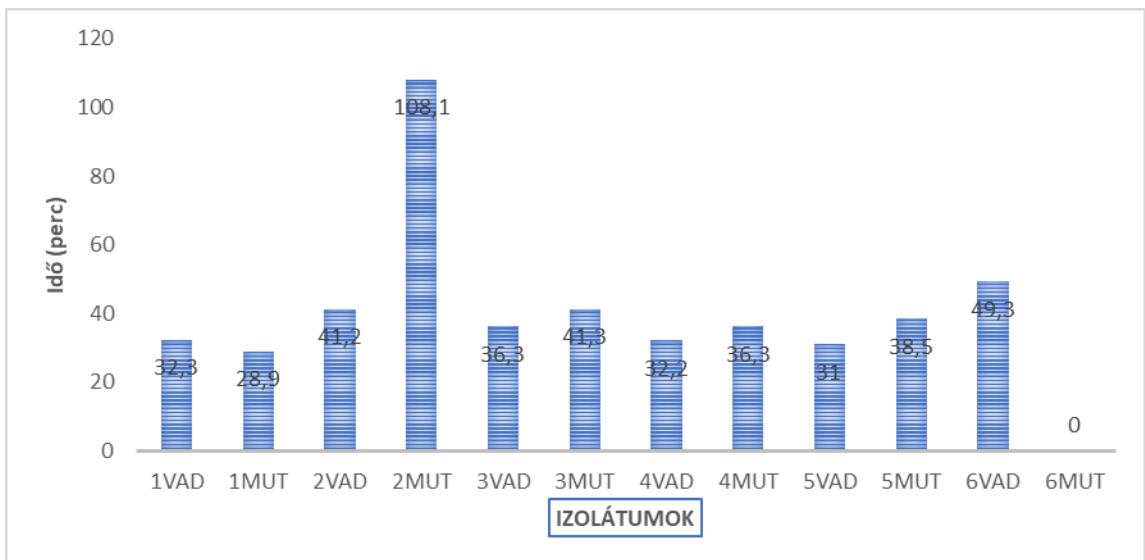
A Brown mozgások megszűnésének különbségei alapján a letapadási faktor heterogenitásának leírása csökkenő sorrendben:

1VAD 1MUT 3VAD 5MUT 2VAD 5VAD 4MUT 3MUT 4VAD 2MUT 6VAD
0 0 0 1,414214 3,535534 4,242641 7,071068 10,6066 13,43503 14,84924 31,1127

Az elemzés értelmezésében tehát minél kevésbé térnek el az izolátumok az átlagtól, annál egységesebb a letapadásuk. A letapadási heterogenitás szempontjából legegységesebb izolátumok: a kontroll törzs (1VAD), a tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs (1MUT), illetve a 45 éves nő (3VAD) kanüljéből vett klinikai izolátum. Ezzel szemben a legtágabb időintervallumban a következő izolátumok tapadtak le: 10 éves lány

szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT) illetve 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátum (6VAD.) A spórávizsgálatokból levonható a következtetés, mely szerint a vizsgált klinikai izolátumok és kontroll törzs esetén a letapadási képesség nem mutat összefüggést a spórák letapadási hajlamának populáción belüli heterogenitásával.

5.5.1.2 Hifázás elindulásának vizsgálata



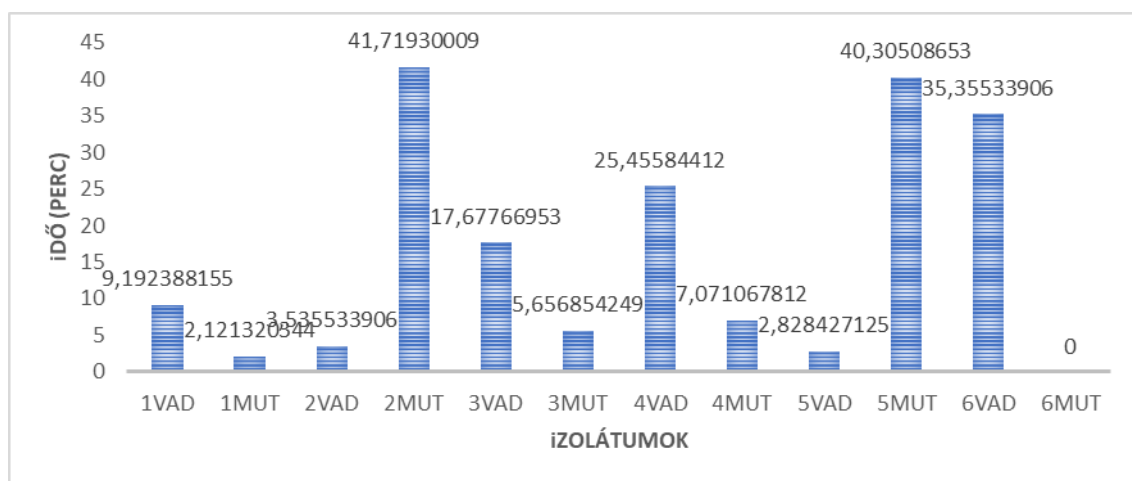
29. ábra: A hifázás elindulásának ideje. A 30. ábrában megadott klinikai izolátumok *C. albicans* gomba hifázás kezdete közötti szórásokat tünteti fel.

A hifázás elindulásának ideje a virulencia egyik alapvető faktora (88). A 6MUT kódjelű mutáns nem vizsgálható, mivel a letapadás mellett a hifázás sem indult meg ennél a törzsnél. Ennél a vizsgálatnál is fordított arányosság áll fent, tehát minél kisebb a vizsgált törzs átlagos hifázási ideje, annál nagyobb lesz a virulenciafaktora. A hifázás elemzésének átlagos idejénél a következő virulenciasort tudjuk megállapítani:

Hifázás kezdetének átlagos ideje alapján a virulenciafaktor leírása csökkenő sorrendben:

1MUT	5VAD	4VAD	1VAD	4MUT	3VAD	5MUT	2VAD	3MUT	6VAD	2MUT
28,9	31	32,2	32,3	36,3	36,3	38,5	41,2	41,3	49,3	108,1

A vizsgált izolátumok közül tehát a hifázási képességet tekintve a legavirulensebb törzsek a tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs (1MUT), illetve a 34 éves férfi hasüri kanüljéből vett klinikai izolátum (5VAD). Ezzel szemben a legfertőzőbb izolátumok a 10 éves lány szájjüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT), illetve a 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátum (6VAD).



30. ábra: A hifázás elindulási idejének szórása az egyes törzseken belül

A hifázás kezdetének szórása megállapítható a vizsgált törzsek heterogenitási vizsgálatából. Minél kisebb az adott izolátum szórásának értéke, annál egységesebben kezdett hifázni

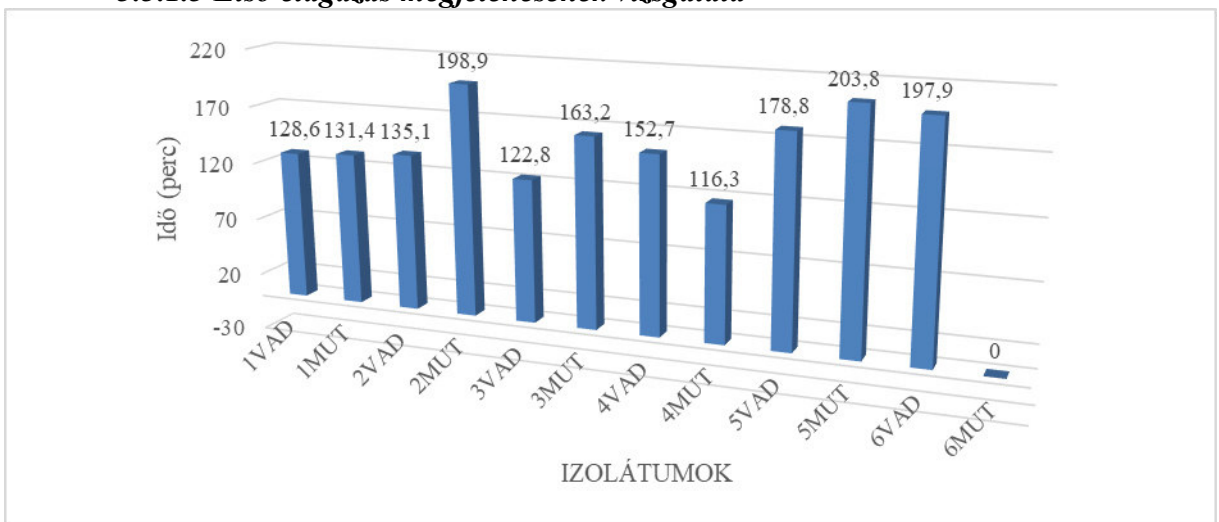
A fertőzési faktor heterogenitásának leírása csökkenő sorrendben:

1MUT	5VAD	2VAD	3MUT	4MUT	1VAD	3VAD	4VAD	6VAD	5MUT	2MUT
2,12132	2,828427	3,535534	5,656854	7,071068	9,192388	17,67767	25,45584	35,35534	40,30509	41,7193



Ez alapján leírható, hogy a legegységesebben a következő izolátumok hifáztak: a tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs (1MUT), illetve a 34 éves férfi hasüri drain-jéből vett klinikai izolátum (5VAD). Ezzel szemben megállapítható, hogy a legnagyobb időintervallumban a következő izolátumok spórái hifáztak a 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT), illetve a 34 éves férfi hasüri drain-jéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (5MUT).

5.5.1.3 Első elágazás megjelenésének vizsgálata



31. ábra: Első hifa elágazás megjelenésének ideje.

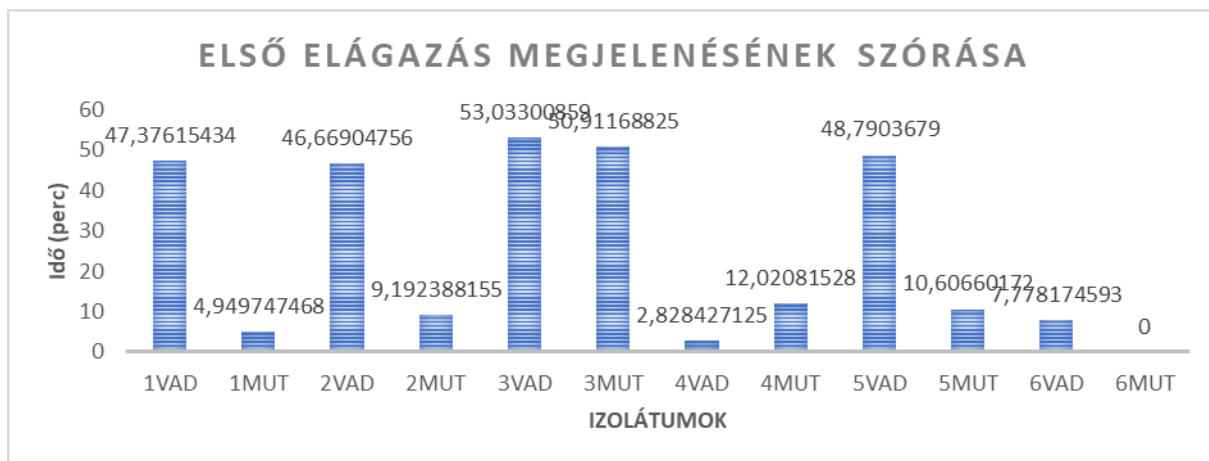
A hifa első elágazásának átlagos ideje a virulencia másik alapvető tényezője. A 6MUT kódjelű mutáns nem elemezhető. Ennél a vizsgálatnál is fordított arányosság áll fenn, tehát minél kisebb az hifa első elágazásának ideje, annál nagyobb a fertőzési potenciálja.

Az hifa első elágazásának átlagos ideje alapján a virulenciafaktor leírása csökkenő sorrendben:

4MUT	3VAD	1VAD	1MUT	2VAD	4VAD	3MUT	5VAD	6VAD	2MUT	5MUT
116,3	122,8	128,6	131,4	135,1	152,7	163,2	178,8	197,9	198,9	203,8



A vizsgálatból kiderül, hogy a hifa első elágazásának ideje alapján a legvirulensebb izolátumok a következők: az 59 éves nő sebváladékából vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (4MUT), illetve 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátum (3VAD). Ezzel szemben a legkevésbé virulens izolátumok a 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT) illetve a 34 éves férfi hasüri drain-jéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (5MUT).



32. ábra: Az első elágazás megjelenési idejének szórása

A hifa első elágazásának átlagos szórásából kiderül, hogy a vizsgált izolátumok hifái hogyan tudják érvényesíteni a hifázási képességüket. Minél kisebb a vizsgált izolátum szórásának ideje, annál egységesebb, ezáltal hatásosabb a hifázási dinamika.

Az első hifa elágazásának átlagos szórásánál a következő hifázási dinamikai sort tudjuk megállapítani:

Az hifa első elágazásának átlagos szórása alapján hifázási dinamikai sor leírása csökkenő sorrendben

3MUT	3VAD	5MUT	1MUT	2MUT	5VAD	1VAD	4MUT	6VAD	4VAD	2VAD
2,8284	4,9497	7,7781	9,1923	10,60	12,020	46,669	47,376	48,790	50,911	53,033
27	47	75	88	66	82	05	15	37	69	01



A vizsgálatból kiderül, hogy a hifa első elágazásának szórása alapján a legegységesebb hifázási dinamikával rendelkező izolátumok a következők: a 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (3MUT), illetve a 45 éves nő kanüljéből vett klinikai izolátum (3VAD). Ezzel szemben a legheterogénebb hifázási képességgel a következő izolátumok rendelkeznek: 59 éves nő sebváladékból vett klinikai izolátum (4VAD), illetve 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátum (2VAD).

5.5.2 Egyéni spóravizsgálatok

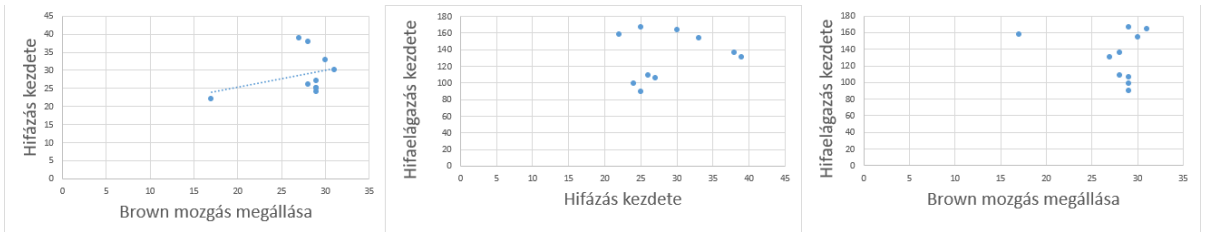
Az egyéni spóravizsgálatoknál a spórák dinamikáját hasonlítottuk össze 1 izolátumon belül a megadott paraméterek mentén. Elvégeztük a korrelációs számítást és a szignifikancia analízist is, hogy lássuk, van-e a 3 vizsgált paraméter között valamilyen összefüggés. Az eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.

1VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,634649	korrel	-0,16803		korrel	-0,21824
	tproba	0,000234	tproba	3,92E-05		tproba	8,03E-06
1MUT	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,299716	korrel	0,18017		korrel	-0,20937
	tproba	0,273098	tproba	5,84E-07		tproba	8,24E-07
2VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,299716	korrel	0,18017		korrel	-0,355
	tproba	0,273098	tproba	5,84E-07		tproba	0,000137
2MUT	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	-0,01323	korrel	0,039411		korrel	0,137883
	tproba	0,000146	tproba	5,18E-05		tproba	4,16E-09
3VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,528534	korrel	0,341904		korrel	0,307762
	tproba	0,001952	tproba	3,86E-07		tproba	1,26E-07
3MUT	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	-0,36579	korrel	0,281577		korrel	-0,47716
	tproba	0,000252	tproba	1,57E-05		tproba	9,97E-06
4VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,457781	korrel	0,341904		korrel	0,055393
	tproba	0,001283	tproba	3,86E-07		tproba	3,83E-11
4MUT	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,397522	korrel	0,189492		korrel	0,158477
	tproba	0,001155	tproba	6,78E-05		tproba	8,22E-06
5VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,712661	korrel	0,390494		korrel	0,231593
	tproba	0,003847	tproba	2,64E-05		tproba	2,05E-05
5MUT	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,404206	korrel	0,163443		korrel	0,275635
	tproba	0,028937	tproba	2,95E-07		tproba	3,83E-08
6VAD	Brown mozgás m	Hifázás kezdete	Hifázás kezdete	hifaelágazás kezdete		Brown mo	hifaelágazás kezdete
	korrel	0,82873	korrel	0,421725		korrel	0,083713
	tproba	0,001487	tproba	3,9E-06		tproba	4,13E-06
6MUT							

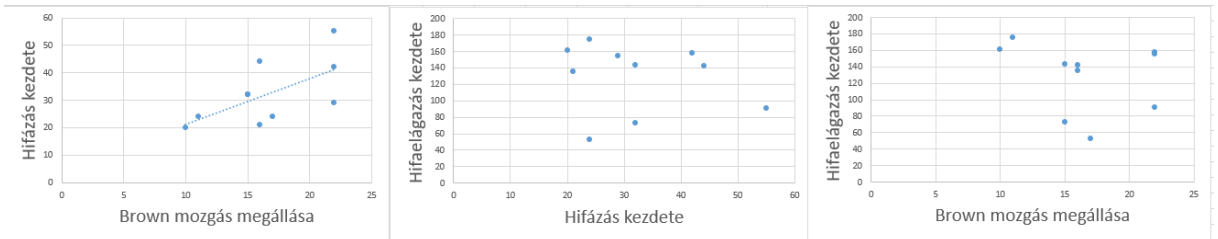
1. Táblázat: *Klinikai C. albicans* izolátumok korrelációja a vizsgált paraméterek függvényében

Az adatokat diagrammokon ábrázoltuk:

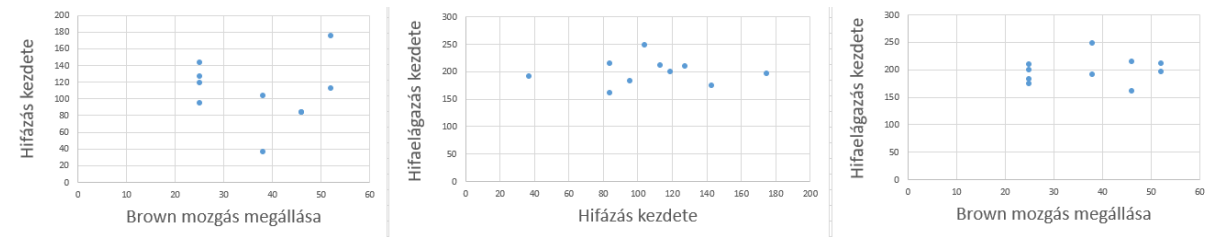
1VAD



1MUT



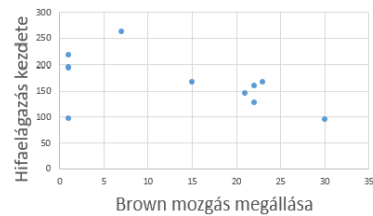
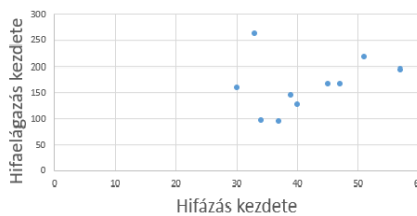
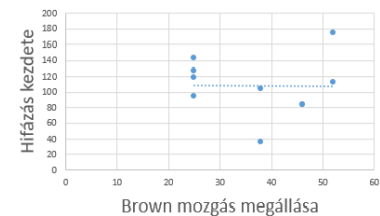
2VAD



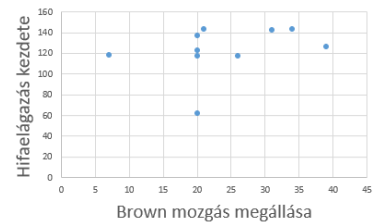
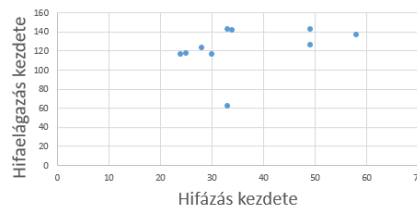
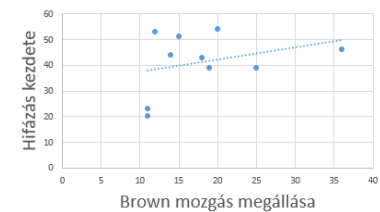
2MUT



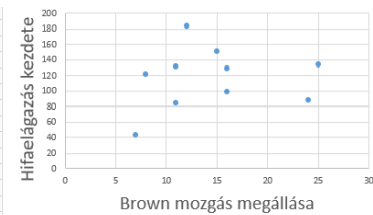
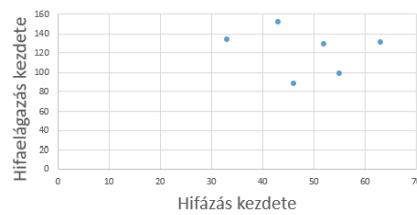
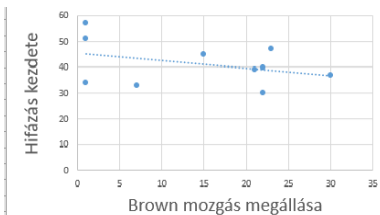
3VAD



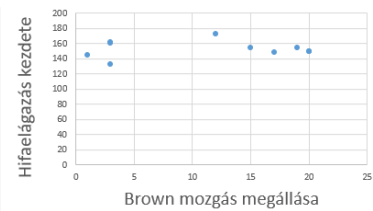
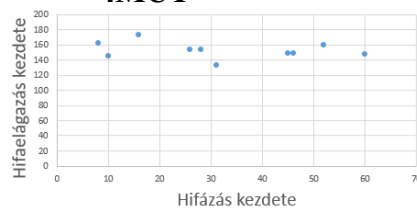
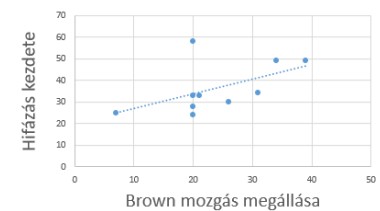
3MUT



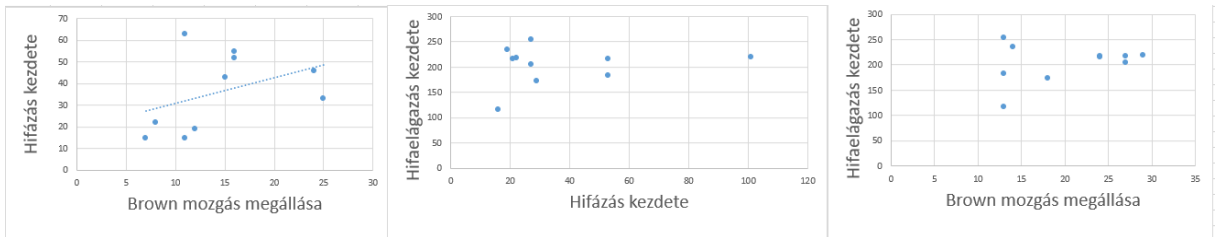
4VAD



4MUT



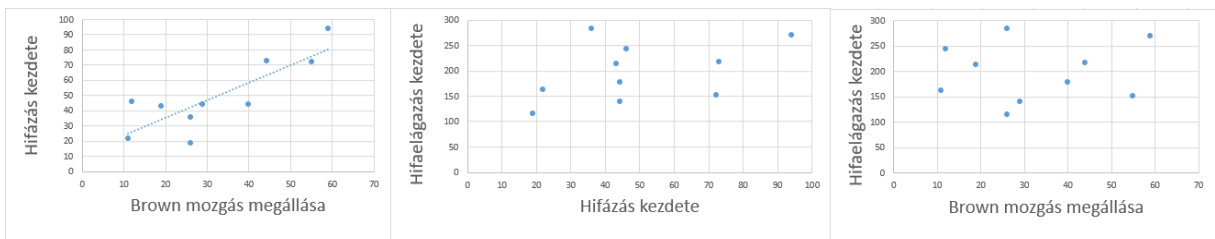
5VAD



5MUT



6VAD



33. ábra: A vizsgált izolátumok korrelációanalízise izolátumonként. A diagrammokon a vizsgált izolátumok spóráinak átlagos idejét vetettük össze.

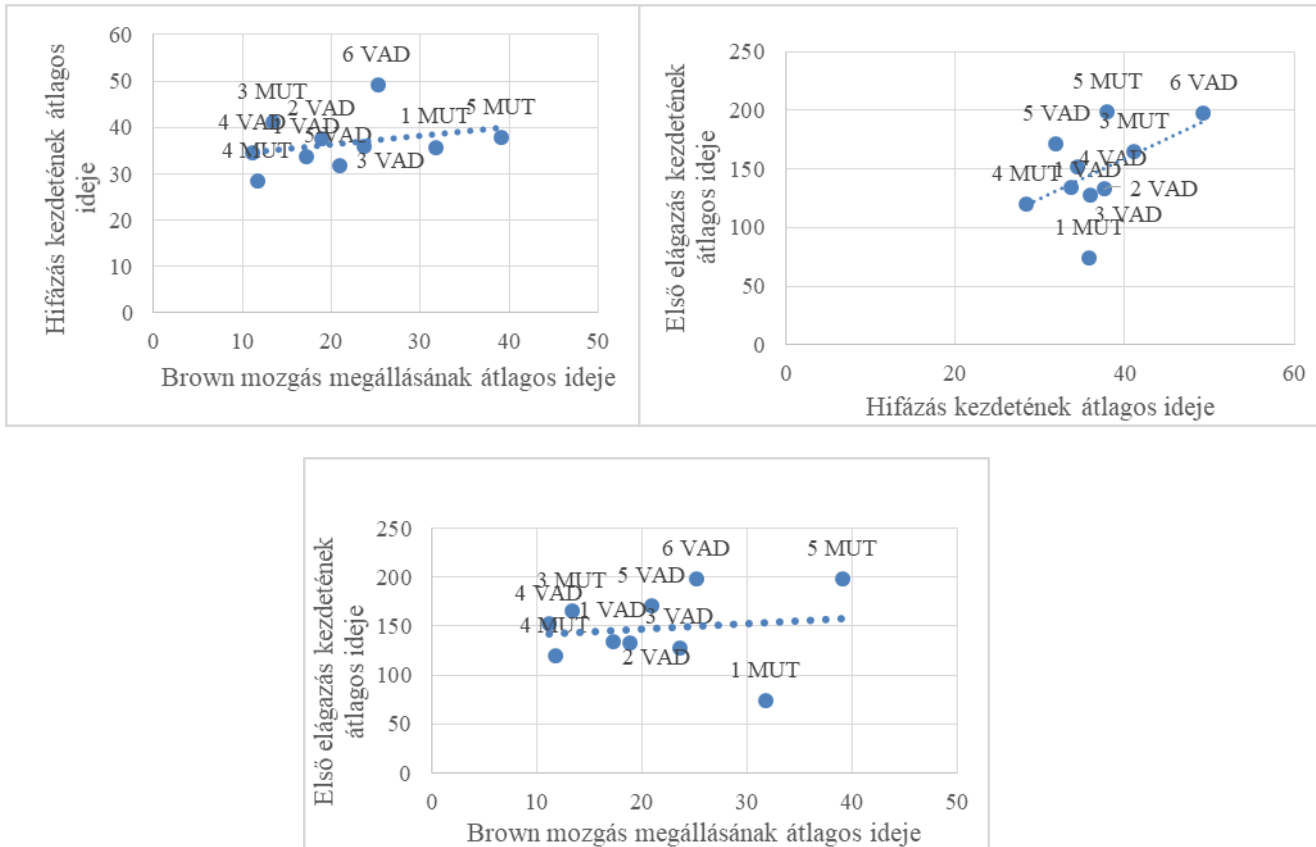
Az eredmények azt mutatják, - a vizsgált izolátumok többségénél - hogy a Brown mozgás megszűnésének ideje és a hifázás kezdete pozitív korrelációt mutat. Ezek szerint a vizsgálat kezdetéből származó artifaktok és a mintaeljárársbeli különbségek kizárhatók, ha a Brown mozgás megszűnésének időpontját, tehát a letapadást vesszük T0 időpillanatnak. Ez a metodika arra is használható, hogy rávilágítson olyan esetleges elváltozásokra, amelyek befolyásolhatják a letapadást, és a hifázás szinkronizációját. Ilyen esetekben a fent említett 2 vizsgált paraméter nem korrelál egymással (4MUT).

Ugyanezzel a módszerrel elvégeztük a korrelációs számítását, az egyes izolátumok között is. Az eredményeket a 2. táblázatban ábrázoltuk.

izolátum neve	brown mozgás megállása	első elágazás kezdete	hifázás kezdete
1 vad	17,22222222	134,777778	33,66666667
1 mut	31,77777778	73,6666667	35,77777778
2 vad	18,85714286	133,142857	37,57142857
2 mut	37,2	187,5	94,57142857
3 vad	23,63636364	128,181818	35,90909091
3 mut	13,375	165	41,125
4 vad	11,18181818	152,142857	34,45454545
4 mut	11,75	120	28,41666667
5 vad	20,875	171,25	31,875
5 mut	39,09090909	198,636364	37,88888889
6 vad	25,2	197,9	49,3
6mut			

2. Táblázat: A *Candida albicans* izolátumok vizsgált paramétereinek átlagos ideje

Az eredményeket diagrammon ábrázoltuk. A 2 MUT izolátum a magas hifázási idő miatt szórt adatot mutatott, ezért nem került bele a korrelációs számításba.



34. Ábra: A vizsgált izolátumok csoportos korrelációanalízise. A diagrammokon a vizsgált izolátumok átlagos idejét vetettük össze a megadott paraméterek alapján

A vizsgálatból kiderül, hogy mind a 3 vizsgált paraméter pozitív korrelációt mutat az izolátumok között.

5.6 Eredmények megbeszélése

5.6.1 Pulmonális aszpergillózis

Az *Aspergillus* fertőzés leggyakrabban krónikus tüdő, bronchopulmonáris aszpergillózis formájában jelentkezik (92,93,94). Vizsgálatainkból kiderült, hogy a pulmonális aszpergillózis kimutatására az általunk használt digitális képelemzési stratégia gyors és megbízható eszköznek bizonyult.

A leggyakrabban használt diagnosztikai paraméterek összehasonlítására törekedtünk (95,96,97). A hifális növekedés hasznos paraméternek bizonyult a pulmonális aszpergillózis dinamikájának digitális elemzésében.

Kimutattuk, hogy HC jelenlétében rövidebb hifák és alacsonyabb hifális sűrűségek keletkeztek, mint a CP jelenlétében. A CP-vel kezelt állatok tüdejében a fertőzött plakkok és az átlagos pulmonális plakkok átmérője nagyobb volt, mint a HC kezelés után. A HC-vel kezelt egerekben a neutrofilek korlátozzák a gombafejlődést a tüdő parenchymában, ezáltal csökken a konídiák csírázása és a hifák növekedése. A keringő neutrofilek száma párhuzamosan nőtt a plazma kortizol szintjével.

A tüdő szövettani metszeteiben a tüdő parenchymában megfigyelhető a hifális invázió és a hifák betörése az érbe. Az első hifák a tüdőben 12 órával a fertőzés után láthatók. A hifák párhuzamosan nőttek az endotélium falával. 96 óra után a tüdő parenchymában aszpergillómák láthatók, amik az alveolusokat összepréselték és folyadékkal töltötték ki. Az aszpergillózis során az *A. fumigatus*-szal szemben a legérzékenyebbnek a tüdő bizonyult, mindamelllett ritkábban, de agyi aszpergillózis is megfigyelhető volt.

A proximális tubulusokban degradáció látható, és a proximális tubulusokban PAS-festéssel (nem ábrázolt) fehérjék felhalmozódását észleltük. Ezen felül a proximális tubulusokban citoplazma degradáció és protein akkumuláció figyelhető meg PAS festést követően. Azonban ez a relatíve enyhe toxikusság a CP hatása alatt alakul ki, nem az *A. fumigatus* indukálta az irodalmi adatok alapján (98,99,100).

A konídiák csírázása döntő fontosságú az invazív aszpergillózis progressiójában (101,102,103,104). Bár a belső kapilláris endotélisejtek nagyobb permeabilitást biztosíthatnak, de csak kisebb molekulák esetén, nem a konídiák vagy a hifák esetében.

Tüdő aszpergillózis során szövettani változásokat figyeltünk meg a májban, de ezek a kóros elváltozások a CP hepatotoxicitásának tulajdoníthatók.

5.6.2 Mycoplasma fertőzés time-lapse mikroszkópos kimutatása

Kutatásaink igazolták, hogy time-lapse képelemzési stratégiánk egy kényelmes, megbízható eszköz a *Mycoplasma* fertőzések vizsgálatához és azonosításához. Az egyik fő előnye a time-lapse mikroszkópiának az, hogy a fertőzött sejt kultúrák jellegzetes régiói megfigyelhetők hosszabb ideig, lehetővé téve az *in vitro* evolúciós megfigyeléseket több generációs fertőződésére nézve.

A Time-lapse mikroszkópia digitális képelemzéssel kombinálva, nem csak a *Mycoplasma* fertőzés felismerésére szolgál. Lehetővé tette azt is, hogy megkülönböztethetők legyenek a morfológiai átmenetek, valamint ismertethetők legyenek a *Mycoplasma* fertőzés parazitikus terjedésének főbb lépései, függetlenül a sejt típusától. A képelemző technikánk egyértelműen bebizonyította, hogy a *Mycoplasma* fertőzés külön fázisokra osztható, amelyek kapcsolódnak a sejt kultúrák morfológiai változásaihoz:

1) A *Mycoplasma* fertőzés utáni első pár óra fokozza a változásokat a fertőzött sejtek morfológiájában, ezek az adhézión tulajdonságokkal és a fertőzött sejtek mozgékonyágával hozhatók kapcsolatba.

2) A sejtek felválása jelezte a második fázis kezdetét. Ez figyelhető meg az adhézión kapcsolat elvesztésénél. Annak ellenére, hogy jelentős különbségek vannak a leválás időbeli megjelenései között a különböző sejt típusokban, egy explicit késedelemmel a tumor sejt vonalakban időbeli eltolódás van a leválás és a *Mycoplasma* aggregátum képződés között (10 - 12 h), ami viszonylag állandó és független a sejt típustól.

3) A sejt pusztulás jelezte a *Mycoplasma* fertőzés harmadik fázisának kezdetét. Tömeges sejt halál és nekrozis vált láthatóvá fénymikroszkópiával. Mivel az első két fázisban a fertőzés felhasználhatta a fogadó sejt biológiai energiáját, a harmadik fázist a túlélő elemek megjelenésével lehetett jellemezni, mint például a sejt aggregátumokkal, hogy megvédjék a mikroorganizmusokat.

4) Az utolsó fázisban a biofilm szétesett -ez látható volt mikroszkóp alatt- összezsugorodott és megrepedezett, ez a *Mycoplasma* fertőzés másik jellegzetes vonása.

Az eredmények arra utalnak, hogy a fertőzött sejt kultúrákból származó információk megszerezhetők, mielőtt a *Mycoplasma* fertőzés a sejteknél láthatóvá válik. Ez magában foglalja az első két fázist, hagyva egy 12 órás idő-ablakot a kritikus információk megszerzésére a *Mycoplasma* fertőzött elsődleges sejt kultúrákból.

5.6.3 Hifa elágazás megjelenése és gátlása antimikotikumokkal

Az első elágazás megjelenését csak a kontroll tenyészet esetében tudtuk detektálni. Ezért az elágazások összehasonlítása a virulenciafaktor tekintetében ebben a kísérletben nem releváns. VRC-kezelés nem gátolta a csírázást és a hifák növekedését, de gátolta az elágazást. Az AMB kezelés már blokkolta a csírázást és a hifakinövést is. Ezen faktorok elemzése dinamikus képelemzési szempontból a hatóanyag kutatások egyik alapvető faktora lehet, ami a patogén fonalas gomba izolátumok izolátumok letapadási és fertőzési dinamikájának vizsgálata során fontos lehet.

A Brown mozgás megszűnése a felülethez való letapadás indikátora (105,106,107). Amikor a gombaellenes szerek hatását vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt anyagok csökkentik a Brown mozgás megszűnésének idejét a kontroll tenyészetekhez képest, ezáltal növelik a letapadási dinamikát. Az általunk használt gombaellenes szerek (AMB, VRC) koncentrációi nem gátolták az adhéziót. Az AMB blokkolja a csírázást és a hifa növekedést, a vorikonazol a csírázást nem gátolta, de a hifázást igen. Ennek a jelenségnek a magyarázata az lehet, hogy a kontrollhoz képest korábbi letapadás a gombák védekező mechanizmusa lehet a számukra toxikus anyaggal szemben. Bom és munkatársai azt találták, hogy a Δ sitA mutáns csökkent adhéziós és biofilm képzési potenciállal rendelkezik (108).

Amikor követtük a hifák növekedését, azt tapasztaltuk, hogy a vorikonazol kezelés késleltette a hifázást. Ennek oka lehet a vorikonazol ergosterol szintézis gátló hatása.

A hifa elágazást csak kontroll konídiáknál vizsgálhattuk, mivel a vorikonazol blokkolja az elágazást. Lamerre és munkatársai 2009-ben kimutatták, hogy az udm fehérjék hatással vannak az *Aspergillus fumigatus* hifa elágazására (109).

Az AMB-vel kezelt konídiák korábban tapadtak a felszínre, de a csírázás, a hifák megnyúlása és az elágazás gátlódott. Tehát az AMB alkalmas a már kialakult mikózis kezelésére, de profilaxisban kevésbé használható.

5.6.4 Klinikai *C. albicans* izolátumok

Az összesített spóravizsgálatoknál elmondható, hogy a kifejlesztett metodikával le tudjuk írni és össze tudjuk hasonlítani a vizsgált izolátumok következő paramétereit:

- letapadási faktor
- letapadási dinamika

- fertőzési faktor
- fertőzési dinamika
- hifaelágazási faktor
- hifaelágazási dinamika

Az egyes spórávizsgálatoknál elmondható, hogy a kifejlesztett metodikával le tudjuk írni és össze tudjuk hasonlítani a vizsgált izolátumok dinamikus paramétereinek korrelációját és szignifikanciáját, ezáltal létrehoztunk egy olyan metodikai analízist, ahol nemcsak az egyes izolátumok közötti különbségek összehasonlítására van lehetőség, de az izolátumon belüli populáció szintű változásokat is vizsgálhatjuk.

Az izolátumok csoportos korrelációanalízise kimutatta a pozitív korrelációt a vizsgált paraméterek között. Mivel az irodalom a hifázást, mint a patogenitás egyik alapvető faktorát írja le (95,96,97), vizsgálatunk bizonyíték arra, hogy a Brown mozgás megszűnésének és a hifaelágazás kezdetének ideje is megfelelő dinamikus paraméter a patogenitás jellemzéséhez. Számos alkalommal vizsgálták már a Brown-mozgás megszűnését és még több alkalommal a hifázási dinamikát különböző paraméterek mentén. Vizsgálatunk azonban kimutatja, hogy a Brown-mozgás megszűnése és a hifaelágazás kezdetének ideje, mint a patogenitás vizsgálható paraméterei, új eredménynek számítanak a digitális képelemzési technológia terén.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A morfológiai adatokon alapuló rutinszerű detektálási stratégiákra továbbra is szükség van az alap és alkalmazott kutatási mikrobiológiai vizsgálatokban (105,106,107,108). A számítógépes képelemzés potens eszköz a cél elérésében. A kis mennyiségű hifa elemek részletes elemzése mind a sült, mind pedig a szilárd fázisú tenyésztési rendszerek estében hozzájárulhat az apikális növekedési folyamatok megértéséhez.

Ebben a tanulmányban egy új rendszert mutattunk be a spóra és a hifa morfológiai, mennyiségi elemzésére. Az eljárás feleslegessé teszi, hogy viszonylag drága kereskedelmi képelemző szoftvereket kelljen megvásárolni, helyette a nyilvánosan elérhető ImageJ platform hasznosítását javasoljuk, amelynek használhatóságát bizonyítja az értekezés. A létrehozott modell pontosítása, finomítása folyamatban van, de a bemutatott, eddig kapott vizsgálati adatok alapján a módszer használhatósága bizonyítást nyert.

A különböző tulajdonsággal rendelkező kísérleti fajok/törzsek felhasználása bizonyítja, hogy ezen képelemzési módszer alkalmas mindenfajta statikus és dinamikus mikroszkópos vizsgálatra, a gomba korai stádiumú fejlődésének tanulmányozásához. Az összes képelemző rendszerhez hasonlóan az itt leírt analitikai algoritmusok eredményei is a jó minőségű bemeneti képektől függenek, és érzékenyek a magasabb szintű artifaktumokra, amely akkor következhet be, ha nagy mennyiségű üledék van jelen a tenyésztés során alkalmazott oldatokban. A képelemző rendszer számára némi nehézséget okoz a "fiatal" hifák (a közelmúltban csíráztatott spórák) és a spóra csomók megkülönböztetése a morfológiai hasonlóságuk miatt, a vetített terület és a körköröség tekintetében (közelítőleg 0,4-0,8 cirkuralitási tartományban). Emiatt a fiatal hifák és spóra csomók általában el vannak különítve az elemzésben.

Annak érdekében, hogy a spórából hifába való átmenet teljesen leírható legyen, továbbfejlesztettük rendszerünket, amellyel már képesek vagyunk különbséget tenni ezen objektumok között.

Képelemző rendszerünk feldolgozási ideje kb. 1 s képenként (1640×1480 képpont/pixel) ami lehetővé teszi a gomba morfológiájának gyors számszerűsítését. A nagy mennyiségű kép elemzése és a későbbi kvantifikációja, mint például a spóraduzzadási sebesség, a hifális növekedési sebesség és a hifa elágazási arány néhány perc alatt vizsgálható.

7. KONKLÚZIÓ

Tekintettel arra, hogy az antibiotikum fejlesztésben és az ipari gomba fermentációs folyamatokban nagy jelentősége van a morfológia és a patogenitás/produktivitás között fellelhető kapcsolatnak, szükség van automata képanalitikus technikák kifejlesztésére, hogy pontos és gyors meghatározás legyen elérhető ezen alapvetően bioprocess jellegek mérésére. Bár az utóbbi években óriási előrelépés történt ezen a területen, a legtöbb technika specifikus az adott kultúrákra nézve.

Ezen vizsgálatok régóta folynak a világban, de többnyire költséges, sokszor konfokális mikroszkópiát igénylő módszerek. A disszertációban bemutatott képelemzési módszerek és technikáknoninvazív módon, minimalizált fototoxicitás mellett könnyen kivitelezhetőek és viszonylag kis költségvetést igényelnek, pontosan ebben rejlik az újszerűségük.

Az itt bemutatott módszerek lehetővé teszik a korai gombafejlődés nagy felbontású vizsgálatát a leoltás időpontjától kezdve. Remélhetőleg ennek a technikának a használata a gomba növekedési kinetikájának és a makro-morfológiai formákhoz való viszonyának, valamint az ipari fermentációs folyamatokban való produktivitásának jobb megértését fogja eredményezni.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gregor y B. Daniel; Digital imaging; Vet Clin Small Anim ; 2009.
2. Dr. Rövid András; A gépi látás és képfeldolgozás párhuzamos modelljei és algoritmusai; 2014.
3. Daniel GB; Digital imaging processing; book of veterinary nuclear medicine 2006.

4. Beksac MS, Eskiizmirli S, Cakar AN, Erkmen AM, Dagdeviren A, Lundsteen C: An expert diagnostic system based on neural networks and image analysis techniques in the field of automated cytogenetics. *Technology and health care: official journal of the European Society for Engineering and Medicine* 3(4):217-29 1996.
5. Bouzin C, Saini ML, Khaing KK, Ambroise J, Marbaix E, Gregoire V, Bol V: Digital pathology: elementary, rapid and reliable automated image analysis. *Histopathology* 68(6):888-96 doi:10.1111/his.12867 , 2016.
6. Hamilton PW, Bankhead P, Wang Y, Hutchinson R, Kieran D, McArt DG, James J, Salto-Tellez M (2014) Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods (San Diego, Calif)* 70(1):59-73 doi:10.1016/j.ymeth. 2014.
7. Khan MB, Lee XY, Nisar H, Ng CA, Yeap KH, Malik AS: Digital image processing and analysis for activated sludge wastewater treatment. *Advances in experimental medicine and biology* 823:227-48 doi:10.1007/978-3-319-10984-8_13, 2015.
8. MacDonald G: Why Do We Need Image Processing? *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* 24(Suppl):S9-S9, 2013.
9. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature methods* 9(7) doi:10.1038/nmeth. 2018
10. Schneider CA: NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *9(7):671-5* 2012
11. Wienert S, Heim D, Kotani M, Lindequist B, Stenzinger A, Ishii M, Hufnagl P, Beil M, Dietel M, Denkert C, Klauschen F: CognitionMaster: an object-based image analysis framework. *Diagnostic pathology* 8:34 doi:10.1186/1746-1596-8-34, 2013.
12. Szilágyi-Bónizs Melinda: Az *Aspergillus nidulans* autolitikus enzimtermelésének vizsgálata. 2012
13. Fields S, Johnston M: Cell biology. Whither model organism research. *Science* march, 2015
14. Fekete Erzsébet: Az *Aspergillus Nidulans* gomba laktóz és galaktóz anyagszerkezetének jellemzése és szabályozása 2007

15. Tóth Viktória: Az *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs jellemzése, e.chinocandin B és szterigmatocisztin termelésének vizsgálata; 2012
16. Karaffa Levente, Fekete Erzsébet: Az arabinóz és a laktóz metabolizmus kölcsönhatásainak vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban; 2008
17. Maria V. Bandres; *Aspergillus fumigatus*; Sandeep Sharma, Baptist Regional Medical Center 2010
18. Frank L. van de Veerdonk, Mark S. Gresnigt, Luigina Romani, Mihai G. Netea & Jean-Paul Latgé: *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions; *Nature Reviews Microbiology* 2017
19. Anne Beauvais, Thierry Fontaine, Vishukumar Aimanianda , Jean-Paul Latgé: *Aspergillus* Cell Wall and Biofilm; Springer Science+Business Media Dordrecht 2014
20. Ildnay de Souza Lima Brandão a, Heloiza Maria da Silva Oliveira-Moraes b, Cristina Maria de Souza Mottac , Neiva Tinti de Oliveirac, Oliane Maria Correia Magalhães a,: Elastin increases biofilm and extracellular matrix production of *Aspergillus fumigatus*; *Brazilian journal of microbiology* 2018
21. Yake Yao, PhD,a Hua Zhou, PhD,a Yihong Shen, MD,a Qing Yang, MD,b Jian Ye, MD,c Guohua Lu, MD,a Yiqi Fu., PhD,a Haiyan Lou, MD,d Yunsong Yu, MD,e and Jianying Zhou, MDa: Evaluation of a commercial quantitative *Aspergillus fumigatus*-specific IgM assay for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis; *Medicine*, December 2017
22. Bharat Singh¹, Seema Singh¹, Abdul R. Asif², Michael Oellerich², G. L. Sharma; Allergic aspergillosis and the antigens of *Aspergillus fumigatus*; August 2014
23. Nicola L. D. Overton, Axel A. Brakhage, Andreas Thywissen, David W. Denning, Paul Bowyer; Mutations in EEA1 are associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and affect phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* by human macrophages. March 16, 2018
24. Ronen Ben-Ami, Russell E. Lewis and Dimitrios P. Kontoyiannis: Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection; *Br J Haematol*; Aug 2010

25. Crabbe, A. et al.: Spaceflight enhances cell aggregation and random budding in *Candida albicans*; PloS one; 2013.
26. Mitchell, A.P.: Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. Current opinion in microbiology; 1998.
27. Chandra, J. & Mukherjee, P.K.: *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance; Microbiology spectrum; 2015.
28. Hull, C.M., Raisner, R.M. & Johnson, A.D.: Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. Science; 2000.
29. Rustad, T.R., Choiniere, J.H., Howard, D.H. & White, T.C.: The *Candida albicans* mating type like locus [MTL] is not involved in chlamydospore formation.; Medical mycology; 2006.
30. McManus, B.A. & Coleman, D.C.: Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. Infection, genetics and evolution; journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases; 2014.
31. Bennett, R.J.: The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. Current opinion in microbiology; 2015.
32. Mayer, F.L., Wilson, D. & Hube, B.: *Candida albicans* pathogenicity mechanisms; Virulence; 2013.
33. Romani, L., Bistoni, F. & Puccetti, P.: Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts; Current opinion in microbiology; 2003.
34. Sudbery, P., Gow, N. & Berman, J.: The distinct morphogenic states of *Candida albicans*; Trends in microbiology; 2004.
35. Laprade, L., Boyartchuk, V.L., Dietrich, W.F. & Winston, F.: Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence; Genetics; 2002.
36. Klein, B.S. & Tebbets, B.: Dimorphism and virulence in fungi; Current opinion in microbiology; 2007.
37. Lu, Y., Su, C. & Liu, H.: *Candida albicans* hyphal initiation and elongation; Trends in microbiology; 2014.

38. Taschdjian, C.L., Burchall, J.J. & Kozinn, P.J.: Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes; *A.M.A. journal of diseases of children*; 1960.
39. Buffo, J., Herman, M.A. & Soll, D.R.: A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*; *Mycopathologia*; 1984.
40. Lu, Y., Su, C., Wang, A. & Liu, H.: Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance; *PLoS biology*; 2011.
41. Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X. & Kumamoto, C.A.: Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene; *Molecular microbiology*; 1999.
42. Miller, M.G. & Johnson, A.D: White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating; *Cell*; 2002.
43. Bottcher, B., Pollath, C., Staib, P., Hube, B. & Brunke, S.: *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamydospore Formation; *Frontiers in microbiology*; 2016.
44. Staib, P. & Morschhauser, J.: Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme; *Mycoses*; 2007.
45. Whiteway, M. & Bachewich, C.: Morphogenesis in *Candida albicans*; *Annual review of microbiology*; 2007.
46. Nicholls, S. et al.: Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*; *Fungal genetics and biology*; 2011.
47. Berman, J. & Sudbery, P.E: *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast; *Nature reviews*; 2002.
48. Saville, S.P., Lazzell, A.L.; Monteagudo, C. & Lopez-Ribot, J.L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection; *Eukaryotic cell*; 2003.
49. Verstrepen, K.J. & Klis, F.M.: Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts; *Molecular microbiology*; 2006.

50. Murciano, C. et al.: Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions; PLoS one; 2012.
51. Wachtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F. & Hube, B.: From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells; PLoS one; 2011.
52. Cheng, G. et al.: Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis; Infection and immunity; 2005.
53. Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L. & Sundstrom, P.: Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1; Science; 1999.
54. Nobile, C.J. et al.: Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation; Current biology; 2008.
55. Kumamoto, C.A.: Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing; Nature reviews; 2008.
56. Wachtler, B. et al.: *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process; PLoS one; 2012.
57. Fanning, S. & Mitchell, A.P.: Fungal biofilms; PLoS pathogens; 2012.
58. Uppuluri, P. et al.: Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle; PLoS pathogens; 2010.
59. Robbins, N. et al.: Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms; PLoS pathogens; 2011.
60. Renaudin J., Marais A., Verdin E., Duret S., Foissac X., Laigret F., Bove J.M.: Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*; J. Bacteriol; 1995
61. Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L. et al.: A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification; J. Bacteriol; 1989.
62. Herrmann R., Genome structure and organization, in: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., Baseman J.B. (Eds.): Mycoplasmas -Molecular Biology and Pathogenesis; American Society for Microbiology; 1992.

63. Rottem S, Barile MF.: Beware of mycoplasmas; Trends Biotechnol; 1993.
64. Miyazaki K, Takaku H, Umeda M, Fujita T, Huang WD, Kimura T, Yamashita J, Horio T. Potent: growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a Mycoplasma-infected cell line; Cancer Res; 1990.
65. Pollack JD, Williams MV, McElhaney RN.: The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells; Crit Rev Microbiol; 1997.
66. Rottem S, Barile MF.: Beware of mycoplasmas; Trends Biotechnol; 1993.
67. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety; Emerg Infect Dis; 1997.
68. Nicolson GL, Gan R, Haier J.: Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: association with signs and symptoms.; APMIS; 2003.
69. Copperman R, Morton HE.: Reversible inhibition of mitosis in lymphocyte cultures by non-viable Mycoplasma, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.; Proc Soc Exp Biol Med; 1966.
70. Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A.: Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. Trends Microbiol 1999
71. D'Orazio JA, Cole BC, Stein-Streilein J.: Mycoplasma arthritis mitogen up-regulates human NK cell activity. Infect Immun 1996.
72. Razin S, Yogev D, Naot Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas; Microbiol Mol Biol Rev; 1998.
73. Robinson LB, Wichelhausen RH. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms; Science; 1956.

74. D. McMullan: Scanning Electron Microscopy 1828-1965 (angol nyelven). SCANNING / Foundation for Advances of Medicine and Science, 1993.

75. Mac Aree E. „Le stéréoscan. Premier microscope électronique à balayage”. J. Microscopie, 1968.

76. Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János: Orvosi biofizika, 2. kiadás, Budapest: Medicina Kiadó, 2006.

77. The principles of SEM and Microanalysis, Graz University of Technology, 2012.

78. Laczkó, J., Varga, S.. „A SEM alkalmazása az orvosi és biológiai kutatásban” X. Magyar Elektronmikroszkópos Konferencia, 1978.

79. Laczkó Jenő, Varga Sándor. Csaba György: Pásztázó (scanning) elektronmikroszkópos vizsgálómódszerek, A biológia aktuális problémái, Medicina, 127-162. o. (1979). ISBN 963-240-647-8, 1979.

80. Baratt RW, Johnson GB, Ogata WN: Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*; Genetics; 1965.

81. Balazs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter E, Emri T, Miskei M, Olah J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M, Pócsi I: AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*; Mol Gen Genomic; 2010.

82. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line; J Cell Biol; 1988.

83. Boukamp P, Stanbridge EJ, Foo DY, Cerutti PA, Fusenig NE.: C-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy; Cancer Res; 1990.

84. Kemeny-Beke A, Berenyi E, Facsko A, Damjanovich J, Horváth A, Bodnár A, et al: Antiproliferative effect of 4-thiouridylate on OCM-1 uveal melanoma cells; Eur J Ophthalmol; 2006.

85. Kan-Mitchell J, Mitchell MS, Rao N, Liggett PE: Characterization of uveal melanoma cell lines that grow as xenografts in rabbit eyes; *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 1989.
86. Walther EK, Dahlmann N, Gorgulla HT.: Tumor markers in the diagnosis and followup of head and neck cancer; 1993.
87. Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Pocs I, Dombradi V, et al.: Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains.; *Appl Microbiol Biotechnol*; 2014.
88. Larkin E1, Hager C1, Chandra J1, Mukherjee PK1, Retuerto M1, Salem I1, Long L1, Isham N1, Kovanda L2, Borroto-Esoda K3, Wring S3, Angulo D3, Ghannoum M4. Deacon, J. W.: The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation; *Modern mycology*. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom; 1997
89. P. Löw, K. Molnár, G. Kriska. *Atlas of Animal Anatomy and Histology*; pp 413, Eur 145.59, ISBN: 978-3-319-25170-7. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. 2016
90. Pavlova OM, Lyashko OG, Leontiyeva IV, Bykov VL. Experience in teaching the discipline "Histology, Embryology, Cytology - Histology of the Oral Cavity; *Morfologiya*.;148(4):78-81. 2015
91. Chen VS^{1, 2}, Morrison JP^{3, 2}, Southwell MF⁴, Foley JF⁵, Bolon B⁶, Elmore SA⁴. *Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5*.; *Toxicol Pathol*. 2017 Aug;45(6):705-744. doi: 10.1177/0192623317728134. 2017
92. Agarwal R¹, Sehgal IS¹, Dhooria S¹, Aggarwal AN¹. Developments in the diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis.; *Expert Rev Respir Med*. 2016 Dec;10 (12):1317-1334. Epub 2016 Nov 7.
93. Muldoon EG¹, Strek ME², Patterson KC³. Allergic and Noninvasive Infectious Pulmonary Aspergillosis Syndromes.; *Clin Chest Med*. 2017 Sep;38(3):521-534. doi: 10.1016/j.ccm.2017.04.012. Epub 2017 Jun 12.
94. Levesque E^{1,2}, Ait-Ammar N^{3,4}, Dudau D⁵, Clavieras N⁵, Feray C⁶, Foulet F⁴, Botterel F^{3,4}. Invasive pulmonary aspergillosis in cirrhotic patients:

analysis of a 10-year clinical experience.;Ann Intensive Care. 2019 Feb 18;9(1):31. doi: 10.1186/s13613-019-0502-2.

95. Sharma J¹, Rosiana S², Razzaq I³, Shapiro RS⁴. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens.;J Fungi (Basel). 2019 Feb 21;5(1). pii: E17. doi: 10.3390/jof5010017.

96. Luna-Tapia A¹, DeJarnette C², Sansevere E¹, Reitler P², Butts A1, Hevener KE3, Palmer GE4. The Vacuolar Ca²⁺ ATPase Pump Pmc1p Is Required for *Candida albicans* Pathogenesis.; mSphere. 2019 Feb 6;4(1). pii: e00715-18. doi: 10.1128/mSphere.00715-18.

97. Benzaid C^{1,2}, Belmadani A³, Djeribi R4, Rouabhia M⁵. The Effects of *Mentha × piperita* Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the Expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes.; Antibiotics (Basel). 2019 Jan 30;8(1). pii: E10. doi: 10.3390/antibiotics8010010.

98. Ahlmann M¹, Hempel G². The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy.;Cancer Chemother Pharmacol. 2016 Oct;78(4):661-71. doi: 10.1007/s00280-016-3152-1. Epub 2016 Sep 19.

99. Kim J¹, Chan JJ¹. Cyclophosphamide in dermatology.;Australas J Dermatol. 2017 Feb;58(1):5-17. doi: 10.1111/ajd.12406. Epub 2016 Jan 24.

100. Moore MJ¹. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide.;Clin Pharmacokinet. 1991 Mar;20(3):194-208.

101. Thakur R¹, Shankar J². Proteome Profile of *Aspergillus terreus* Conidia at Germinating Stage: Identification of Probable Virulent Factors and Enzymes from Mycotoxin Pathways.;Mycopathologia. 2017 Oct;182(9-10):771-784. doi: 10.1007/s11046-017-0161-5. Epub 2017 Jun 24.

102. Ma W¹, Zhao L¹, Zhao W¹, Xie Y¹. (E)-2-Hexenal, as a Potential Natural Antifungal Compound, Inhibits *Aspergillus flavus* Spore Germination by Disrupting Mitochondrial Energy Metabolism.;J Agric Food Chem. 2019 Jan 30;67(4):1138-1145. doi: 10.1021/acs.jafc.8b06367. Epub 2019 Jan 16.

103. Richard N¹, Marti L¹, Varrot A², Guillot L¹, Guitard J^{1,3}, Hennequin C^{1,3}, Imberty A², Corvol H^{1,4}, Chignard M¹, Balloy V⁵. Human Bronchial Epithelial Cells Inhibit *Aspergillus fumigatus* Germination of Extracellular

Conidia via FleA Recognition.;Sci Rep. 2018 Oct 24;8(1):15699. doi: 10.1038/s41598-018-33902-0.

104 Gago S¹, Overton NLD^{1,2}, Ben-Ghazzi N¹, Novak-Frazer L^{3,4}, Read ND¹, Denning DW⁵, Bowyer P⁶. Lung colonization by *Aspergillus fumigatus* is controlled by ZNF77.;Nat Commun. 2018 Sep 20;9(1):3835. doi: 10.1038/s41467-018-06148-7.

105. Kurucz V¹, Kiss B¹, Szigeti ZM¹, Nagy G¹, Orosz E¹, Hargitai Z², Harangi S³, Wiebenga A⁴, de Vries RP⁴, Pócsi I¹, Emri T¹. Physiological background of the remarkably high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain.;J Basic Microbiol. 2018 Nov;58(11):957-967. doi: 10.1002/jobm.201800200. Epub 2018 Aug 31.

106. Schneider G¹, Szentes N², Horváth M¹, Dorn Á¹, Cox A³, Nagy G¹, Doffkay Z⁴, Maróti G⁵, Rákhely G^{4,6}, Kovács T³. Kinetics of Targeted Phage Rescue in a Mouse Model of Systemic *Escherichia coli* K1.; Biomed Res Int. 2018 Jul 11;2018:7569645. doi: 10.1155/2018/7569645. eCollection 2018.

107. Nagy G¹, Baksa V², Kiss A², Turani M², Banfalvi G². Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure.;Apoptosis. 2017 Feb;22(2):188-199. doi: 10.1007/s10495-016-1311-9.

108. Bom VL¹, de Castro PA¹, Winkelströter LK¹, Marine M¹, Hori JI¹, Ramalho LN², dos Reis TF¹, Goldman MH³, Brown NA¹, Rajendran R⁴, Ramage G⁴, Walker LA⁵, Munro CA⁵, Rocha MC⁶, Malavazi I⁶, Hagiwara D⁷, Goldman GH⁸. The *Aspergillus fumigatus* sitA Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence. Eukaryot Cell. 2015 Aug;14(8):728-44. doi: 10.1128/EC.00008-15. Epub 2015 Apr 24.

109. Lamarre C, Beau R, Balloy V, Fontaine T, Wong Sak Hoi J, Guadagnini S, Berkova N, Chignard M, Beauvais A, Latgé JP. Galactofuranose attenuates cellular adhesion of *Aspergillus fumigatus*.;Cell Microbiol. 2009 Nov;11(11):1612-23. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01352.x. Epub 2009 Jun 26.

Wolfgang Hüttel, 1 Loubna Youssar,1,2 Björn A. Grüning,3,4 Stefan Günther,3and Katharina G. Hugentobler Echinocandin B biosynthesis: a biosynthetic cluster from *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 and reassembly of the subclusters Ecd and Hty from *Aspergillus pachycristatus* NRRL 11440 reveals a single coherent gene cluster. BMC Genomics. 2016; 17: 570.

9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban

1. Máthéné Szigeti, Z., **Tálas, L.**, Palicz, Z., Szentesi, P., Hargitai, Z., Csernoch, L., Balla, J., Pócsi, I., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: Murine model to follow hyphal development in invasive pulmonary aspergillosis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102 (6), 2817-2825, 2018. ISSN: 0175-7598. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-8800-4> IF: 3.34 (2017)

2. **Tálas, L.**, Bánfalvi, G., Fidrus, E., Máthéné Szigeti, Z., Szemán-Nagy, G.: Mycoplasma infection followed by time-lapse microscopy. Med. Hypotheses. 108, 154-158, 2017. ISSN: 0306-9877. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2017.09.004> IF: 1.12

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban

3. Pfliegler, V. P., **Tálas, L.**, Báthori, F., Tartally, A., Pócsi, I., Szemán-Nagy, G.: Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on *Rickia wasmannii* Cavara (Ascomycota: Laboulbeniales) Infecting *Myrmica scabrinodis* Nylander (Formicidae) Ants. Sociobiology. 63 (2), 851-854, 2016. ISSN: 0361-6525. DOI: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v63i2.1049> IF: 0.699

4. Turáni, M., Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., Király, G., **Tálas, L.**, Tánczos, B., Dezső, B., Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth. Toxicol. Vitro. 29 (2), 370-379, 2015. ISSN: 0887-2333. IF: 3.338

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,497

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,46

10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szemán-Nagy Gábor Györgynek, hogy lehetőséget biztosított dolgozatom megírására. Szeretném megköszönni, hogy segítette és figyelemmel kísérte szakmai fejlődésemet, és teret adott a dolgozat és a publikációk megírása.

Ezen felül szeretném megköszönni Dr. Pócsi István Professzor úrnak a Mikrobiális Biotechnológia és Sejtbiológia tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak a PhD munkám elvégzéséhez.

Köszönet illeti Dr. Bánfalvi Gáspár Professzor urat az eredmények értelmezésében és a publikációk megírásában nyújtott szakmai segítségéért, emberi, és erkölcsi támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni az e-TOX munkacsoportnak, és minden munkatársamnak a kutatások és az értekezés létrehozása során nyújtott segítségét és támogatását.

11. TÁRGYSZAVAK

Videómikroszkópia

Time-lapse imaging

Long-term scann

Digitális képelemzés

Kromatin kondenzálódás

Uveális melanoma sferoid-modell

Primer uveális melanoma

Multipoláris sejtosztódás

Limbális regenerációs karcmodell

Humán limbális őssejt (HuLi)

Videó microscopy

Time-lapse imaging

Digital image analysis

Aspergillus fumigatus

Aspergillus nidulans

Candida albicans

Mycoplasma

