

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A MORFOLÓGIAI ÁTALAKULÁSOK SZEREPE A *CANDIDA ALBICANS*
GAZDASZERVEZETBEN TÖRTÉNŐ TÚLÉLÉSÉBEN ÉS ANNAK
INVÁZIÓJÁBAN**

Jakab Ágnes

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2017**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Fontosabb rövidítések	4
1. Bevezetés	6
2. Szakirodalmi áttekintés	8
2.1.A <i>Candida</i> fajok klinikai jelentősége.....	8
2.2. A <i>C. albicans</i> virulencia faktorai és azok szerepe a fertőzés folyamatában	10
2.2.1. A <i>C. albicans</i> morfológiai átalakulása	10
2.2.2. Az adhéziós képesség, adhezinek	13
2.2.3. Az invázió folyamata, szekretált hidrolitikus enzimek	15
2.2.4. A környezeti stresszválasz szabályozása <i>C. albicans</i> ban	17
2.2.5. A vasfelvétel, mint lehetséges virulencia faktor.....	19
2.3.A veleszületett és az adaptív immunválasz szerepe a <i>C. albicans</i> sal szembeni védelemben	21
2.4. A glükokortikoidok	23
2.5 Antifungális terápia	26
3. Célkitűzés	29
4. Anyagok és módszerek.....	31
4.1.A vizsgált törzsek és tenyésztésük	31
4.1.1. A SC5314 <i>C. albicans</i> törzs fenntartása és tenyésztése.....	31
4.1.2. További <i>C. albicans</i> törzsek és tenyésztésük.....	31
4.2. A sejtek szaporodásának vizsgálata sült, szilárd kultúrában	32
4.2.1. A környezeti stresszválasz vizsgálata	32
4.2.2. Antifungális hatás vizsgálata.....	33
4.2.3 A hemin, CO ₂ és a pH hatásának vizsgálata a <i>C. albicans</i> fonalas formáinak elágazási idejére videomikroszkop rendszerrel	34
4.2.4. Túlélési képesség vizsgálata	35
4.3. A sejtek szaporodásának vizsgálata szilárd táptalajon.....	35
4.4. Virulencia faktorok vizsgálata	36
4.4.1. Csírázás vizsgálata birkaszérumban.....	36
4.4.2. Pszeudohifa és klamidospóra képzés vizsgálata kukoricaliszt táptalajon.....	36
4.4.3. Hifázó képesség vizsgálata Spider táptalajon	36
4.4.4. Extracelluláris foszfolipáz (EP) aktivitás meghatározása tojássárgája táptalajon ..	36
4.5. Antioxidáns enzimaktivitások vizsgálata	37
4.5.1. A kataláz aktivitás meghatározása	37
4.5.2. A glutation reduktáz (GR) aktivitás meghatározása	37
4.5.3. A glutation peroxidáz (GPx) aktivitás meghatározása.....	37
4.5.4. A glükóz 6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) aktivitás meghatározása	38
4.5.5. A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás meghatározása.....	38
4.5.6. Fehérjetartalom mérése	38
4.6. A sejtek oxidált és redukált glutation tartalmának mérése.....	38
4.7. A reaktív részecske (RS) tartalom meghatározása	39
4.8. Patogenitás vizsgálatok	39
4.8.1. A kísérletekben használt sejtvonalak és fenntartásuk	39
4.8.2. Epitélium sejtek <i>in vitro</i> fertőzése.....	40
4.8.3. A <i>C. albicans</i> adhéziós képességének vizsgálata.....	41

4.8.4. A <i>C. albicans</i> invazív képességének vizsgálata.....	41
4.8.5. Citotoxicitás vizsgálat a laktát dehidrogenáz felszabadulás mérésével	42
4.8.6. Citokin szintek meghatározása.....	42
4.9. Statisztika	43
4.10. Felhasznált vegyszerek.....	43
5. Eredmények	44
5.1. Környezeti faktorok hatása a <i>C. albicans</i> morfológiai átalakulására.....	44
5.1.1 A hemin, szén- dioxid és pH hatása a <i>C. albicans</i> fonalas formáinak elágazási idejére	44
5.1.2. Stressz keresztvédelem vizsgálata az oxidatív stressz toleráns <i>C. albicans</i> mutáns törzseken	47
5.2. A betametazon hatása a <i>C. albicans</i> szaporodására és virulenciájára.....	51
5.2.1. Betametazon hatása a <i>C. albicans</i> szaporodására	51
5.2.2. Csírázás vizsgálata birka szérumban jelenlétében	52
5.2.3. Pszeudohifa és klamidospóra képzés kukoricaliszt táptalajon.....	52
5.2.4. Hifázóképeség jellemzése Spider táptalajon	54
5.2.5. Extracelluláris foszfolipáz aktivitás meghatározása tojássárgája táptalajon.....	54
5.3. A betametazon hatása a <i>C. albicans</i> infekció dinamikájára emberi epitélium sejt modelleken	55
5.3.1. Betametazon koncentrációk kiválasztása a patogenitás vizsgálatokhoz	55
5.3.2. A <i>C. albicans</i> adhéziós képességének vizsgálata.....	56
5.3.3. A <i>C. albicans</i> kezdeti sejtkárosító képességének vizsgálata.....	56
5.3.4. A <i>C. albicans</i> fertőzés és a betametazon kezelés citotoxikus hatásának vizsgálata.....	58
5.3.5. A betametazon kezelés és a <i>C. albicans</i> fertőzés hatása az epitélium sejtek interleukin termelésére.....	59
5.4. A betametazon kezelés hatása a <i>C. albicans</i> antifungális anyagokkal szembeni érzékenységére	61
5.5. A betametazon kezelés hatása a <i>C. albicans</i> oxidatív stressz érzékenységére.....	61
5.5.1. <i>C. albicans</i> szaporodása menadion jelenlétében	61
5.5.2. Túléleési képesség vizsgálata	63
5.5.3. Antioxidáns enzimaktivitások meghatározása	66
5.5.4. Az oxidált és redukált glutation tartalom, továbbá a reaktív részecskék mennyiségi meghatározása	67
6. Eredmények kiértékelése	68
6.1. Környezeti tényezők hatása a <i>C. albicans</i> fonalas formáinak elágazási idejére	68
6.2. Stressz keresztvédelem vizsgálata oxidatív stressz toleráns <i>C. albicans</i> mutáns törzseken.....	72
6.3. Glükokortikoid kezelés hatása a <i>C. albicans</i> virulenciájára	75
7. Összefoglalás	81
8. Summary	84
9. A kísérleti munkában résztvevő társszerzők munkájának ismertetése	87
Köszönetnyilvánítás	89
Szakirodalmi jegyzék	91
Tárgyszavak-Keywords	109
Függelék	110

Fontosabb rövidítések

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes („acquired immune deficiency. syndrome”)
AmB	amfotericin B
ATCC	American Type Culture Collection
BM	dinátrium-betametazon-21-foszfát („betamethasone 21-phosphate disodium salt”)
BSA	szarvasmarha szérum albumin („bovine serum albumin”)
cAMP-PKA	ciklikus adenzin monofoszfát-protein kináz A
CESR	központi környezeti stresszválasz („core environmental stress response”)
CFU	kolóniaképző egységek („colony forming unit”)
CFW	kalkofluor fehér fluoreszcens festék („calcofluor white”)
ConA-Alexa	Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált szukcinált concanavalin A
DCF	2',7'-diklórfluoreszcin
DMEM	„Dulbecco Modified Eagle” sejtenyésztő tápközeg
DTNB	5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoesav)
DTT	ditiotritol („dithiothreitol”)
EAP	extracelluláris aszpartát proteáz
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EP	extracelluláris foszfolipáz
ESR	környezeti stressz válasz („environmental stress response”)
FBS	fötális marha szérum („fetal bovine serum”)
Flu	flukonazol
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GKR	glükokortikoid receptor
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation-diszulfid
HEPES	N-2-hidroxietil piperazin-N'-2-etánszulfonsav

HIV	human immunodeficiencia vírus
Hog1	nagy ozmolaritás elleni glicerín válasz („high osmolarity glycerol response”)
IL	interleukin
KLA-Tween	kukoricaliszt és Tween agar
LDH	laktát dehidrogenáz enzim
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MOPS	3-N-morfolino-propánszulfonsav
MSB	menadion-nátrium-biszulfit
NAC	nem- <i>albicans</i> fajok („non- <i>albicans Candida species</i> ”)
NBT	nitro-kék tetrazolium klorid („nitro-blue tetrazolium chloride”)
Nit	nisztatin
OD ₆₄₀	640 nm-en mért optikai denzitás
PBS	0,9 % NaCl-ot tartalmazó foszfát puffer („phosphate buffered saline”)
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázat („pathogen-associated molecular pattern”)
PRR	mintázat felismerő receptor („pattern recognition receptor”)
PMNL	polimorfonukleáris leukocita
RNI	reaktív nitrogén intermediér („reactive nitrogen intermediate”)
ROS	reaktív oxigénformák („reactive oxygen species”)
RS	reaktív részecske („reactive species”)
RPMI-1640	„Roswell Park Memorial Institute” sejtenyésztő tápközeg
SAPK	stressz által aktivált protein kináz
SDA	Sabouraud dextróz agar
SDB	Sabouraud dextróz tápoldat
SOD	szuperoxid dizmutáz
<i>t</i> BOOH	<i>terc</i> -butil-hidroperoxid
UPR	nem-feltekeredett fehérje válasz („unfolded protein response”)
XOD	xantin oxidáz
YPD	élesztőkivonat pepton dextróz tápoldat („yeast peptone dextrose”)
YPDA	élesztőkivonat pepton dextróz agar („yeast extract peptone dextrose agar”)

1. Bevezetés

Az invazív gombás fertőzések száma ugrásszerűen növekedni kezdett az 1980-as évektől kezdődően, melynek okai közé tartozik az immunszuppresszív betegek, a transzplantációk valamint a kórházi ápolás során bekövetkező nozokomiális fertőzések számának növekedése, a széles spektrumú antimikrobiális szerek használata, az antifungális szerek növekvő alkalmazása miatt bekövetkező rezisztencia és a fertőzések késői diagnosztizálása is [Sardi, 2013].

A *Candida* genus közel 200 fajt tartalmaz, de közülük mintegy 20 fajról bizonyították, hogy megbetegedést képes kiváltani embereken. Ezen *Candida* fajok az egészséges normál humán mikroflóra tagjai, de bizonyos körülmények között a bőr és a nyálkahártya felületi fertőzését okozhatják. A mukozális infekciók egyik leggyakoribb típusa a vulvovaginális candidiasis, amit a nők ~75 %-nál élete során legalább egyszer diagnosztizálnak és mintegy 30 millió fertőzést jelent évente [Sobel, 1988; Perlroth és mtsai., 2007]. Továbbá a *Candida* fajok tehetők felelőssé a szájüregi infekciók ~80 %-ért is. Különösen veszélyeztetett csoportot jelentenek a human immunodeficiencia vírust (HIV) hordozók, ugyanis a betegek ~50 %-a, míg az szerzett immunhiányos tünetegyüttest (AIDS) már mutatók ~90 %-a szenved szájüregi candidiasistól [Klein és mtsai., 1984; Palmer és mtsai., 1996; Akpan & Morgan, 2002]. A felületi fertőzések csak néhány esetben veszélyeztethetik a túlélést, azonban a szisztémás infekciók a véráram útján történő terjedés és a szervek kolonizációja miatt életveszélyes megbetegedéseket okozhatnak és mintegy 40 %-os halálozási aránnyal is társulhatnak [Odds, 1988; Perlroth és mtsai., 2007; Pfaller & Diekema, 2007]. A *Candida* fajok a negyedik leggyakoribb, 50 % feletti mortalitással jellemzett, nozokomiális (kórházi környezetben kialakuló) szisztémás fertőzést okozó mikrobák az Amerikai Egyesült Államokban [Calderone & Fonzi, 2001; Perlroth és mtsai., 2007].

A *C. glabrata*, *C. tropicalis* és a *C. parapsilosis* fajokat gyakran izolálják fertőzések esetén, de az invazív infekciók több, mint 50 %-áért a *C. albicans* tehető felelőssé [Sardi, 2013]. Ez a diploid gomba alkalmazkodott a melegvérű gazdaszervezetekhez, így a normál flóra részét képezve az egészséges egyének 30-70 %-ban a szájüreg, a gasztrointesztinális traktus és a hüvely nyálkahártyáját kolonizálja [Mavor és mtsai., 2005]. Ezeken a helyeken a *C. albicans*nak fel kell vennie a harcot a mikrobiális kompetitorokkal (normál mikroflóra egyéb tagjai), mechanikai barrierékkel (epitélium, nyálkahártya), a környezeti stresszhatásokkal [pH, reaktív oxigénformák (ROS) és nitrogén intermedierek (RNI) stb.], továbbá a gazdaszervezet

veleszületett és adaptív immunrendszerével egyaránt [Calderone & Fonzi, 2001]. A *C. albicans* azonban számos virulencia faktorral rendelkezik, amelyek segítik a gomba gazdaszervezetben történő elterjedését [Calderone & Fonzi, 2001; Mayer és mtsai., 2013]. A virulencia faktorok közül az egyik legjelentősebbnek a *C. albicans* morfológiai átalakulását tekintik. A *C. albicans* élesztőről fonalas formára történő átváltása a környezetében bekövetkező változásokra (pH, vérszérum, CO₂ tenzió, szénforrások, ROS és RNI, környezeti stressz hatások) adott gyors válasznak tekinthető [Han és mtsai., 2011]. A szakirodalomban gyakran vonnak párhuzamot a *C. albicans* morfológiai átalakulása, a gazdaszervezetben történő szaporodása, illetve az általa okozott invazív fertőzések között, hiszen a patogén sikeres támadásának, illetve gazdaszervezetben történő elterjedésének egy kritikus lépése a szövetek fertőzését lehetővé tevő morfológiai tranzíció. A *C. albicans*sra jellemző élesztő és fonalas (pszeudohifa és valódi hifa) morfológiai formák, illetve ezek egymásba történő átalakulásának a lehetősége, jelentős előnyhöz juttatja a gombát a fertőzés különböző stádiumaiban. Az élesztő forma a véráramban történő terjedésben és az epitélium sejtekhez történő tapadásban játszik szerepet, míg a fonalas formák a szövetek áttörésében, a fagocita sejtek lízisében, illetve a szervek kolonizációjában vesznek részt [Gow és mtsai., 2002; Saville és mtsai., 2003; Sudbery, 2004; Jacobsen és mtsai., 2012].

Mindemellett nem szabad elfelejtkeznünk arról sem, hogy az egészséges emberi szervezet szigorú kontroll alatt tartja az opportunistá patogén *C. albicans* élesztőt. Azonban a mikroflóra zavara, a neutropénia és/vagy az immunszuppresszív beavatkozások egyenes utat jelentenek a *C. albicans* mélyebb szöveti inváziója, így a disszeminált candidiasis felé [van de Veerdonk és mtsai., 2010]. A véráramba belépett *C. albicans* eliminálására, illetve a szöveti invázió megállítására ép, jól működő veleszületett és adaptív immunrendszere van szükség. Azonban a transzplantátum kilökődésének megelőzésére vagy épp az autoimmun, érrendszeri, dermatológiai és gasztrointesztinális betegségeknél alkalmazott immunszuppresszív terápiák (pl. glükokortikoszteroidok), csökkentve az immunválaszt, jelentősen megnövelik a *C. albicans* fertőzések iránti fogékonyságot [Schäcke és mtsai., 2002; Spies és mtsai., 2011].

A *C. albicans*sra jellemző élesztő→hifa morfológiai átalakulás infekcióban betöltött szerepének a megismeréséhez, a tranzíciót kiváltó egyes környezeti faktorok/stresszhatások vizsgálata mellett, az immunszuppresszív kezelések révén kialakuló fertőzések nyomon követése is hozzájárulhat. Reményeink szerint a *C. albicans* morfológiai átalakulásának mélyebb megismerése újabb, hatékony antifungális stratégia kifejlesztését teheti lehetővé.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A *Candida* fajok klinikai jelentősége

Az 1980-as években az invazív *Candida* fertőzések egyedüli kórokozójaként a *C. albicans*-t azonosították, azonban 1990-es évektől kezdődően gyors növekedés figyelhető meg a nem-*albicans* fajok (NAC) által okozott infekciók számában [Pfaller, 1995; Pfaller & Diekema, 2007; Perlroth és mtsai., 2007]. Mára megállapították, hogy számos *Candida* faj kolonizálja a bőrt és a nyálkahártyát, és okoz megbetegedést az emberi szervezetben [Rangel-Frausto és mtsai., 1999; Kullberg & Oude Lashof, 2002; Perlroth és mtsai., 2007]. Napjainkban a *C. albicans* tehető felelőssé az Európában és az Amerikai Egyesült Államokban regisztrált invazív *Candida* infekció több, mint feléért. A második leggyakrabban izolálható faj a *C. glabrata* (15-25 %), majd a *C. parapsilosis* (10-20 %), az esetek ~15 %-ban pedig a *C. tropicalis*, míg kevesebb, mint 2 %-ban a *C. krusei*-t azonosítják [Rangel-Frausto és mtsai., 1999; Wisplinghoff és mtsai., 2003, 2004; Pfaller & Diekema, 2007; Klingspor és mtsai., 2015]. Azonban az előfordulási gyakoriságot nagymértékben befolyásolja a földrajzi elhelyezkedés, a betegek kora és a fertőzött személyeknél diagnosztizált alapbetegségek. Ennek megfelelően egyes Latin-Amerikai országokban, Dél-Afrikában, Indiában az izolátumok kevesebb, mint fele bizonyul *C. albicans*-nak, a NAC fajok közül elsősorban a *C. parapsilosis*-t, majd a *C. tropicalis*-t és a *C. glabrata*-t izolálták [Nucci és mtsai., 2010; Lim és mtsai., 2012]. A *C. tropicalis* elsősorban leukémiás és neutropéniás betegekből, míg a *C. glabrata*-t idősebb korú és legyengült, már *C. albicans*-sal is fertőzött betegekből izolálják. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* gyakran fordul elő a gyermekek különböző korosztályaiban, fertőz 18 év alatti gyerekeket, csecsemőket és újszülötteket. A *C. parapsilosis* fertőzés főbb rizikó faktorai között tartják számon a vénás katéterek alkalmazását vagy épp a mesterséges táplálást [Abi-Said és mtsai., 1997; Hajjeh és mtsai., 2004; Pfaller & Diekema, 2007; Nucci és mtsai., 2010; Garzillo és mtsai., 2017].

A *C. albicans*-t leggyakrabban mukozális infekciók okozójaként azonosítják. Az ide tartozó kórképek normál immunrendszerrel rendelkező egyéneknél is előfordulhatnak [Sobel, 1988; Perlroth és mtsai., 2007; Moyes & Naglik, 2011]. A nők mintegy 5-10 %-a szenved visszatérő vagy krónikus vulvovaginális candidiasistól. A leggyakoribb kockázati tényezők közé tartoznak a cukorbetegség, a közösülés, a szteroidok, antibiotikumok és hormonális fogamzásgátlók használata, a terhesség következtében megemelkedő ösztrogén szint és a

különböző hormonális terápiák [Dennerstein & Ellis, 2001; Fidel, 2004; Mayer és mtsai.; 2013; Cassone, 2015]. A másik leggyakoribb felületi gombás megbetegedés a szájüregi candidiasis. Az egészséges egyének legalább 50 %-nak a szájüregét kolonizálja valamilyen *Candida* faj, de ez az érték elérheti a 90 %-ot is. A szájüregi candidiasis főbb rizikó faktorai között tartják számon a protézis viselését, az aeroszol formájú szteroidok használatát, az előrehaladott kort, a dohányzást vagy épp a különböző autoimmun betegségeket [Klein és mtsai., 1984; Palmer és mtsai., 1996; Ruhnke, 2002; Akpan & Morgan, 2002].

A gombák okozta fertőzések másik csoportját a kezelés hiányában akár halállal is végződő invazív gombafertőzések alkotják. A nyálkahártya áttörését követően, a véráram segítségével bármely szervbe eljuthatnak, köztük a vesébe, a májba és akár a központi idegrendszerbe, és megtelepedhetnek a gombasejtek. A szisztémás candidiasis igen nagy halálozási rátával társul, melynek egyik oka az antifungális kezelés késleltetett elkezdése [Pfaller & Diekema, 2007; Perlroth és mtsai., 2007]. Ugyanis 15 %-ról, 40 %-ra emelkedik a betegek halálozási aránya, ha 12 órán túl kezdik meg a szisztémás candidiasis kezelését [Morrell és mtsai., 2005; Garey és mtsai., 2006]. Az esetek ~80 %-ban azonban a disszeminált candidiasis nem immunszuppresszió (neutropénia, kortikoszteroid kezelés, HIV fertőzés, diabétesz mellitus) következtében alakul ki [Hajjeh és mtsai., 2004; Perlroth és mtsai., 2007; Klingspor és mtsai., 2015]. A legtöbb *Candida* infekció a gasztrointesztinális traktus és más szervek nyálkahártyájának a kolonizációjára vezethető vissza, emellett azonban szisztémás infekciót a centrális vénás katéterek alkalmazása is okozhat. Kimutatták, hogy a disszeminált candidiasisban szenvedő betegek 65-90 %-nak volt centrális vénás katétere, illetve a hosszú távú 22 napos kórházi tartózkodás szintén invazív *Candida* infekció kialakulását okozta az esetek igen nagy százalékában [Hajjeh és mtsai., 2004; Wisplinghoff és mtsai., 2003, 2004; Perlroth és mtsai., 2007; Guery és mtsai., 2009]. Jelentős rizikófaktor még a széles spektrumú antibiotikumok hosszú távú alkalmazása, ami a meglévő bakteriális normál flóra egyensúlyát felborítva könnyíti meg a gomba elterjedését [Wright és mtsai., 1997; Saiman és mtsai., 2000]. A bőrnek, mint a szervezet első védelmi vonalának, illetve a bélrendszer nyálkahártyájának sérülése (égési sérülés, vénás katéterek, műtétek) ugyancsak az invazív *Candida* infekciók kialakulásának kedvez [Wright és mtsai., 1997; Saiman és mtsai., 2000; Perlroth és mtsai., 2007].

Azonban még nem tisztázott, hogy az egészséges emberek gasztrointesztinális traktusát kolonizáló *Candida* fajok tehetők-e felelőssé az invazív megbetegedésekért [Perlroth és mtsai., 2007]. Egyes tanulmányok szerint a *Candida* izolátumok emberről emberre terjednek [Fanello és mtsai., 2001], míg mások szerint a fertőző *Candida* törzsek minden betegre specifikusak,

melynek a forrása az endogén mikroflóra [Stephan és mtsai., 2002]. Ezt a teóriát támasztja alá, hogy a vérből izolált *Candida* fajok 90 %-a vagy nagyon hasonló, vagy pedig megegyezik a betegeket kolonizáló törzsekkel [Marco és mtsai., 1999], illetve azokat a betegeket, akiknél több mint, egy *Candida* törzset/fajt azonosítottak, hosszabb kórházi tartózkodás és/vagy immunszuppresszió jellemezte [Höfs és mtsai., 2016].

2.2. A *C. albicans* virulencia faktorai és azok szerepe a fertőzés folyamatában

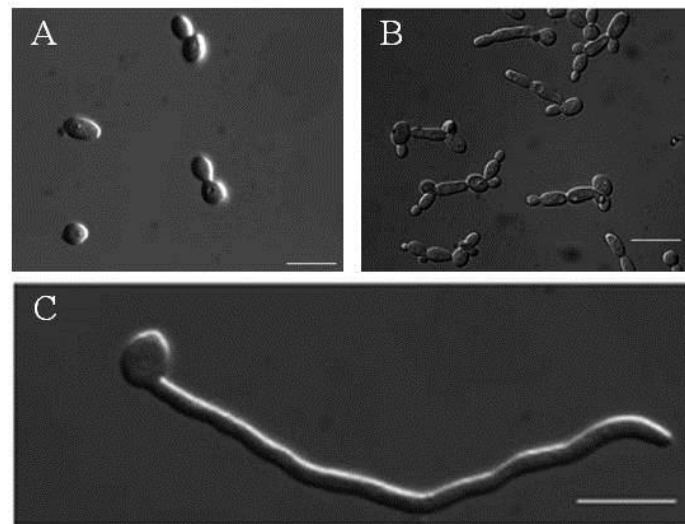
A *C. albicans* számos virulencia faktoral rendelkezik a helyi vagy szisztémás fertőzés kialakításához, amelyek elősegítik a patogén mikroorganizmus eltérő anatómiai helyeken történő túlélését, az adott környezethez történő alkalmazkodását, továbbá a gazdaszervezet szöveteiben történő elterjedését. A *C. albicans* legfontosabb virulencia faktorai közé soroljuk az élesztő↔fonalas morfológiai átalakulás képességét, az adhezinek és invazinok sejtfelszínen történő szekrécióját, a gázdasejtek károsításának képességét, a hifára jellemző tigmotropizmust, azaz a sejtek közötti hézagokba történő behatolást, a biofilm képzést és a morfológiai fenotípusok közötti átváltást [1. ábra; Calderone & Fonzi, 2001; Mayer és mtsai., 2013].

A virulencia faktorokon túl a patogén gomba megváltozott környezeti feltételekhez történő gyors alkalmazkodása is elősegíti a gazdaszervezet kolonizációját. Legyen szó akár a gazdaszervezet immunsejtjei által kiváltott oxidatív vagy ozmotikus stresszhatásokról, a pH értékekben bekövetkező változásról, az antifungális szerek okozta sejtfall stresszről, vagy akár bizonyos nyomelemekért, például a vasért, vívott harcra [Calderone & Fonzi, 2001]. Az egyes virulencia faktorokat, valamint az adott anatómiai helyeken megfigyelhető környezeti stresszhatásokra kifejlesztett védelmi mechanizmusokat a továbbiakban részletesen tárgyalom.

2.2.1. A *C. albicans* morfológiai átalakulása

Megjelenési formáját tekintve a *C. albicans* három fő morfológiai formában fordulhat elő, ezek az élesztő, a pseudohifa és a valódi hifa [1. ábra; Odds, 1985, 1988]. Az egysejtű sarjadzó élesztők megjelenésüket tekintve ~5 µm átmérőjű kerek vagy enyhén ovális formájú sejtek. A fonalas formáknál a lefűződő leánysejt nem hagyja el az anyasejtet, hanem erőteljesen megnyúlik, így pseudohifát vagy valódi hifát hozva létre. A pseudohifánál a megnyúlt alakú utódsejtek láncszerűen egymáshoz kapcsolódnak, a sejtek metabolikusan önállóak. A valódi hifa sejtfaa egymással párhuzamos lefutású, a sejtek közötti szeptumokon (válaszfal) pórusok találhatóak, lehetővé téve a sejtek közötti anyagáramlást [Berman & Sudbery, 2002; Sudbery

és mtsai., 2004; Sudbery, 2011]. A *C. albicans* egyedi morfológiai képletének tekintik a csíratömlőképzést, ami az inkubációs idő 30. percénél megjelenő, a valódi hifa képzés prekursorának tekinthető forma [Gow, 1997]. A *C. albicans* azonosítását lehetővé teszik a klamidospórák, melyek a pszeudohifák végén képződő vastag falú, jelentős hő- és szárazságtűrővel jellemezhető képletek [Odds, 1985, 1988].



1. ábra *C. albicans* élesztő (A), pszeudohifa (B) és valódi hifa (C) morfológiájú formái. Mérték=10 μm [Sudbery és mtsai, 2004].

A dimorf *C. albicans* képes az élesztő és a fonalas formák (valódi hifa, pszeudohifa) közötti gyors morfológiai átváltásra, ezen jelenséget nevezzük dimorfizmusnak [Odds, 1988; Sudbery és mtsai., 2004; Sudbery, 2011]. Az opportunistá patogén *C. albicans* egyik legfontosabb virulencia faktorának tekintik ezen tulajdonságát. A morfológiai alakok közötti átváltást számos környezeti tényező egyaránt előidézi, szabályozza [Odds, 1985; 1988]. Az élesztősejtek képzésének a 30 °C alatti hőmérséklet, a savas pH (pH=4) érték, a megnövekedett glükóz koncentráció, illetve a 10^7 sejt/ml-nél nagyobb sejtszám kedvez [Odds, 1988; Sudbery, 2011; Han, 2011]. Az élesztő→hifa morfológiai átalakulást a 37 °C hőmérséklet, az 5 % CO_2 és a kis O_2 tenzió, a vészérum, a prolin, az N-acetil-D- glükózamin valamint a különböző szénforrások, például D-glükóz, galaktóz, fruktóz, szaharóz, jelenléte, továbbá az egyes nyomelemek hiánya, az éhezés (nitrogén- vagy szénforrás hiánya) és a semleges pH érték vagy ezek kombinációja is előidézi [Sudbery, 2011; Han, 2011; Huang, 2012]. A pszeudohifa növekedést a hifa képződésének kedvező környezeti tényezők irányába történő eltolódás váltja ki, mint például a 35 °C-os hőmérséklet, a tápközeg nagy foszfát tartalma (600 mM) vagy a pH 5,5 érték [Sudbery 2011; Han, 2011].

Ezen morfológiai formák mindegyike jelentős előnyhöz juttatja a *C. albicans* gombát a fertőzés egyes stádiumaiban. Az élesztő forma a véráramban történő elterjedésben valamint az epitélium sejtekhez történő adhézióban játszik szerepet. A fonalas formák a gazdaszervezet szöveteinek és sejtjeinek károsításában, a makrofágokból történő menekülésben, így a fagocita sejtek lízisében és a szervek, mint például a vese kolonizációjában vesznek részt [1 és 2. ábra, Gow és mtsai., 2002; Sudbery és mtsai., 2004; Jacobsen és mtsai., 2012]. A morfológiai átalakulást esszenciális virulencia faktorként tartják számon, ugyanis az élesztő→hifa morfológiai átalakulásra képtelen *C. albicans* sejtek csökkent virulenciát mutatnak egér infekciós modellben [Lo és mtsai., 1997]. A pszeudohifa fertőzésben és virulenciában betöltött szerepe azonban még tisztázatlan. Annyi bizonyos, hogy más *Candida* fajok (*C. albicans* és a *C. dubliniensis* kivételével) nem képeznek valódi hifát, csak pszeudohifa formában képesek növekedni, azonban évről évre nő az ezen fajok által okozott szisztémás candidiasis esetek száma [Csank & Haynes, 2000; Gow és mtsai., 2002].

A *C. albicans* élesztő→hifa morfológiai átalakulása szoros kapcsolatban áll a sejtfal összetételében és felépítésében bekövetkező változásokkal, melyeket a gazdaszervezet immunrendszere érzékel. A *C. albicans* sejtek fala 90 %-ban poliszaharidokból, míg 10 %-ban antigénként funkcionáló fehérjékből áll. Két fő réteget különböztetünk meg, a sejtfal szilárdságáért és alakjáért felelős belső, illetve a lazább szerkezetű külső réteget. A belső vázat vékony kitin réteg és az arra épülő β -1,6 és a β -1,3 glükán egységek építik fel, míg a külső rész fehérjékhez kötött mannózt tartalmaz (mannózproteinek). A külső rétegben található fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) egységekkel kapcsolódnak a belső váz elemeihez [Gow és mtsai., 2011; Gow és Hube, 2012]. A sejtfal ezen komponenseinek arányát, így a sejtfal szerveződését a *C. albicans* életciklusai, illetve az őt érő környezeti stresszhatások befolyásolják. A *C. albicans* immunrendszer általi felismerését nagymértékben elősegíti a hifa asszociált fehérjéken (Als3, Hwp1, Sod5, Sap4-6) kívül a sejtfalat alkotó molekulák részaránya. A hifasejtek az élesztősejtekkel szemben 3-5- ször több kitint tartalmaznak, amely az élesztősejtekben a sarjhegek környékén koncentrálódik [Nather & Munro, 2008; Cabib & Bowers, 1971; Gow és mtsai., 2011; 2012]. Ami a β -1,3 glükán tartalmat illeti az közel azonos a két sejttypusban, azonban a hifasejtek felszínén fedetten találhatóak meg ezen poliszaharidok [Gantner és mtsai., 2005].

A környezeti stimulusok által kiváltott morfológiai átalakulás több száz gén expressziójával jellemzett folyamat, amely során sejtfal fehérjéket (*HWP1*, *YWP1*), adhezineket (*ALS1*), extracelluláris aszpartátot proteázokat (*SAP4*, *SAP5*, *SAP6*) és hifa asszociált fehérjéket (*ECE1* és *HYRI*) kódoló gének indukálódnak, amelyek nemcsak a hifa felépítésében vesznek

részt, de a *C. albicans* fertőzőképességét is befolyásolják [Liu és mtsai., 2001; Brown, 2002; Huang, 2012]. A morfológiai átalakulást egyrészt a cAMP-PKA (ciklikus adenozin monofoszfát-protein kináz A) szignalizációs útvonal szabályozza, ami az Efg1-Flo8 transzkripciós faktorok aktiválásával hifa specifikus gének (*HWP1*, *HYR1*, és az *ALS1*) expresszióját eredményezi. Ezen útvonal kulcsfontosságú eleme az adenilát cikláz, ami közvetlenül indukálódik CO₂-ra, N-acetil-D-glükozaminra és bakteriális peptidoglikánra, illetve a Ras1 fehérjén keresztül vérszérum jelenlétére [Liu és mtsai., 2001; Huang, 2012; Gow és mtsai., 2011]. A hifa morfológia kialakítását másrészt a Cst20-Cst11-Hst7-Cek1/2 MAPK (mitogén aktiválta protein kináz) szignalizációs útvonal szabályozza, ami a Cph1 transzkripciós faktor átíródását váltja ki nitrogén vagy szénforrás hiányakor és vérszérum hatására [Liu és mtsai., 1994, 2001; Gow és mtsai., 2011; Huang, 2012].

A morfológiai átalakulást a Rim101 transzkripciós faktoron keresztül a neutrális és alkalikus pH, illetve a ROS által indukált genotoxikus stressz is aktiválja. A szervezet sikeres kolonizációjához vagy épp inváziójához elengedhetetlen a savas (~pH 4,5 hüvely lumene), semleges (~pH 7,0 vér) és az enyhén lúgos (pH 8,0 vékonybél) kémhatású környezethez történő alkalmazkodása a mikrobáknak. A *C. albicans* környezeti pH-hoz történő alkalmazkodásában kiemelt jelentőséggel bírnak a sejtfelszíni glikozidázokat kódoló *PHR1* és *PHR2* gének. A *PHR1* pH 5,5 vagy a felett, elsősorban szisztémás fertőzések esetén expresszálódik a hifa sejtekben, míg a *PHR2* savas közegben (pH 5,5 alatt) indukálódik és a lokális fertőzés kialakításában vesz részt [Davis és mtsai., 2000; Gow és mtsai., 2011; Huang, 2012].

A morfológiai átalakulást azonban számos negatív regulátor is szabályozza. Ezek közé sorolhatjuk a Tup1, Ssn6, Rfg1, Nrg1 és a Rbf1 faktorokat, amelyek együttműködve gátolják meg a fonalas növekedésben szerepet játszó gének átíródását. A quorum érzékelőként leírt farnezol molekula is a cAMP/PKA szignalizációs útvonal gátlásával és a Tup1 hifa represszor aktiválásával vesz részt *C. albicans* morfológiai átalakulásának a gátlásában 10⁷ sejt/ml-nél nagyobb sejt koncentráció esetén [Liu és mtsai., 2001; Huang, 2012].

2.2.2. Az adhéziós képesség, adhezinek

A *C. albicans* igen fontos virulencia fakora az adhéziós képessége, amely elősegíti a gombasejtek egymáshoz, más mikroorganizmusokhoz, epitélium sejtekhez vagy épp abiotikus felszínekhez (katéter, protézis) történő tapadását. Ezen folyamatok esszenciálisak a gomba gazdaszervezetben történő túlélésében és a kolonizáció folyamatában [2 és 3. ábra; Moyes és mtsai., 2015; Höfs és mtsai., 2016]. Az adhéziót a sejtfelszín hidrofób tulajdonságán túl, a

Candida adhezinek és a gazdasejt felszínén lévő receptorok (kadherin, integrin) között kialakuló kapcsolatok is elősegítik [Moyes és mtsai., 2015].

Gombafertőzés stádiumai:

1. Kolonizáció

- adhézió az epitélium sejtekhez
- tápanyaghasznosítás



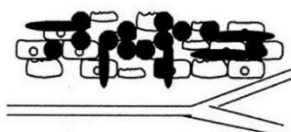
2. Lokális felszíni fertőzés

- behatolás az epitélium sejtekbe
- gazdasejtek fehérjéinek degradációja



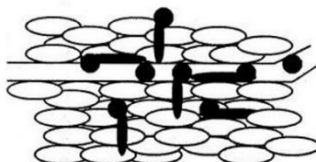
3. Mélyre ható fertőzés

- szöveti penetráció
- vaszkuláris invázió
- immunrendszer kikerülése



4. Disszeminált fertőzés

- adhézió az érfal endotéliumhoz
- szövetek kolonizációja
- véralvadási kaskád aktiválása



Virulencia faktorok

- adhezinek
- szekretált hidrolitikus enzimek
- hifaképzés
- fenotípus váltás

- szekretált hidrolitikus enzimek
- hifaképzés
- „candidalizin”

- szekretált hidrolitikus enzimek
- hifaképzés

- adhezinek
- szekretált hidrolitikus enzimek
- hifaképzés

2. ábra A virulencia faktorok szerepe a *C. albicans* által okozott fertőzésekben [Naglik és mtsai., 2003; Moyes és mtsai., 2016].

A *C. albicans* adhéziós képessége kapcsán legalaposabban tanulmányozott csoport az úgynevezett ALS (aglutininszerű sorozat) géncsalád. Az eddig leírt 8 ALS gén (*ALS1-7*; *ALS9*) különböző sejtfelszíni glikoproteineket, másnéven az adhezineket kódol [Mayer és mtsai., 2013; Modrzewska & Kurnatowski, 2015]. A sejtfelszíni fehérjék közül az Als1-4 a csíratömlők és a hifák felszínén expresszálódik, míg az Als5-7 és 9 adhezinek kifejezetten az élesztősejtek felszínén jelennek meg. Az Als2, Als3 és Als4 glikoproteinek kiemelkedő fontossággal bírnak a *C. albicans* humán endotél és epitél sejtekhez történő megtapadásában [Naglik és mtsai., 2011; Mayer és mtsai., 2013]. Az Als fehérjéken kívül a hifa-asszociált Hwp1 (hifa sejtfal fehérje 1) szerepét is leírták a gazdasejtekhez történő adhézió elősegítésében. Elsősorban a szájüreg kolonizációkor és a kitapadt sejtek biofilm képzésekor játszik aktív szerepet a gomba virulenciájában [Staab és mtsai., 1999, 2013]. A *C. albicans* morfológiai formái közül így a hifa képletet tekintik az adherensebbnek, ugyanis az általa expresszált adhezinek jelentős szerepet töltenek be a fertőzés kialakításában és elegendhetetlenek a sejtek adhéziós képességében. Ennek ellenére az élesztő forma és az epitélium sejtek között kialakuló kölcsönhatás indítja el az adhézió folyamatát, ami közvetlenül előidézi az élesztő→hifa morfológiai átalakulást [Moyes és mtsai., 2015]. A gombasejtek adhéziójában résztvevő

további fehérjéket is azonosítottak, amelyek elsősorban epitélium sejtekhez történő tapadásban (Eap1, Iff), a sejtfal integritás fenntartásában, továbbá a biofilm képzésben (Mp65) játszanak szerepet [Li & Palecek, 2003; 2008; Bates és mtsai., 2007; Sandini és mtsai., 2011].

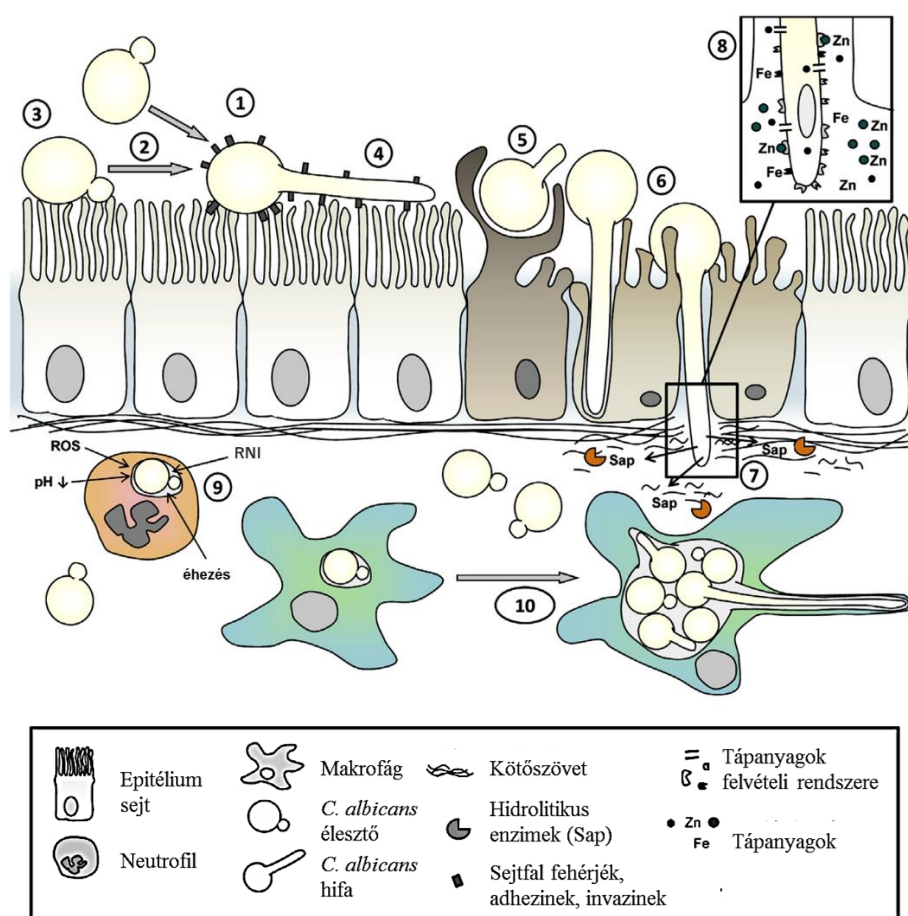
2.2.3. Az invázió folyamata, szekretált hidrolitikus enzimek

A sejt-, illetve szövetkárosodást elsősorban az igen invazív hifáknak tulajdonítják, azonban már néhány tanulmány beszámolt arról, hogy bizonyos esetekben az élesztősejtek is behatolhatnak az epitélium sejtekbe [Ray & Payne, 1988]. A hifa általi invázió két külön útvonalon, indukált endocitózissal és aktív penetrációval is bekövetkezhet [3. ábra; Phan és mtsai., 2000; Wächter és mtsai., 2012; Höfs és mtsai., 2016]. A gomba által kiváltott endocitózis egy teljesen passzív, gazdasejt által irányított gyors folyamat, amely független a *Candida* sejtek életképességétől. Ezzel ellentétben az aktív penetráció a *C. albicans* által szabályozott, az élő és holt gazdasejteken keresztül zajló áthatolási folyamat. A háttérben az *ECE1* gén terméke a „candidalizin” nevű pórusképző toxin állhat, amely képes a humán epitél sejtek közvetlen roncsolására [2. és 3. ábra; Phan és mtsai., 2000; Wächter és mtsai., 2012; Höfs és mtsai., 2016; Moyes és mtsai., 2016]. Mindkét mechanizmust számos tényező befolyásolja, köztük a gombasejtek morfológiája, illetve a fertőzött epitélium sejtek típusa. Amíg a szájüregi és hüvelyi epitélium sejtek károsításánál mind a két folyamatot megfigyelték, addig a gasztrointesztinális traktus epitélium sejtjeinek inváziója csak aktív penetráció révén valósulhat meg [Dalle és mtsai., 2010; Wächter és mtsai., 2011a; 2012].

A hidrolitikus enzimekhez tartozó proteázok, lipázok és foszfolipázok nagymértékben hozzájárulnak a gomba adhéziójához, a gazdaszervezet szöveteinek károsításához, az immunrendszerrel szembeni védekezéshez, így a *C. albicans* fertőzőképességéhez (2. ábra).

A **szekretált aszpartát proteáz** (Sap) család gombasejtek védelmében betöltött szerepét már számos tanulmányban leírták [Naglik és mtsai., 2003, 2004]. A *C. albicans*ban ezidáig 10 különböző *SAP* (*SAP1-10*) gént azonosítottak. A *SAP* gének által kódolt fehérjék széles szubsztrátspecifitásuk révén proteáz inhibitorokat, különböző extracelluláris mátrix fehérjéket (keratin, kollagén, laminin, fibronectin) és antimikrobiális fehérjéket (immunglobulinok, laktoferrin, mucin) is képesek degradálni (3. ábra). A Sap1-3 proteázok a nyálkahártya fertőzéseivel, míg a *SAP4-5* gének által kódolt fehérjék a gomba szisztémás elterjedésével hozhatók összefüggésbe [Naglik és mtsai., 2003, 2004; Schaller és mtsai., 2005]. A *C. albicans* által szekretált hidrolázok következő sokak által tanulmányozott csoportját a **foszfolipázok** alkotják. A *C. albicans*ban a foszfolipázok 4 osztályát (foszfolipáz A, B, C, D)

sikerült azonosítani. A foszfolipázok részt vesznek a gazdasejt membránjának a károsításában, így segítve a gazdaszervezet gomba általi invázióját [Ghannoum, 2000; Schaller és mtsai., 2005]. A *C. albicans* hidrolitikus enzimeinek 3. csoportját a **lipázok** alkotják. A *C. albicans*ban 10 lipáz enzimet kódoló gént azonosítottak. A gomba által termelt különböző lipáz enzimek szerepet játszanak a mono-, di- és triacil gliceridek hidrolízésében, így biztosítva a megfelelő szénforrást a gombasejtek számára. Ezen túlmenően ezek a hidrolázok elősegítik a gombasejtek gazdasejtekhez történő adhéziónak, valószínűleg részt vesznek a mikroflóra lízisében és az immunrendszer sejtjeivel szembeni védekezésben is [Stehr és mtsai., 2003; Schaller és mtsai., 2005].



3. ábra A *C. albicans* patogenezisének folyamata: (1) epitélium sejtekhez történő adhézió; (2, 3) morfológiai átalakulás; (4) sejtfal adhezinek és invazinek kifejeztetése a hifa felszínén; (5) indukált endocitózissal vagy (6) aktív penetrációval történő invázió; (7) hidrolitikus enzimek termelése (Sap proteázok); (8) a gazdasejtől felszabaduló tápanyagok és mikrotápanyagok felvétele (cink, vas); (9) a kedvezőtlen környezeti feltételek (ROS, RNI, alacsony pH, éhezés) stressz válasz útvonalakat indukálnak; (10) fagoszómából történő menekülés élesztő→hifa morfológiai átalakulással [Polke és mtsai., 2015].

2.2.4. A környezeti stresszválasz szabályozása *C. albicans*ban

A környezetben élő mikroszkopikus méretű gombáknak szembe kell nézniük az általuk elfoglalt ökológiai fülkében fennálló környezeti stresszhatásokkal. Ezek közül kiemelendő a tápanyag limitáció, a változó hőmérséklet és ozmolaritás, továbbá a nehézfémek, pH változások és a toxinok okozta stressz, illetve más mikroorganizmusokkal történő kompetíció. A patogén fajoknak, mint amilyen a *C. albicans*, meg kell küzdeniük a fagocitózist követően a fagolizozómában termelődő ROS és RNI keltette oxidatív stresszel, továbbá a fellépő K^+ beáramlással, a vesében jelenlévő ozmotikus stresszhatásokkal (600 mmol/L NaCl koncentráció), valamint az antifungális szerek (például kaszopofungin) okozta sejtfal stresszel is [Calderone & Fonzi, 2001]. Azonban a külső környezetben bekövetkező hirtelen változások veszélyeztetik a sejtek túlélését, felborítják azok homeosztázisát. Így a mikroorganizmusoknak ki kellett fejleszteniük egy sokrétű és egyben egyedülálló védelmi mechanizmust, melyet a fellépő különféle környezeti stresszhatások esetén azonnal aktiválhatnak. A legkülönbözőbb stresszhelyzetekben egyaránt aktiválódó elemek alkotják a központi környezeti stresszválaszt („core environmental stress response”, CESR), így biztosítva a sejtek védelmét, amíg adaptálódnak a megváltozott környezeti viszonyokhoz [Gasch, 2007]. Nem meglepő módon, az enyhe stresszhatáshoz alkalmazkodott gombasejtek védetté válnak ugyanazon stresszhatás nagyobb vagy akár letális dóziséval szemben. Továbbá elmondhatjuk, hogy az általános stresszválasz meglelte keresztvédelmet idézhet elő a látszólag más típusú stressz hatásokkal szemben is [Enjalbert és mtsai., 2003].

A fejlődési útjukat tekintve 500 millió éve különvált *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* fajoknál már bebizonyosodott a konzervált CESR és a keresztvédelem jelenléte, azonban a *S. cerevisiae*től > 200 millió éve elvált *C. albicans*nál még bizonytalan a meglétük [Berbee & Taylor, 1993; Gasch, 2007]. A *S. cerevisiae* és *S. pombe* élesztőknél a CESR során aktiválódó gének a legkülönbözőbb stresszhelyzetekben (hősokk, oxidatív stressz, ozmotikus stressz, éhezés okozta stressz, extrém pH és DNS károsodását kiváltó stresszhatások) hasonlóan viselkedtek. A transzkriptom változások elemzésekor a szénhidrátanyagcsere, zsírsav lebontás, oxidatív stressz elleni védekezésben fontos elemek, fehérje metabolizmus, transzkripció faktorok és a jelátvitelben fontos fehérjék indukálódását, míg a fehérjeszintézisben résztvevő gének represszációát figyelték meg. A *S. cerevisiae*ben a Hog1 (nagy ozmolaritás elleni glicerín válasz fehérje) szignáltranszdukciós útvonal az Msn2/4 transzkripció faktorokon keresztül indukálja a CESR géneket, míg a *S. pombe*ben

ugyanazt a feladatot a Hog1-el homológ Sty1 útvonal révén aktiválódó Atf1 transzkripciósfaktor látja el [Gasch és mtsai., 2000; Causton és mtsai., 2001; Chen és mtsai., 2003].

Azonban a *S. cerevisiae* és *S. pombe* élesztőknél megfigyelt CESR elemek egyrészét *C. albicans*nál is leírták. A transzkriptomikai vizsgálatok kimutatták, hogy a központi környezeti stresszválasz részeként expresszálódó *C. albicans* gének nincsenek általánosan Hog1 MAPK kontroll alatt. Ugyanis a Hog1 csak ozmotikus és nehézfém stressz alatt vesz részt *C. albicans* CESR gének szabályozásában, míg oxidatív stressznél a Cap1 transzkripciósfaktor kulcsszerepe feltételezhető [Enjalbert és mtsai., 2006; Brown és mtsai., 2014]. Mindemellett Nicholls és mtsai (2004) a *C. albicans* élesztőben az Msn2/4 transzkripciósfaktorokhoz hasonló szerkezetű fehérjéket, a CaMsn4 és a CaMn1-t, határoztak meg, azonban ezeknek a funkciójuk teljesen eltér a *S. cerevisiae*ben tapasztaltaktól. Hiszen az *Sc_MSN2/MSN4* gén deléciója a transzkripció szinten megmutatkozó válasz elmaradását eredményezi több stressztípus esetén is, míg a *Ca_Mn1* mutáns sejtek csak a gyenge sav okozta stresszre voltak érzékenyek [Gasch, 2007]. Elmondható tehát, hogy ezeknek a fehérjéknek a CESR szabályozásában betöltött szerepe nem olyan jelentős, mint ahogyan azt a *S. cerevisiae*ben tapasztalták valamint funkciójuk is feltehetőleg megváltozott az eltelt évmilliók alatt [Nicholls és mtsai., 2004].

Az irodalmi adatok a stressz keresztvédelem létezését túlnyomórészt ugyancsak a *S. cerevisiae* élesztőben írták le. Megállapították, hogy az enyhe hőstressz, az ozmotikus- és oxidatív stresszel szemben, míg az oxidatív, ozmotikus vagy hőstressz, a fagyasztás-kiolvasztás stressz ellen védi a sejteket [Wieser és mtsai., 1991; Lewis és mtsai., 1995; Park és mtsai., 1997; Brown és mtsai., 2014]. A *C. albicans*ban ugyancsak leírták a kereszttolerancia jelenségét. A vizsgálatokban a ROS-t előidéző ágensek (menadion, plumbagin) védelmet jelentettek a későbbi H₂O₂ kezeléssel szemben. Ugyanezt tapasztalták, amikor az élesztő sejteket először H₂O₂ keltette oxidatív stressznek, majd ozmotikus stressznek tették ki, illetve amikor nem letális hőstressz, majd oxidatív stressz kezelést alkalmaztak [Jamieson és mtsai., 1996; Enjalbert és mtsai., 2003; Smith és mtsai., 2004]. Azonban a hőstressz nem jelentett védelmet a későbbi ozmotikus vagy sejtfal stressz ellen, ahogy az oxidatív stressz sem védte meg a *C. albicans* sejteket a későbbi hőstresszel szemben [Enjalbert és mtsai., 2003; Leach és mtsai., 2012]. Általánosságban elmondható, hogy az oxidatív stresszválasz gének indukálódnak a hősokra adott válaszban, azonban a hősokk gének nem expresszálódnak oxidatív stressz esetén. Ezen megállapítás feltételezi azt a lehetőséget, hogy a gyulladásos folyamattal együtt járó láz felkészíti a patogén *C. albicans* a fagocita sejtek oxidatív támadására [Brown és mtsai., 2014]. Ugyanakkor a fiziológiás vércukor szint mellett (0,05-0,1 % glükóz koncentráció) is megfigyelték az oxidatív stressz gének aktiválódását, ami ugyancsak hozzájárulhat a

megnövekedett oxidatív stressz rezisztenciával rendelkező *C. albicans* sejtek túléléséhez a fagolizozómában őket érő ROS-el szemben [Rodaki és mtsai., 2009]. Ez a jelenség azonban nem a Hog1 vagy Cap1 szignalizációs útvonalakkal, hanem egy evolúciósan konzervált glükóz szignalizációs útvonallal szabályozott folyamat eredménye [Rodaki és mtsai., 2009].

Mindezen eredmények felvetik azt a kérdést, hogy a *C. albicans*ban miért nem alakul ki CESR olyan körülmények között, mikor más fajokban aktiválódik ezen védelmi rendszer? Feltételezések szerint ez a *C. albicans* specifikus élőhelyével, illetve a *S. cerevisiae*től eltérő morfológiai plaszticitásával (élesztő→hifa morfológiai átalakulás lehetősége) áll kapcsolatban [Enjalbert és mtsai., 2003; Gasch, 2007]. Ugyanis a *C. albicans* a bőr és a nyálkahártya felszínén, a normál bélflóra részeként élesztő formában található meg. Azonban a mikrobiális flóra egyensúlyának a felborulására vagy épp az immunrendszer legyengülésére morfológiai átváltással válaszolhat [Mitchell, 1998; Mavor és mtsai., 2005]. Továbbá számos környezeti tényező is előidézhetheti az élesztő→hifa átalakulását például: éhezés (nitrogén és szénforrás hiánya), magas hőmérséklet (37 °C) és CO₂ szint, szérum jelenléte, illetve a hipoxia állapota [Ernst, 2000; Huang 2012]. Ezen morfológiai átalakulás a Hog1 és a Cek1 MAPK faktorokat is magába foglaló szignalizációs útvonalak összetett hálózata által szabályozott folyamat. Számos tanulmány a Hog1 MAPK-t a *C. albicans* élesztő→hifa morfológiai átalakulását szabályozó fehérjeként írja le, ami a keresztvédelem és a dimorf átalakulás kapcsolatára utalhat a környezeti stressznek kitett *C. albicans* sejtekben [Eisman és mtsai., 2006; Enjalbert és mtsai., 2006; Huang, 2012].

Ezen adatok tükrében megállapítható, hogy az opportunistá patogén *C. albicans* kifejleszthetett egy igen specifikus stresszválasz mechanizmust annak érdekében, hogy alkalmazkodni tudjon az emberi szervezetben meglévő számos és gyakran változó környezeti feltételekhez [Enjalbert és mtsai., 2006]. Feltételezhető, hogy a *C. albicans*ban a környezeti stressz válthatja ki a morfológiai változást, míg a *S. cerevisiae* és a *S. pombe* a homeosztázisa fenntartása érdekében iniciálja a CESR-t. Mindezen eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *C. albicans* az élesztő→hifa morfológiai átalakulással helyettesítheti a CESR-t [Gasch, 2007].

2.2.5. A vaskészlet, mint lehetséges virulencia faktor

A környezeti tényezők mellett a gazdaszervezet vasforrásának a megszerzése is központi szerepet játszik a gombák metabolizmusában és kiemelten fontos jelentőséggel bír a gazdaszervezet inváziójában [3. ábra; Bullen, 1981; Santos és mtsai., 2003]. A vas számos a

sejtlégzésben, sejt anyagcserében és a DNS szintézisben kulcsszerepet játszó fehérje megfelelő működéséhez szükséges eszenciális nyomelem. Az emberi szervezetben a vas kizárólag fehérjékhez kötött formában van jelen, ezáltal korlátozva a mikroorganizmusok számára a hozzáférés lehetőségét. Ilyen fehérje az oxigén megkötésében és szállításában résztvevő hemoglobin, valamint a vérben keringő vasat megkötő transferrin és ferritin proteinek. A humán szervezetben a legtöbb vasion az eritrocitákban található hemoglobinban koncentrálódik [Bullen, 1981; Santos és mtsai., 2003; Knight és mtsai., 2005]. A vérkeringésben, normál fiziológiai kondíciók mellett 10^{-18} M mennyiségű szabad vas található, ami nem elegendő a mikrobiális növekedéshez [Bullen, 1981]. A különböző fertőzések, műtétek, fogorvosi kezelések, szöveti sérülések következtében szabaddá váló vasionokat az alapállapotban 30 %-ban telített transferrin fehérje köti meg, így korlátozva a mikroorganizmusokat abban, hogy hozzájussanak ehhez a növekedésükhöz eszenciálisan szükséges nyomelemhez [Ramanan & Wang, 2000; Pendrak és mtsai., 2004; Pendrak & Roberts, 2007]. Azonban egyes hipotézisek szerint a szabad vasion koncentrációjának a csökkenése szignálként szolgálhat a *C. albicans* számára, előidézve a virulencia faktorok kifejeződését és így az élesztő → hifa morfológia átalakulást [Santos és mtsai., 2003].

A *C. albicans* számos stratégiát fejlesztett ki a gazdaszervezettől történő fémion megszerzésére és felvételére [Almeida és mtsai., 2009]. A *C. albicans* egyrésztől redukzív asszimilációs rendszere segítségével juthat hozzá a vasionokhoz. Ennek során a szervezet ferritinjéből, illetve transferrinjéből veszi fel a nyomelemet. A gombasejtek vas reduktáz enzimjeik segítségével elsősorban a transferrinből felszabadított vas ionokat nagy affinitású vas transzporter rendszereken keresztül juttatják be az intracelluláris térbe [Ramanan & Wang, 2000; Knight és mtsai., 2005; Almeida és mtsai., 2009]. Másrésztől számos mikroorganizmus sziderofórokat (vaskelátoló fehérje) termel annak érdekében, hogy a vérben szabadon lévő Fe^{3+} -ionokat megköthessék [Howard, 1999; Heymann és mtsai., 2002; Almeida és mtsai., 2009]. Eddigi ismereteink alapján a *C. albicans* sejtek sziderofórok termelésére nem képesek, azonban Heymann és mtsai (2002) kimutatták, hogy egy sziderofór transzportfehérje (Sit1) lehetővé teszi számára a más mikroorganizmusok által termelt sziderofórok felvételét. A *C. albicans* vas asszimilációjának harmadik lehetősége a hemoglobinból és heminből történő vas ionok felszabadítása. A hemoglobin megkötését a gomba felszínén lévő hemreceptorok (pl. Rbt5, Csa1, Csa2, Pga7) végzik. A hemoglobin kötődése egyrésztől a hem oxigenáz enzimet kódoló gén (*HMX1*), másrésztől a hifa specifikus gének (*HWP1*, *ECE1*, *EGF1*) és a gombasejtek szaporodásában szerepet játszó gének expresszióját váltja ki. Így a *C. albicans* hem oxigenáz enzime segítségével képes a Fe^{3+} -ionok felszabadítására a hemoglobin degradációs

termékeiből [Santos és mtsai., 2003; Weissman & Kornitzer, 2004; Mayer és mtsai., 2013]. A vas tehát nem csak a gazdaszervezet mikroorganizmusok elleni védekezésében, hanem a gomba metabolizmusában, szaporodásában is nélkülözhetetlen szerepet játszik.

2.3. A veleszületett és az adaptív immunválasz szerepe a *C. albicans* szembeli védelemben

A veleszületett immunválasz első lépése a patogén *C. albicans* felismerése. Általában a nyálkahártya epitélium sejtjei kerülnek legelőször kapcsolatba a *C. albicans* élesztővel. A gazda sejtek mintázat felismerő receptoraik (PRR) segítségével ismerik fel a *C. albicans* patogén asszociált molekuláris mintázatait (PAMP). A *C. albicans* legfontosabb PAMP elemei közé tartoznak a sejtfalalkotó O- és N-kötött mannánok valamint a β -glükán [Weindl és mtsai., 2011; Williams és mtsai., 2013]. A PRR-ek nemcsak az epitélium sejteken, de a polimorfonukleáris sejtek (neutrofil granulociták), a makrofágok valamint a T- és B-limfociták felszínén is expresszálódnak. A PRR-ek közül az epitélium sejtek felszínén is megtalálható Toll-szerű receptorok (TLR2, 4 és 9), C-típusú lektinek (dectin 1, 2 és a mannóz receptor) továbbá a citoplazmában lokalizálódó NOD-szerű receptorok szerepét azonosították a *C. albicans* felismerésében [Moyes & Naglik, 2011; Netea és mtsai., 2015]. Az invazív *C. albicans* sejtek felismerése kis méretű, 10-50 aminosavból felépülő, oldható **antimikrobiális peptidek** (LL-37, hisztatin-5, β defenzin) szekrécióját váltják ki az epitélium sejtekből, melyek vagy előlik a mikróbat vagy pedig gátolják annak szaporodását [Swidergall & Ernst, 2014]. Az LL-37 a *C. albicans* sejtfalához kapcsolódva meggátolja a gomba epitélium sejtekhez történő tapadását [den Hertog és mtsai., 2005; Chang és mtsai., 2012]. A hisztatin-5 a gomba transzportereken keresztül belép a *C. albicans* sejtekbe, ahol ROS-et generálva programozott sejthalált vált ki [Helmerhorst és mtsai., 2001; den Hertog és mtsai., 2005], míg a humán β -defenzin a gomba membrán permeabilizációjával pusztítja el a behatoló mikróbat [Vylkova és mtsai., 2007]. Az antimikrobiális peptideken túl a *C. albicans* felismerése különböző citokinek és kemokinek szekrécióját váltják ki az epitélium sejtekből, mint például a G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 és a RANTES. A citokinek, különösen az IL-8, a **polimorfonukleáris leukociták** (PMNL) véráramból a fertőzés helyére történő toborzásában vesznek részt [Naglik és mtsai., 2011; Gow és mtsai., 2011]. A PMNL sejtek esszenciálisak a mukozális és szisztémás candidiasis elleni harcban, hiszen a gombasejtek fagocitózist követően a fagolizoszómában termelődő ROS és RNI révén közvetlenül előlik a *C. albicans* sejteket [Urban és mtsai., 2006; Fidel, 2007; Conti & Gaffen, 2010]. A mononukleáris fagocita sejtek (monociták, makrofágok,

dendritikus sejtek) veleszületett immunválaszban betöltött szerepe is ismert a *Candida* infekciók folyamán. A **monociták** által a vérben, míg a **makrofágok** révén a szövetek között termelt proinflammatorikus citokinek szerepet játszanak a PMNL sejtek aktivációjában és toborzásában [van de Veerdonk és mtsai., 2010]. Emellett a monociták és a makrofágok által termelt citokinek (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β és az IL-6) a szisztémás candidiasis elleni védekezésben játszanak kulcsszerepet [van de Veerdonk és mtsai., 2010]. A bőrben és a nyálkahártyában megtalálható **dendritikus sejtek** mannóz receptoraik segítségével ismerik fel a *C. albicans* sejtek PAMP mintázatait, majd a *Candida* specifikus antigéneket T-limfocita sejteknek prezentálják. A dendritikus sejtek 1-es (Th1) és 2-es (Th2) típusú T-helper választ váltanak ki [Naglik és mtsai., 2011]. A dendritikus sejtek a veleszületett és az adaptív immunrendszer között teremtenek kapcsolatot, ugyanis közvetlenül fagocitálják az invazív *C. albicans* sejteket, másrészt a naiv limfociták aktiválásában is részt vesznek, ezáltal az adaptív immunválasz indukálásában és az immunológiai memória létrehozásában is szerepet játszanak [Höfs és mtsai., 2016].

A veleszületett immunrendszer gyors reakcióját, egy specifikusabb, de jöllehet lassabb T-limfociták (celluláris immunitás) és B-limfociták (humorális immunitás) által közvetített immunválasz követi. A T- és a B-limfociták a *Candida* specifikus antigének felismerését követően aktiválódnak [van de Veerdonk és mtsai., 2010]. A T-sejtek *Candida* infekcióban betöltött szerepét jelzi a HIV/AIDS betegeknek igen gyakran kialakuló szájüregi candidiasis, ami az abnormálisan alacsony CD4⁺ T-sejt szintnek tulajdonítható [Klein és mtsai., 1984]. A specifikus *Candida* antigének dendritikus sejtek általi prezentációja, a T-sejtek eltérő citokineket kifejező effektor T-limfocitákká (Th1, Th2 vagy Th17 sejtek) történő differenciálódását idézi elő. [Conti & Gaffen, 2010]. A szisztémás infekció során aktiválódó **Th1-es válasz** a leghatékonyabb mechanizmus az *Candida* elleni védekezésben [Weindl és mtsai., 2010]. A Th1-sejtek differenciálódását az IL-12 citokin, valamint a dendritikus sejtek és a természetes ölüsejtek által termelt IFN-ok váltják ki. A Th1 sejtek maguk is képessé válnak IFN γ termelésére, így a neutrofilek aktiválásával közvetve váltják ki a patogének fagocitózist és elölését. Az IFN γ a neutrofilek mellett az antigénprezentáló makrofágokat is aktiválja, melyek a TNF- α és IL-1 termelésükkel ugyancsak a neutrofilek aktiválásában vesznek részt [van de Veerdonk és mtsai., 2010; Netea és mtsai., 2015; Höfs és mtsai., 2016]. A **Th2-es választ** a sejtfalban található kitin stimulálja, azonban ez a válasz a szisztémás infekció ellen hatástalan. A Th2 sejtek által szekretált citokinek elősegítik az antitest termelést, az extracelluláris patogének eltávolítását, valamint fontos szerepük van a nematódák elleni immunológiai védelemben [Conti & Gaffen, 2010; Höfs és mtsai., 2016]. A **Th17 sejtek** a

nyálkahártya immunológiai védelmében, elsősorban a *Candida* szaporodásának gátlásában, így a szöveti invázió megelőzésében játszanak szerepet. Legnagyobb számban a bélcsatorna kötőszövetes rétegében vannak jelen. A Th17-választ a makrofágok által bemutatott antigének, illetve az IL-6, IL-23, TGF- β , IL-1 β citokinek váltják ki [Conti & Gaffen, 2010; Netea és mtsai., 2015]. A Th17 sejtek, az IL-17 citokin család tagjai mellett, nagy mennyiségű IL-6 és TNF- α citokineket is szekretálnak, amelyek a neutrofil granulociták toborzásában, aktiválásában, migrációjában és így a *Candida* elleni immunológiai védelemben vesznek részt [Khader és mtsai., 2009; Conti & Gaffen, 2010; Netea és mtsai., 2015].

2.4. A glükokortikoidok

A mellékvesekéreg legfontosabb glükokortikoidjának, a hidrokortizonnak ízületi gyulladás kezelésében elért első sikereit követően számos glükokortikoid aktivitással rendelkező vegyület gyártása valósult meg. Mára már a klinikum széleskörben alkalmazza a glükokortikoidokat gyulladásgátló, immunszuppresszív és allergiaellenes hatásaik miatt. Elsősorban a transzplantátumok kilökődésének megelőzésére, az asztma, szepszis, autoimmun megbetegedések, ízületi gyulladások, kollagén, érrendszeri, dermatológiai és gasztrointesztinális betegségek kezelésére használatosak [Schäcke és mtsai., 2002; Spies és mtsai., 2011; Zelena & Makara, 2015].

A 21 szénatomból álló glükokortikoid hormonokat (**4. ábra**) szisztémásan vagy lokálisan alkalmazzák. A klinikai hatékonyságukat nagymértékben befolyásolja a felszívódás aránya, a célszövetben kialakuló koncentrációja valamint a megfelelő szteroid receptorhoz való affinitása is. A plazmában a glükokortikoidok fél életideje 80-tól (kortizol) - 270 (dexametazon) percig terjed. A glükokortikoidok mintegy 75 %-a egy májban termelődő plazmafehérjéhez, a transzkortinhoz (kortizol kötő globulin) kötődve szállítódik a vérben, míg a szintetikus szteroidok túlnyomó többsége (a prednizolon kivételével) albuminhoz kötődik. Így a szabadon keringő mintegy 4-5 % glükokortikoidnak tulajdonítják a tapasztalt élettani hatást. A glükokortikoidok lebontása a májban történik, majd a metabolitok a vesével választódnak ki. Azonban a lokálisan (bőrön keresztül, ízületbe, belélegezve vagy epidurálisan) bejuttatott glükokortikoidok elkerülik a májat, így biológiai fél életidejük meghaladja a 24 órát [Schäcke és mtsai., 2002; Moisan és mtsai., 2014; Zelene & Makara, 2015].

A glükokortikoidok lipidtermészetüknél fogva egyaránt képesek a sejtek membránján szabadon átdiffundálni, fő biológiai hatásukat az intracelluláris glükokortikoid receptorokon (GKR) keresztül fejtik ki. Az alapszerkezetét tekintve 3 fő doménnel rendelkezik a receptor: a

hormonspecifitásért felelős C terminális szakasz a ligandkötő hely, míg az N terminális rész a transzkripció stimulálásában vesz részt. A kettő között a hormonhatásért felelős DNS-kötő domén helyezkedik el. Alapállapotban a GKR-ok chaperonokkal (Hsp70, Hsp90) komplexet képezve inaktivált állapotban találhatóak meg a citoplazmában. A hormon kapcsolódása esetén a hő sokkfehérjék leválnak és a kialakult szteroid-receptor komplex bejut a sejtmagba. Foszforilálódást követően két szteroid-receptor komplex homodimer formában összekapcsolódik és a DNS egy meghatározott, glükokortikoid specifikus eleméhez kötődve transzkripciós faktorként szabályozza több ezer gén átíródását [Rhen & Cidlowski, 2005; Nicolaides és mtsai., 2010; Zelene & Makara, 2015; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016]. A glükokortikoidok emellett a génexpressziótól független gyors, nem-genomi hatásokat is képesek kiváltani, azonban ezen mechanizmus kevésbé ismert. Elképzelhető, hogy a gének átírását szabályozó GKR- hoz köthető ez a tulajdonság is. Ugyanis a legújabb kutatások alapján a nem-genomi hatások a membrán kötött vagy citoszolikus GKR szabályozásán, illetve a glükokortikoidok (pl. dexametazon) sejtmembránra gyakorolt hatásán keresztül érvényesülnek [Song & Buttgereit, 2006; Haller és mtsai., 2008; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016].

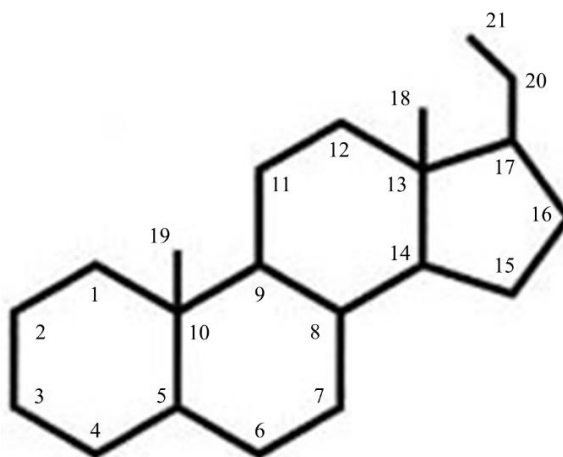
A glükokortikoidok immunrendszert és a gyulladásos folyamatokat gátló hatásukat számos mechanizmuson keresztül fejtik ki. Például gátolják számos proinflammatorikus citokin (IL-1, IL-2, IL-6; IL-8; IL-12, INF- γ , TNF- α) szintézisét, felszabadulását, továbbá egyéb gyulladásos mediátorok (hisztamin, bradikinin, nitrogén-monoxid) képződését és fokozzák azok lebontását, eliminációját is. Az erek átjárhatóságát csökkentő hatásuk mellett a sejtes elemek szintjén is hatnak: szabályozzák a T-sejt proliferációt és a keringő limfociták mennyiségét, továbbá gátolják a neutrofilek ér endotéliumhoz történő tapadását, a neutrofilek és a makrofágok fagocitózist, az oxidatív ölés és az apoptózis folyamatát, illetve a monocita-makrofág rendszer differenciációját [Lionakis & Kontoyiannis, 2003; Coutinho & Chapman, 2011].

A glükokortikoid terápia azonban egyike azon tényezőknek, amely invazív gombás fertőzésekhez, köztük candidiasishoz vezethetnek [Lionakis és Kontoyiannis, 2003]. Részben a szteroidok használata miatt napjainkra többszörösére növekedett az invazív gombás fertőzések száma, melynek oka az igen elterjedt, nagy dózisú, hosszan tartó alkalmazásban keresendő. A napi 10 mg-nál nagyobb dózisban alkalmazott szisztémás metilprednizolon (MP) terápia nagymértékben megnöveli a gombás fertőzés kialakulásának kockázatát [Stuck és mtsai, 1989]. A glükokortikoid terápia bizonyítottan nagy valószínűséggel okoz candidiasist olyan betegeknél akiknél akut veseelégtelenséget, daganatos megbetegedést, szisztémás lupus erythematosust diagnosztizáltak vagy transzplantációs műtéten estek át [Pryor és mtsai., 1996;

Patterson, 1999; Hovi és mtsai., 2000; Sung és mtsai., 2001; Bodey, 2002; Rovin és mtsai., 2005]. Botas és munkatársai kimutatták, hogy a hidrokortizon kezelések fokozzák a szisztémás *Candida* fertőzés kialakulásának kockázatát koraszülött csecsemőknél [Botas és mtsai., 1995]. Ezen túlmenően például a máj, csontvelő, tüdő vagy szív transzplantált betegek szintén fogékonyabbak a invazív *Candida* fertőzésekre az exogén glükokortikoid terápiát követően [Patterson, 1999; Hovi és mtsai., 2000; Bodey, 2002].

A glükokortikoidok azonban nemcsak az emberi szervezetre, hanem a normál flóra részét képező *C. albicans* fiziológiájára, virulenciájára is hatással vannak. A humán gyógyászatban alkalmazott egyes kortikoszteroidok (MP, hidrokortizon) fokozzák a *C. albicans* szaporodását, csírázását, hifázását, extracelluláris aszpartát proteáz és foszfolipáz termelését, epitélium sejtekhez történő adhézióját, illetve megnövelik a szájnyálkahártya és a gasztrointesztinális régió kolonizálási rátáját [Bykov, 1989; Lionakis & Kontoyiannis, 2003; Gyetvai és mtsai., 2007].

A betametazon egy közepes erősségű szintetikus glükokortikoid, amelynek jól ismert a gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatása. Kenőcsökben, krémekben és gélekben használják bőr- (viszketés és ekcéma) és szemfertőzések kezelésére, többnyire 0,05-0,13 % (~1-2 mM) koncentrációban. Emelett injekció formájában [2,63 mg betametazon-nátrium-foszfát (2 mg betamezonnal egyenértékű) és 6,43 mg betametazon-dipropionát (5 mg betametazonnal egyenértékű) ampullánként] reumatológiai, bőrgyógyászati megbetegedések, allergiás bántalmak kezelésére. A betametazont szem- és fülcseppekben, illetve gélekben gyakran antibiotikumokkal együtt alkalmazzák külső fülgyulladás valamint szürke hályog eltávolítását követő fertőzések elkerülésére, illetve injekciós terápiában műtétek utáni belső szemgyulladás és makula ödéma megelőzésére [Corbett és mtsai., 1993; Suharwardy és mtsai., 1994; Rigopoulos és mtsai., 2004; Abelardo és mtsai., 2009; Sticherling és mtsai., 2013].

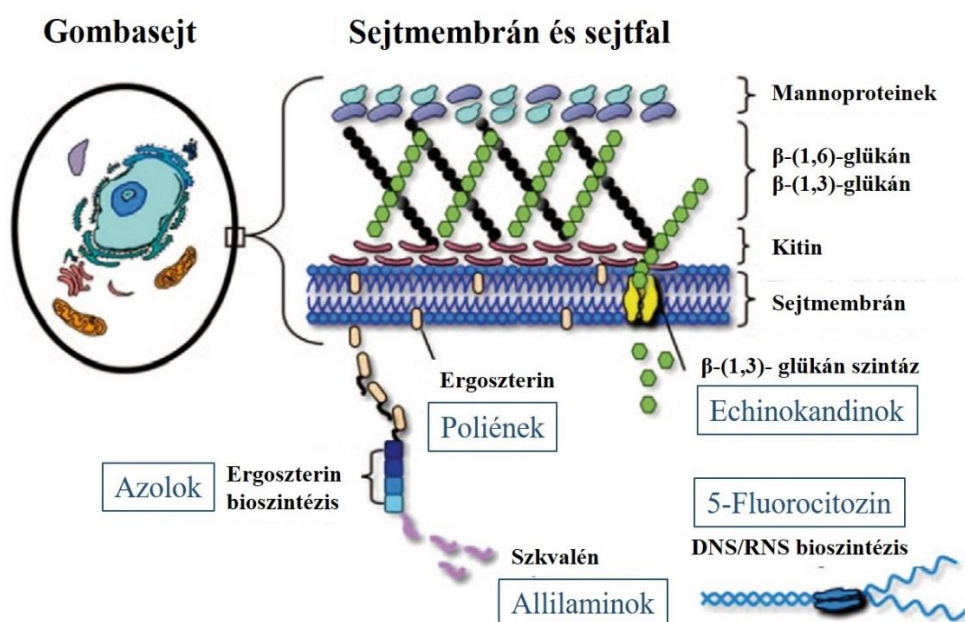


4. ábra A glükokortikoidok 21 szénatomos alapváza.

2.5. Antifungális terápia

A gombaellenes szerek köre sokkal szűkebb, mint például a baktériumok ellen alkalmazható készítményeké. Ennek elsődleges oka az, hogy az eukarióták közé tartozó gombák ellen hatásos antimikotikumok jelentős része az emberi szervezetet is károsítja, ami korlátozza a humán terápiában való alkalmazhatóságukat. Így a jelenleg alkalmazott antifungális hatóanyagokat néhány molekulából fejlesztették ki [Grillot & Lebeau, 2005; Lewis & Fothergill, 2015].

A támadáspontjuk alapján megkülönböztetünk sejtfal bioszintézist gátló antimikotikumokat (echinokandinok), sejtmembránt károsító szereket (poliének, azolok), ergoszterin (azolok, allilaminok) és nukleinsav szintézist (5-fluorocitozin) gátló szereket, illetve mitózist gátló (griseofulvin) antimikotikumokat [5. ábra; Lewis, 2011; Lewis & Fothergill, 2015]. A *Candida* fertőzések kezelésében leggyakrabban használatos antimikotikus szerek a poliének, az azolok és az echinokandinok [Chen és mtsai., 2010; Lewis, 2011; Lewis & Fothergill, 2015].



5. ábra A legismertebb antifungális szerek csoportosítása támadáspontjuk alapján [Lewis & Fothergill, 2015].

Napjainkban legerjedtebben alkalmazott membránkárosító polién antimikotikumok a nisztatin (Nit) és az amfotericin B (AmB). A nagyméretű hidrofób és hidrofil láncrésszel is rendelkező molekulák a sejtmembrán ergoszterin tartalmával kapcsolatba lépve hidrofíli csatornákat alakítanak ki, ami elsősorban a K^+ homeosztázis felborulásával vezet a gombasejtek pusztulásához [5. ábra; Brajtburg és mtsai., 1990; Odds és mtsai., 2003; Grillot & Lebeau,

2005; Lewis & Fothergill, 2015]. Az AmB széles spektrumú antifungális szer, így sarjadzó, fonalas és dimorf gombák ellen egyaránt hatásos, míg a nisztatin erős toxicitása miatt csak lokálisan alkalmazható elsődlegesen sarjadzogombák ellen. Az AmB hátránya, hogy csak intravénásan adagolható és ugyan kisebb affinitással, de az emberi sejtek koleszterinjéhez is képes kötődni, így a terápiás dózistól függően nefrotoxikus hatása ismert [Grillot & Lebeau, 2005; Lewis & Fothergill, 2015]. Az AmB lipid-asszociált készítményei mellékhatásait és hatékonyságukat tekintve is sokkal előnyösebbek a hagyományosan alkalmazott AmB- hez képest [Odds és mtsai., 2003; Grillot & Lebeau, 2005; Lewis & Fothergill, 2015]. A polién antifungális szerek elleni rezisztencia kialakulásához elsősorban a csökkent ergoszterin tartalom, a megváltozott szterin tartalom és zsírsav összetétel, illetve az ergoszterint kívülről lefedő fehérjék megjelenése vezethet. A primer rezisztencia kialakulása e szerrel szemben igen ritka a *Candida* fajoknál, kivételt jelentenek a *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* fajok esete. Az AmB kezelést követő másodlagos rezisztenciát a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* fajok esetén figyelték meg [Klepser, 2001; Kontoyiannis & Lewis, 2002; Lewis & Fothergill, 2015].

Az azolok a gomba ergoszterin szintézisében szerepet játszó citokróom P450 enzimet, a 14- α -demetiláz működését gátolják (5. ábra). Kétféle alapszerkezetük ismert, a régebbiek imidazol, az újabbak triazol alapvázatot tartalmaznak. Az imidazolok (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol) ma már szinte csak a lokális kezelésben használatosak. Ugyanakkor a triazolok (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) mind a felszíni, mind az invazív gombás fertőzések kezelésében szerepet játszanak. Kevésbé toxikusak, mint a poliének és a hepatotoxikus ketokonazol [Odds és mtsai., 2003; Lewis & Fothergill, 2015]. A leggyakrabban alkalmazott triazol a fungisztatikus hatású flukonazol, amelynek orális és intravénás alkalmazása is lehetséges. A legtöbb *Candida* faj ellen hatásos, kivételt ez alól a *C. krusei*, *C. glabrata* fajok jelentik, amelyek genetikailag rezisztensek a szerrel szemben. Hosszan tartó kezelés esetén szekunder rezisztencia alakulhat ki a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* fajokban [Kontoyiannis & Lewis, 2002; Grillot & Lebeau, 2005; Enoch és mtsai., 2006; Lewis & Fothergill, 2015]. Az azol típusú antifungális szerek elleni rezisztencia kialakulásához a demetiláz enzim mutációja, a target enzim túltermelése, a targethez való csökkent hozzáférhetőség, az efflux pumpák túltermelése vagy ezen mechanizmusok kombinációja vezethet [Grillot & Lebeau, 2005]. A vorikonazol szélesebb antifungális spektrummal rendelkezik, így hatásos az itrakonazol és a flukonazol rezisztens törzsekkel szemben [Pfaller és mtsai., 2003; Enoch és mtsai., 2006].

A sejtfalszintézist gátló antimikotikumok közé tartoznak az echinokandinok. Ismertebb képviselői az echinokandin B (*Aspergillus rugulosus*), aculeacin A (*Aspergillus aculeatus*), katekol-szulfát echinokandinok (pl. *Coleophoma empedri*) valamint a pneumokandin (*Glarea lozoyensis*). A természetes echinokandinok toxikusnak bizonyultak, ezért a gyógyászatban félszintetikus változataikat intravénásan használják, mint a pneumokandinból létrehozott kaszopfungint és a mikafungint [Carver, 2004; Murdoch & Plosker, 2004]. Az echinokandinok a β -1,3-glükán szintáz inhibitoraként a gombák sejtfalszintézisét gátolják [5. ábra; Denning, 2003; Chen és mtsai., 2011a]. A *Candida* fajok ellen fungicid hatást mutatnak [Chen és mtsai., 2011a]. Az echinokandinokkal szembeni rezisztencia kialakulása ritka. A β -1,3-glükán szintáz túltermelése, a β -1,3-glükán szintáz echinokandin érzékenységet csökkentő mutációk, illetve a sejtfal kitin tartamának növekedése akadályozhatja meg az echinokandin célenzimhez történő eljutását [Denning, 2003; Eschenauer és mtsai., 2007; Chen és mtsai., 2011a].

3. Célkitűzések

Munkánk célja az egyre nagyobb egészségügyi problémát okozó oportunista patogén *C. albicans* morfológiai átalakulásának a jellemzése volt. Mivel az invazív gombafertőzések és az élesztő→hifa átalakulásra való képesség szorosan összefüggnek, így a következő kérdésekre kerestük a választ: (1) Az emberi szervezeten belül a *C. albicans* élőhelyeire jellemző környezeti tényezőkben bekövetkező változások tehetők-e felelőssé a candidiasis kialakulásáért? (2) A gomba túlélését biztosító élesztő→hifa morfológiai átalakulás a komplex környezeti stresszhatásokra adott általános stresszválasz részének tekinthető-e? (3) Mivel a *Candida* fertőzések szempontjából egyre veszélyeztetettebb csoportot jelentenek a glükokortikoid terápiában részesülő betegek, így azt is megvizsgáltuk, hogy az immunrendszer legyengülése vajon az egyetlen predesztináló tényezője-e a candidiasis kialakulásának, vagy a glükokortikoidok közvetlenül a kommenzalista *C. albicans* fiziológiájára hatva is elősegítik-e az infekció kialakulását.

Annak érdekében, hogy a fontosabb felmerült kérdésekre választ adjunk, az alábbi kutatásokat végeztük el:

1. Az emberi szervezet különböző anatómiai helyeit jellemző környezeti paraméterek hatásának vizsgálata a *C. albicans* fonalas formáinak elágazási frekvenciájára.
2. Megnövekedett oxidatív stressz toleranciával jellemzett *C. albicans* mutáns törzsek környezeti stresszhatásokra adott válaszána vizsgálata.
 - 2.1 Stressz keresztvédelem vizsgálata a *t*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH) toleráns *C. albicans* mutáns törzseken.
 - 2.2 A *C. albicans* morfológiai átalakulása és az általános stressz tolerancia közötti kapcsolat vizsgálata.
3. Egy, a klinikumban széleskörűen alkalmazott szintetikus glükokortikoszteroid, a betametazon gombaélettani hatásának feltérképezése.
 - 3.1. A szteroid kezelés hatása a *C. albicans* *in vitro* virulencia faktoraira (csírázási képesség, extracelluláris foszfolipáz aktivitás, pszeudohifa, hifa és klamidospóra képzés).

3.2. Az epitélium, a *C. albicans* és a glükokortikoidok hármass kölcsönhatásának mélyebb megértése.

3.3. A betametazon és a candidiasis kezelésére alkalmazott antifungális szerek közötti interakció vizsgálata.

3.4. A szteroid kezelés hatása a *C. albicans* sejtek oxidatív stressz érzékenységére.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált törzsek és tenyésztésük

4.1.1. A SC5314 *C. albicans* törzs fenntartása és tenyésztése

Kísérleteinkben az *C. albicans* SC5314 (ATCC-MYA 2876) genomszekvenált törzzsel dolgoztunk. Az törzset élesztő kivonatot tartalmazó táptalajon (YPDA; 1 % (w/v) élesztőkivonat (Alfa Aesar, Németország), 2 % (w/v) mikológiai pepton (Oxoid, Anglia), 2 % (w/v) glükóz, 2 % (w/v) agar, pH= 5,6) 4 °C-on tároltuk.

A kísérletekhez használt SC5314 törzs előtenyésztése élesztő kivonatot tartalmazó tápoldatban [YPD; 1 % élesztő kivonat, 2 % glükóz, 2 % mikológiai pepton, pH= 5,6] történt. A törzseket 18 órán át 5 ml tápoldatban 37 °C-on előinkubáltuk.

A betametazon (a továbbiakban BM; dinátrium-betametazon-21-foszfát; Sigma-Aldrich, Magyarország) hatásának tanulmányozásakor, a 18 órán át előtenyésztett kultúrából ~0,1 OD₆₄₀ értékű 5 ml térfogatú tenyészetet állítottunk elő. A sejteket 1-4 mM BM-t tartalmazó YPD tápoldatban 37 °C-on rázatással (2,3 Hz) inkubáltuk. Az exponenciális növekedési fázisban lévő (OD₆₄₀=~0,8-0,9) sejteket használtuk fel a BM előkezelés hatásának vizsgálatára.

4.1.2. További *C. albicans* törzsek és tenyésztésük

A vizsgálatainkban továbbá a *C. albicans* ATCC 14053 szülői törzset, *C. albicans* klinikai izolátumokat (**1. táblázat**), illetve Fekete és munkatársai (2007, 2008) által belőlük létrehozott *tBOOH* toleráns mutáns törzseket (AF06, 4774T, 8387T, 10934T, 19890T, 20072T) használtuk fel. A *tBOOH* egy oxidatív stresszt kiváltó vegyület és gyorsítja a lipidek peroxidációját a biológiai membránban. Az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzseket a szülői törzsek egyre növekvő *tBOOH* koncentrációjú tápoldatban történő folyamatos tenyésztésével hozták létre. A mutánsok *tBOOH* toleranciája stabilnak bizonyult az átoltásokat követően is. Az izolátumok a Debreceni Egyetem ÁOK Orvosi Mikrobiológia Intézetének gyűjteményéből származtak [Fekete és mtsai., 2007, 2008]. A törzseket Sabouraud (SDA, 2 % (w/v) glükóz, 1 % (w/v) mikológiai pepton, 2 % (w/v) agar) táptalajon, 4 °C-on tároltuk.

A törzsek előtenyésztése Sabouraud tápoldatban (SDB; 2 % glükóz, 1 % mikológiai pepton, pH= 5,6) történt. A törzseket 18 órán át 5 ml SDB tápoldatban 28 °C-on előinkubáltuk,

majd az így előkészített kultúrákat használtuk fel a környezeti stresszválasz tanulmányozásához.

1. táblázat A vizsgált *C. albicans* klinikai izolátumok

Izolátumok sorszáma	Betegek kora és neme	Diagnózis	Mintavételi hely
4774	42 éves nő	Keringési elégtelenség	Vizelet
8387	10 éves lány	Langerhans sejtek hisztocitózisa	Szájüreg
10934	45 éves nő	Végbélrák	Kanül
19890	59 éves nő	Trombocitopéniás trombotikus purpura	Sebváladék
20072	34 éves férfi	Pancreatitis	Hasüregi drain

4.2. A sejtek szaporodásának vizsgálata sülyesztett kultúrában

4.2.1. A környezeti stresszválasz vizsgálata

A *C. albicans* szülői és mutáns sejteket a 4.1.2 pontnak megfelelően tenyésztettük elő. Az előtenyésztett élesztősejteket a vizsgált stresszt generáló vegyülettel kiegészített tápoldatba oltottuk be. Az optikai denzitás értéket 640 nm-en 0,1-re állítottuk be ($OD_{640, \text{kezdő}}$). A tenyészeteket 11 órán keresztül 28 °C-on, 2,3 Hz fordulaton rázattuk. A törzsek szaporodását a 11 órás inkubációs idő alatt elért abszorbancia növekedéssel (ΔOD_{640}) jellemeztük ($\Delta OD_{640} = OD_{640, 11\text{óra}} - OD_{640, \text{kezdő}}$). A kísérlet során vizsgáltuk a környezeti stresszt generáló ágensek sejtek szaporodására és a morfológia átalakulásra kifejtett hatását. A vizsgált paramétereket, vegyületeket és azok koncentrációját a **2. táblázat** tartalmazza.

Minden alkalmazott stressz generáló ágens esetében 3 párhuzamos kísérletet végeztünk, azon a hőmérséklet, pH és koncentráció értéken, ahol az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzsek stressztűrése szignifikáns ($p < 0,01$) mértékben meghaladta a szülői törzset. Emellett ágensenként 3 kontroll tenyészet szaporodását is nyomon követtük spektrofotometriásan. Az így kapott adatok statisztikai feldolgozásra kerültek. Az egyes stressz

típusok szaporodást gátló hatását ($\Delta\Delta\text{OD}_{640}$) a következőképpen határoztuk meg: a kontroll tenyészetek átlagos szaporodási értékeiből (átlag $\Delta\text{OD}_{640, \text{kontroll}}$) kivontuk a stressznek kitett tenyészetek szaporodási értékeit ($\Delta\text{OD}_{640, \text{kezelt}}$). A $\Delta\Delta\text{OD}_{640} = \text{átlag } \Delta\text{OD}_{640, \text{kontroll}} - \Delta\text{OD}_{640, \text{kezelt}}$ értékeket a szülői és mutáns törzsek, illetve minden stressz típus esetén meghatároztuk. A szignifikanciát a tBOOH mutáns ($\Delta\Delta\text{OD}_{640, \text{mutáns}}$) és a megfelelő szülői törzseknél ($\Delta\Delta\text{OD}_{640, \text{szülői}}$) feljegyzett szaporodást gátló értékek átlagai között határoztuk meg. Az élesztő, pszeudohifa és valódi hifa morfológiai formákat fénymikroszkóppal és kalkofluor fehér (CFW) festést követően fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

2. táblázat A vizsgált stressz típusok és körülmények

Oxidatív stressz	+ 1,0 mmol/l tBOOH + 2,0 mmol/l H ₂ O ₂ + 1,2 mmol/l menadion-nátrium-biszulfit (MSB) + 2,0 mmol/l NaOCl
Hiperozmotikus stressz	+ 1 mol/l KCl + 0,75 mol/l NaCl + 1 mol/l szorbit + 4 μmol/l Fludioxonil
Nehézfém stressz	+ 0,3 mmol/l AgNO ₃
Sejtfal és sejt membrán stressz	+ 80 μmol/l kongóvíz (sejtfal stressz) + 0,01 μmol/l ketokonazol (sejt membrán stressz)
nem-feltekeredett fehérje válasz (UPR)	+ 5 mmol/l 1,4-ditiotreitol (DTT)
pH stressz	4,0 (savas stressz) 10,0 (alkalikus stressz)
Hőstressz	42 °C

4.2.2. Antifungális hatás vizsgálata

A SC5314 élesztősejteket az 4.1.1 pontnak megfelelően YPD tápközegben tenyésztettük elő. Az így kapott 18 órás standard kultúrát YPD tápoldatba oltottuk, hogy a kiindulási optikai denzitás $\lambda=640$ nm-en 0,1 legyen. A tenyészeteket az adott kísérletnek

megfelelően 2 mM vagy 4 mM BM-nal, 0,3-0,5 mM MSB-tal (Sigma-Aldrich, Magyarország), 6,5 μ M flukonazollal (Flu; Molecula Limited, Egyesült Királyság), 0,13 μ M amfotericin B-vel (AmB; Duchefa Biochemie, Hollandia) vagy 1,3 μ M nisztatinnal (Nit; Duchefa Biochemie, Hollandia) egészítettük ki. A sejtuszuspenziókat 12 órán át, 37 °C-on, 2,3 Hz fordulaton rázattuk. A szaporodást 12 órán át spektrofotometriásan (λ =640 nm) követtük nyomon. Az antifungális hatást a kontroll és a kezelt kultúrák OD₆₄₀ értéke, illetve a felnövekvő telepek (CFU) száma alapján 0, 6 és 12 óra tenyésztést követően állapítottuk meg. A CFU érték meghatározásakor, az adott időközönként vett mintákkal 1:10-es léptékű sorozathígítást végeztünk el. Ezt követően 4×30 μ l mintát YPDA lemezek felszínére pipettáztunk, majd 48 órára 37 °C-os termosztátba helyeztük, végül megszámoltuk a kinőtt telepeket. A CFU értéket a hígítási adatok ismeretében határoztuk meg [Kovács és mtsai., 2013].

Az BM és a MSB közötti interakciót (IR) az Abbott-formula segítségével jellemeztük: $IR=I_o/I_e$. Az $I_e=X+Y-[XY/100]$, ahol az I_e a két szer együttes jelenlétében várható százalékos szaporodási gátlás, az X és Y a külön-külön mért szaporodási gátlások a BM, illetve a MSB jelenlétében, míg az I_o a két szer együttes jelenlétében mért százalékos szaporodási gátlás. Ha $IR>1,5$ a két szer egymás hatását erősíti (szinergizmus) [Moreno és mtsai., 2003; Toth és mtsai., 2013].

4.2.3. A hemin, CO₂ és a pH hatásának vizsgálata a *C. albicans* fonalas formáinak elágazási idejére videomikroszkóp rendszerrel

Az SC5314 sejteket a 4.1.1 pontnak megfelelően, az ATCC 14053, 4774, AF06 és 4774T *C. albicans* törzseket a 4.1.2 pontban leírtak alapján tenyésztettük elő. A 18 órán át előinkubált sejteket foszfát pufferrel (PBS) háromszor mostuk (4000×g, 4 °C, 5 perc) [Fekete és mtsai., 2007; 2008]. A sejtsűrűséget 5×10^6 sejt/ml értékre állítottuk be 5 ml térfogatú bikarbonát mentes RPMI-1640 tápközegben (Roswell Park Memorial Institute tápközeg, PAA, Németország) [Kovács és mtsai., 2013], melyet 10 % főtális marha szérummal (FBS) [13,42 mg/l hemoglobin tartalommal (0,208 μ M) és 0,83 μ M hem tartalommal (EUROCLONE, Olaszország)] egészítettünk ki. Az RPMI-FBS tápközeg elősegíti a *C. albicans* fonalas növekedését [Nagy és mtsai., 2014]. Kísérlettől függően a tápoldat pH értékét 4,2, 5,3, 7,0 vagy 8,0-ra állítottuk be, illetve egyes kísérletsorozatban az RPMI-FBS tápközeghez 50 μ g/ml hemint [76,7 μ M koncentráció (Sigma-Aldrich, Magyarország), Casanova és mtsai., 1997] is adtunk. A kultúrákat 37 °C-on légköri, 5 vagy 10 % CO₂ tenzió mellett inkubáltuk és videomikroszkóp rendszerrel nyomon követtük a hemin, a CO₂ és a pH hatását a *C. albicans*

sejtek csírázási idejére, fonal morfológiai formáinak (valódi hifa, pszeudohifa) elágazási idejére és a hifahosszra.

A felvételeket egy Carl Zeiss GFL Mikroszkóp (Jena, Németország) segítségével készítettük el, amely invert használatra lett átalakítva. A mikroszkóp 10×0,25 objektívvel, a megfigyelést szolgáló okulár kamerával (UCMOS01300KPA), vezérlő szofverrel [ToupView 3.2 softwer SXGA (1280x1024) felbontással, ToupTek Photonics, Kína] és a megvilágítást szolgáló fehér fényű „*light-emitting diode*” (LED) izzóval volt felszerelve. A megvilágítás időzítéséhez a Periodic Beper™ szofvert használtuk. A videomikroszkóp rendszer minden 40. másodpercben, több mint 4 órán keresztül felvételeket készített a kultúrákról. Az így kapott képszekvenciák alapján a valódi hifa és pszeudohifa morfológiai formák jellemezhetővé váltak a csírázásig, illetve a csírázástól az első hifa elágazásig eltelt idő alapján. A valódi hifa hosszak mérése ImageJ programmal (National Health Institute) valósult meg. Mindegyik kísérleti beállításkor 8-23 sejtet választottunk ki a statisztikai elemzéshez.

4.2.4. Túlélési képesség vizsgálata

A BM, illetve a MSB élesztősejtek túlélésére gyakorolt hatását Klepser és munkatársai (1998) által leírt idő-ölés görbék segítségével, telepszámlálással határoztuk meg. A kísérletben a 4.1.1 pontnak megfelelően előtenyésztett SC5314 sejteket, 0,9 % NaCl oldattal mostuk, majd denzitométerrel 0,5 McFarland sűrűségű (1×10^6 - 5×10^6 CFU/ml) gombaszuszpenziót készítettünk. Az így kapott kiindulási inokulumot, 10×-es hígításban bikarbonát mentes RPMI-1640 tápközegbe oltottuk. A sejteket 37 °C-on 48 óráig rázatással (2,3 Hz) inkubáltuk. Meghatározott időközönként mintát vettünk és 1:10-es léptékű sorozathígítást követően, 4×30 µl mintát YPDA lemezek felszínére pipettáztunk. A lemezeket 37 °C-on 48 óráig inkubáltuk és megszámoltuk a kinőtt telepeket. A CFU értéket a hígítási adatok ismeretében határoztuk meg [Klepser és mtsai; 1998; Kovács és mtsai., 2013].

4.3. A sejtek szaporodásának vizsgálata szilárd táptalajon

A 4.1.1 pontnak megfelelően előtenyésztett, szteroiddal előkezelt és kontroll SC5314 sejteket steril PBS pufferrel háromszor mostuk (4000×g, 4 °C, 5 perc) és a sejtsűrűséget 2×10^3 sejt/ml értékre állítottuk be. A sejtuszuszpenzióból 50 µl-t (1×10^2 sejt) YPDA táptalaj felületére szélesztettünk. Az YPDA lemezeket 30 °C-on 5 napig inkubáltuk, közben a 3. és 5. napon dokumentáltuk a telep méretben bekövetkező változásokat.

4.4. Virulencia faktorok vizsgálata

4.4.1. Csírázás vizsgálata birkaszérumban

A 18 órán át előtenyésztett sejteket, az 4.1.1 pontban leírtak alapján szteroiddal előinkubáltuk, majd az SC5314 kontroll és a BM-nal előkezelt sejteket háromszor mostuk steril PBS pufferrel ($4000\times g$, 5 perc, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) és a sejtszámot 5×10^7 sejt/ml-re állítottuk. A sejtszuspenzióból 0,25 ml-t ($1,25\times 10^7$ sejt), 2,5 ml sterilre szűrt birka szérumhoz adtuk és $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 120 percig inkubáltuk. A tenyészetekből 30, 60 és 120 perc elteltével mintát vettünk és fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk a csírázó sejtek arányát [Ghannoum, 1992; Gyetvai és mtsai, 2007].

4.4.2. Pszeudohifa és klamidospóra képzés vizsgálata kukoricaliszt táptalajon

A 4.1.1 pont alapján a szteroiddal előkezelt, illetve kezeletlen SC5314 sejteket PBS pufferrel mostuk, majd a sejtszámot 1×10^7 sejt/ml-re állítottuk be. A sejtszuspenzióból 5 μl -t (5×10^4 sejt) kukoricaliszt tartalmú lemezre [KLA-Tween, 0,19 % (w/v) kukoricaliszt, 1 % Tween-80, 2 % (w/v) agar] cseppentettünk, steril fedőlemezzel lefedtük, majd $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A morfológiát 0, 3, 6, 9, 12, 48 és 62 óra elteltével fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk és a TopView számítógépes programmal rögzítettük [Koehler és mtsai., 1999].

4.4.3. Hifázó képesség vizsgálata Spider táptalajon

A BM-nal előinkubált és kontroll SC5314 sejteket a 4.1.1 pont alapján előkészítettük és steril PBS pufferben 1×10^7 sejt/ml-re állítottuk a sejtszámot. A sejtszuspenzióból 20 μl -t (2×10^5 sejt) Spider táptalaj [1 % (w/v) tápleves („Nutrient broth”, Merck, Németország), 1 % (w/v) glükóz, 0,2 % (w/v) K_2HPO_4 és 1,35 % (w/v) agar] felszínére cseppentettünk és $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 napig inkubáltuk. A telepekről az inkubációs idő 5., 7. és 10. napján felvételeket készítettünk [Fekete és mtsai., 2007].

4.4.4. Extracelluláris foszfolipáz (EP) aktivitás meghatározása tojássárgája táptalajon

A 4.1.1 pontban leírtak szerint BM-nal előkezelt és kontroll SC5314 sejteket a PBS pufferrel háromszor mostuk és a sejtsűrűséget 1×10^7 sejt/ml-re állítottuk. A sejtszuspenzióból 5 μl -t (5×10^4 sejt) tojássárgáját tartalmazó lemez [5,85 % (w/v) NaCl, 0,05 % (w/v) CaCl_2 és 10 % (w/v) steril tojássárgája (Sigma-Aldrich, Magyarország) SDA] felületére oltottunk. A

lemezeket 3 napon keresztül, 30 °C-on inkubáltuk. Az EP aktivitást 1/Pz-1 értékkel jellemeztük, ahol a Pz érték a telep átmérőjének és a telepek körül kialakult feltisztulási zóna átmérőjének hányadosa volt [Gyetvai és mtsai., 2007].

4.5. Antioxidáns enzimaktivitások vizsgálata

A 4.1.1 pontban leírtak alapján a BM-nal kiegészített YPD tápoldatban előinkubált SC5314 sejtekhez a tenyésztés 4. órájában 1,5 mM MSB-ot adtunk, majd további 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk (2,3 Hz). A sejteket kétszer mostuk PBS pufferrel (4000×g, 10 perc, 4 °C), majd az így kapott centrifugált sejtömeget -70 °C-on tároltuk. A felolvasztott mintákat kis mennyiségű PBS pufferben vettük fel, majd üveggyönggyel (átmérő: 425-600 µm, Sigma-Aldrich, Magyarország) feltártuk. Ezt követően a sejtömeget centrifugáltuk (13000×g, 10 perc, 4 °C) és az így nyert sejtmentes extraktumot használtuk tovább a kataláz, glutation reduktáz, glutation peroxidáz, glükóz 6-foszfát dehidrogenáz és a szuperoxid dizmutáz enzimaktivitások meghatározásához. Az egyes enzimeknél a reakcióelegyek végtérfogata 1 ml volt és 10 v/v % minta mellett tartalmazta az egyes komponenseket.

4.5.1. A kataláz aktivitás meghatározása

A kataláz enzim aktivitására a hidrogén-peroxid fogyásából következtettünk. A reakcióelegy 0,1 mmol/l H₂O₂ tartalmazott 20 mmol/l HEPES pufferben (pH=7,6) oldva. A hidrogén-peroxid fogyását λ=240 nm -en 1 percig követtük nyomon [Roggenkamp és mtsai., 1974].

4.5.2. A glutation reduktáz (GR) aktivitás meghatározása

A NADPH koncentrációjának csökkenéséből következtettünk az enzimaktivitásra. A GR aktivitás meghatározásakor a reakcióelegy 0,1 mmol/l NADPH-t, 1,5 mmol/l oxidált glutationt (GSSG) tartalmazott 0,1 mol/l K-foszfát pufferben (pH=7,6) oldva. A mérés λ=340 nm -en 1 percen keresztül történt [Pinto és mtsai., 1984].

4.5.3. A glutation peroxidáz (GPx) aktivitás meghatározása

A GPx aktivitás meghatározásakor a reakcióelegy 1 mmol/l NADPH-t, 1 mmol/l redukált glutationt (GSH) , 440 U/l GR-t (1U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 µmol

GSSG-t redukál) és 0,1 mmol/l kumén-hirdoperoxidot tartalmazott TRIS/HCl-EDTA (50 mM TRIS/HCl; 0,091 mM EDTA; pH=7,6) pufferben. A reakció színváltozással járt, amit 1 percig követtük nyomon $\lambda=340$ nm-en [Chiu és mtsai., 1976].

4.5.4. A glükóz 6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) aktivitás meghatározása

A G6PD enzim meghatározásakor a reakcióelegy 1 mmol/l glükóz-6-foszfátot, 1 mmol/l NADP-t és 200 mmol/l $MgCl_2$ tartalmazott 20 mmol/l HEPES pufferben (pH=7,6) oldva. A reakcióelegy abszorbancia változását $\lambda=340$ nm-en 1 percig követtük nyomon [Emri és mtsai., 1994].

4.5.5. Szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás meghatározása

A teljes SOD aktivitás [SOD(CuZn)+ SOD(Mn)] meghatározásakor 1,4 mmol/l nitro-kék tetrazolium kloridot („nitro-blue tetrazolium chloride”, NBT) és 0,2 mmol/l xantint tartalmazó reakcióelegyet 50 mmol/l K-foszfát pufferben (pH= 7,8) oldottuk fel. A reakciót K-foszfát pufferben oldott 10 U/l xantin oxidáz (1U az az enzim mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol xantint alakít át karbamiddá) hozzáadásával indítottuk el és 1 percig $\lambda=560$ nm-en detektáltuk a reakcióelegy abszorbancia változását [Oberley & Spitz, 1984].

4.5.6. Fehérjetartalom mérése

Az antioxidáns enzimaktivitásokat a felülúszó fehérjetartalmára vonatkoztattuk. A feltárt minták 20 μ l felülúszójához 1 ml Bradford reagenst adtunk és 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően $\lambda=595$ nm-en mértük a minták fehérjetartalmát [Bradford, 1976]. A GR, GPx és G6PD enzimek aktivitását mkat/kg protein, a kataláz koncentrációját kat/kg protein mértékegységben adtuk meg. A SOD aktivitást Unit (mg protein)⁻¹ egységekben tüntettük fel, ahol 1U az az enzim mennyiség volt, amely az NBT redukciójában 50 %-os gátlást okozott.

4.6. A sejtek oxidált és redukált glutation tartalmának mérése

Az SC5314 élesztősejteket a 4.5. pontban leírtak alapján tenyésztettük. Az oxidált és redukált glutation méréséhez 20 ml tenyészetet centrifugáltunk, melyet 1 ml 4 °C-ra hűtött 5 w/v % 5'-szulfoszalicilsav oldatban inkubáltuk (20 perc, 4 °C). Újabb centrifugálást követően a felülúszót trietanolamin segítségével közömbösítettük. A mérésekhez használt reakcióelegy

115 mmol/l Na-foszfát pufferben (pH= 7,5), 50 mmol/l EDTA-t, 0,6 mmol/l 5,5'-ditio-bisz-(2-nitrobenzoésav)-at (DTNB), 0,2 mmol/l NADPH-t, 1,5 kU/l GR-t tartalmazott, melyhez a GSH mérése esetén 25 μ l, a GSSG-nél pedig 100 μ l mintát adtunk. A DTNB redukálódásának sebességét $\lambda=412$ nm-en detektáltuk. A minták GSSG tartalmának a meghatározásakor a GSH tartalmat előzetesen 2-vinilpiridines (185 mmol/l, 4 °C, 1 óra, pH= 6-7) kezeléssel reagáltattuk el. A GSSG mennyiségét kalibráló sor segítségével határoztuk meg [Anderson, 1985].

A GSH tartalom meghatározásakor a minta teljes glutation tartalmát (GSH+GSSG) mértük meg. A GSH mennyiségét a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával és a GSSG tartalom ismeretében számoltuk ki. A mért mennyiségeket a sejtek fehérje tartalmára vonatkoztattuk és mmol/kg protein mértékegységben adtuk meg [Anderson, 1985].

4.7. A reaktív részecske (RS) tartalom meghatározása

A RS tartalom vizsgálatánál a 4.5. pont alapján tenyésztett SC5314 élesztősejtekhez 10 μ mol/l 2',7'-diklórfluoreszcin diacetátot (Molecular Probes Europe BV, Hollandia) adtunk és 1 órán át, 37 °C-on 2,3 Hz fordulaton rázattuk [Halliwell & Gutteridge, 2007]. A mintákat PBS pufferrel történő mosást követően (10 perc 4 °C, 13000 $\times$ g) 5 w/v % 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel (20 perc, 4 °C). Újabb centrifugálást követően a felülúszót 0,5 mol/l NaOH oldattal történő közömbösítést követően használtuk fel a méréshez. A 2',7'-diklórfluoreszcin-diacetátból 1 óra inkubálás alatt képződő fluoreszcens termék, a 2',7'-diklórfluoreszcin (DCF) koncentrációját Jasco 821-FP típusú spektrofluoriméterrel határoztuk meg ($\lambda_{ext,DCF}=502$ nm; $\lambda_{em,DCF}=523$ nm). A képződött DCF mennyiségét 1000 F/OD₆₄₀ nm mértékegységben adtuk meg, ahol F megfelel, a sejtmentes kivonat által képződött DCF fluoreszcenciájával [Royall & Ischiropoulos, 1993; Emri és mtsai., 1997].

4.8. Patogenitás vizsgálatok

4.8.1. A kísérletekben használt sejtvonalak és fenntartásuk

A **TR146** emberi szájüregi pikkelysejtes karcinóma eredetű epitélium sejtvonal (Cancer Research Technology, London) sejtjeit 1 mM Na-piruvátot, 2 mM L-glutamint és 10 % FBS-t tartalmazó DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) tápközegben tenyésztettük. A **C2BBe1** (Caco-2 klón) egy emberi kolorektális adenokarcinómából létrehozott sejtvonal (ATCC). A sejteket 0,01 mg/ml holotranszferinnel (Merck, Németország), aminosavakkal és 10 % FBS-el

kiegészített DMEM tápközegeben növesztettük. Az **A-431** hüvelyi epitélium sejtvonal, amely emberi epidermális karcinómából származik (ACC 91; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Németország). A sejteket 1 mM Na-piruvátot, 2 mM L-glutamint és 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápközegeben tartottuk fenn. A sejtvonalak tenyésztése minden esetben 37°C-on, 5 % CO₂ tenzió mellett, párasított inkubátorban történt. A tápközeget 2-3 naponta cseréltük, a sejteket kétszer egy héten passzáltuk.

A *C. albicans* adhéziós és invazív képességének meghatározásához 1×10⁵ (/ml) epitélium sejtet üveg fedőlemezekre osztottunk szét, melyeket előzőleg 24 mintahelyes ELISA mikrolemez üregeibe helyeztük el. A C2BBel sejtek esetében a szétoosztásukat megelőző napon az üveg fedőlemezeket 10 µg/ml patkányfarok kollagénnel (Invitrogen, USA) vontuk be. Az ELISA lemezeket 2 (TR146 és A-431 sejtek) vagy 3 napig (C2BBel sejtek) inkubáltuk (37 °C, 5 % CO₂). A citotoxicitás és citokin szintek meghatározásához 2×10⁴ (/ml) epitélium sejtet osztottunk szét a 96 mintahelyes ELISA mikrolemez üregeibe. A lemezeket 1 (TR146 és A-431 sejtek) vagy 3 napig (C2BBel sejtek) inkubáltuk 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalom mellett [Giard és mtsai., 1973; Dalle és mtsai., 2010; Wächtler és mtsai., 2011 a,b].

4.8.2. Epitélium sejtek *in vitro* fertőzése

A *C. albicans* SC5314 törzset a 4.1.1 pontban leírtak alapján 30 °C-on előtenyésztettük, majd a 1 vagy 2 mM BM-nal kezelt és kezeletlen mintákat 30 °C-on, 3 Hz rázatás mellett 6 órán keresztül inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk PBS pufferrel és a sejszámot 2×10⁵ sejt/ml-re állítottuk be az epitélium sejtvonal tenyésztésétől függően DMEM vagy RPMI-1640 tápközegeben.

Az ELISA mikrolemez üregeibe szétoosztott epitélium sejteket közvetlenül a fertőzést megelőzően steril PBS pufferrel mostuk, majd FBS-mentes 0, 1 vagy 2 mM BM-nal kiegészített DMEM vagy RPMI-1640 tápközeget adtunk a sejtekhez. A megfelelő sejsűrűségű BM-nal kezelt vagy kezeletlen *C. albicans* sejszuszpenzióval fertőzött epitélium sejteket 1 órán (adhézió vizsgálata), 3 órán (hifahossz és invazív képesség meghatározása) vagy 24 órán (citotoxicitás és citokin szint meghatározása) keresztül inkubáltuk (37 °C, 5 % CO₂). A citotoxicitás és a citokin szintek meghatározásánál *C. albicans* kultúrával nem fertőzött kontroll mintákat is készítettünk [Dalle és mtsai., 2010; Wächtler és mtsai., 2011 a,b].

4.8.3. A *C. albicans* adhéziós képességének vizsgálata

A 24 mintahelyes ELISA mikrotiter lemez üregeibe helyezett korong alakú fedőlemezeken tenyésztett epitélium sejteket a 4.8.2 pontban leírtak alapján *C. albicans* SC5314 törzzsel fertőztük. Az 1 óra inkubációs időt és háromszori PBS mosást követően a mintákat 4 % paraformaldehiddel fixáltuk egy éjszakán át. A fixálást követően a letapadt *C. albicans* sejteket CFW fluoreszcens festékkel jelöltük. Végül a fedőlemezeket a fluoreszcens jel gyengülését lassító ProLong Mounting oldattal tárgylemezre rögzítettük. A minták vizsgálata és elemzése fluoreszcens mikroszkóppal (Leica DM5500B, Leica DFC360 FX) történt. A letapadt sejtek számát 100 jelölt élesztősejt megszámlálásával, véletlenszerűen kiválasztott $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ méretű mezőkben határoztuk meg [Dalle és mtsai., 2010; Wächtler és mtsai., 2011 a,b]. Az egyes mezőkben meghatározott adherens gombasejteket ezt követően átlagoltuk. A letapadt sejtek %-os meghatározása a következő képlettel történt, ahol az ELISA mikrolemez ürege (mintahely) $1,9 \times 10^8\ \mu\text{m}^2$ méretű, a látótér mérete $4 \times 10^4\ \mu\text{m}^2$, a fertőzéskor használt *Candida* sejtek száma 10^5 (sejt/üreg) volt:

$$\text{adhézió (\%)} = \frac{\text{a letapadt sejtek átlaga} \times \text{mintahely mérete } \mu\text{m}^2\text{-ben}}{\text{a látótér mérete } \mu\text{m}^2\text{-ben} \times \text{a fertőzéskor használt } \textit{Candida} \text{ sejtek száma}} \times 100$$

4.8.4. A *C. albicans* invazív képességének vizsgálata

Az epitélium sejtek tenyésztése és *C. albicans* törzzsel történő fertőzése a 4.8.1 és 4.8.2 pontokban leírtak alapján történt. A 3 óra inkubációs időt követően a mintákat 4.8.3.-as pontban ismertett módon előkészítettük a fluoreszcens jelöléshez. Az extracelluláris *C. albicans* hifákat Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált szukcinált concanavalin A-val (Alexa-ConA) jelöltük. 1 óra inkubálási idő után az epitélium sejteket 0,5 % Triton X-100-al permeabilizáltuk, majd a *C. albicans* hifákat CFW fluoreszcens festékkel jelöltük lehetővé téve az invazív (csak CFW jelölt) és nem invazív (CFW és Alexa-ConA jelölt) hifák vizsgálatát. A fedőlemezeket „ProLong Mounting” oldattal tárgylemezre rögzítettük. A hifák hosszát és az invazív *C. albicans* hifák számát fluoreszcens mikroszkóppal (Leica DM5500B, Leica DFC360 FX) határoztuk meg. A minták vizsgálatánál legalább 50 invazív gombasejtet számoltunk meg fedőlemezenként [Dalle és mtsai., 2010; Wächtler és mtsai., 2011 a,b]. Az invazív hifák %-os meghatározása a következő képlettel történt:

$$\text{invazív hifák (\%)} = \frac{\text{csak CFW festékkel jelölt invazív hifák száma}}{\text{a megfestődött össz hifa szám}} \times 100$$

4.8.5. Citotoxicitás vizsgálat a laktát- dehidrogenáz felszabadulás mérésével

Sejtsérülés vagy sejthalál alkalmával a felülúszóba kerülő laktát dehidrogenáz enzim mennyiségét (LDH) citotoxicitást detektáló kit (Roche, Németország) segítségével határoztuk meg. Az LDH enzimaktivitás mérésének első lépésében a LDH enzim a tejsavat piruváttá oxidálja, miközben a NAD^+ NADH/H^+ -á redukálódik. A reakció második lépésében a keletkezett redukált koenzim a sárga indonitrotetrazólium só vörös formazánná történő redukálásakor regenerálódik. A létrejött színváltozást $\lambda=490$ nm-en detektáljuk.

A 96 lyukú ELISA mikrotiter lemez üregeiben tenyésztett epitélium sejteket a 4.8.2 pontban leírtak alapján *C. albicans* SC5314 törzzsel fertőztük. A 24 órás inkubációs időt követően a minták $10\times$ -re hígított felülúszóját citotoxicitást detektáló oldattal 25 percig, sötétben inkubáltuk. Az inkubációs idő lejártá után a reakciót $50\ \mu\text{l}$ 1M HCl oldattal állítottuk le. Az abszorbancia változást 490 nm-en detektáltuk. A *C. albicans* élesztővel nem fertőzött és BM-nal nem kezelt epitélium sejteknél (kis citotoxicitási kontroll) kapott abszorbancia értékeket a kiértékeléskor kivontuk a többi mintánál detektált OD értékből. A pozitív lízis kontrollokat (*C. albicans* sejtekkel nem fertőzött és BM-nal nem kezelt epitélium sejtek) a 24 órás inkubációs időt követően 0,1 % Triton X-100 reagenssel roncsoltuk szét, és az így mért LDH értékeket tekintettük 100 %-os sejt károsodásnak (nagy citotoxicitási kontroll) [Dalle és mtsai., 2010; Wächtler és mtsai., 2011 a,b].

4.8.6. Citokin koncentráció meghatározása

A 96 lyukú ELISA mikrotiter lemez üregeibe tenyésztett epitélium sejteket a 4.8.2 pontban leírtak alapján szteroiddal kezelt, illetve kezeletlen *C. albicans* SC5314 sejtekkel fertőztük. 24 óra inkubációs időt követően a minták felülúszójából eBioscience ELISA kit segítségével határoztuk meg az interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) koncentrációkat. Először az interleukinra specifikus ellenanyagot vittünk fel az ELISA mikrotiter lemez üregeibe, és egy éjszakás $4\ ^\circ\text{C}$ -on történő inkubációt követően az üregeket 0,05 % Tween-20-PBS mosó pufferrel mostuk. A hígító puffer bemérését, majd egy órás inkubációt és mosást követően a hígított standard sort, illetve a mintákat vittük fel a lemezre. Újbóli mosást követően az immobilizált ellenanyaghoz kitapadt interleukinok kimutatására specifikus detektáló ellenanyagot vittünk be a rendszerbe. Az egy órás inkubációs idő után az üregekbe torna-peroxidáz oldatot mértünk be, majd fél óra elteltével, illetve az üregek mosását követően hidrogén-peroxid szubsztrát oldatot adtunk. A rendszerben maradt torna-peroxidáz bontotta a kromogént tartalmazó hidrogén-peroxid szubsztrátot, amit sárga színváltozás jelzett. A reakciót

1M H₃PO₄ oldattal állítottunk le. Az abszorbancia értékeket 450 nm hullámhosszon határoztuk meg, ami arányos volt a minták pg/ml-ben kifejezett interleukin tartalmával. Referencia hullámhosszként 570 nm-t használtunk a méréshez [Wilson és mtsai., 2013].

4.9. Statisztika

A statisztikai elemzésekhez az átlagokat és szórásokat (S.D.) három független kísérlet adataiból határoztuk meg. A szignifikancia vizsgálatokhoz Student-féle t tesztet, Welch-féle t próbát vagy Tukey-féle tesztet (GraphPad Prism 7) használtunk. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A *C. albicans* fonalas formáinak vizsgálatokor kapott elágazási idők statisztikai kiértékelésénél a Welch-féle t próbával [Welch, 1947] elvégzett páronkénti összehasonlítást követően kapott p értékek korrigálása Holm-módszerrel [Holm, 1979] történt. Az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzsek általános stresszválaszának vizsgálatokor a p értékek egyoldalú t teszteket követő Holm (1979) korrekcióval lettek meghatározva. Mind a két kísérletsor esetében a statisztikai elemzés 3.1.2 verziószámú R interaktív statisztikai számítási környezet (R Core Team, 2014) segítségével történt.

A *C. albicans* epitélium sejtekkel történő interakciójának a vizsgálatokor kapott adatok statisztikai kiértékelésekor 2-utas ANOVA varianciaanalízist és Tukey-féle tesztet alkalmaztunk.

4.10. Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált vegyszerek, ha másképpen nem jelöltük az eredetet, akkor a Sigma-Aldrich Kft. (Magyarország) és a VWR International Kft. termékei voltak.

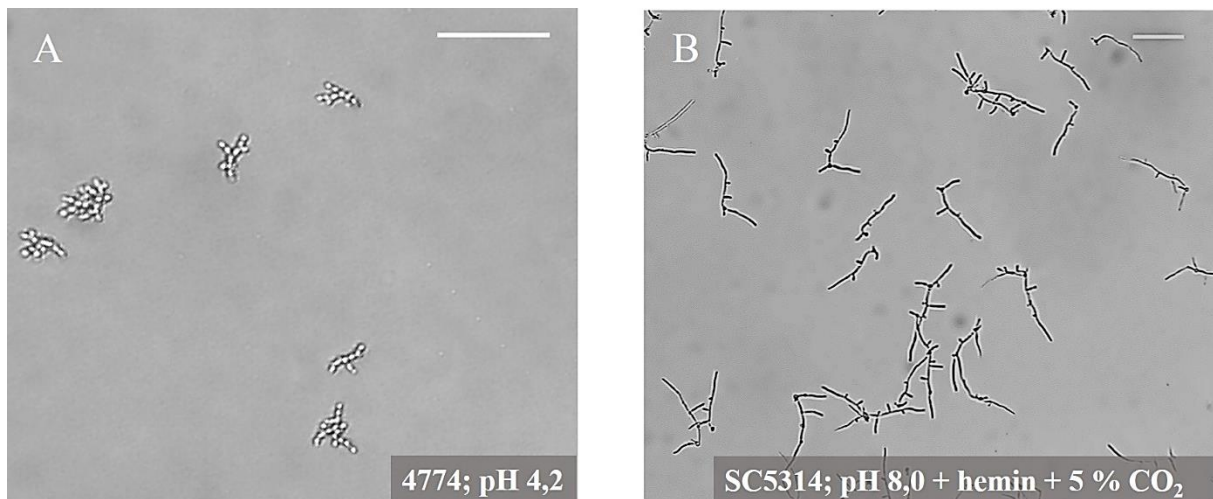
5. Eredmények

5.1. Környezeti faktorok hatása a *C. albicans* morfológiai átalakulására

5.1.1. A hemin, szén-dioxid és pH hatása a *C. albicans* fonalas formáinak elágazási idejére

A kísérletekben a CO₂ és a hemin *C. albicans* morfológiai átalakulására gyakorolt hatását vizsgáltuk a *C. albicans* által elfoglalt anatómiai helyekre, azaz a szájüregre (pH 4,5-8,0), a gasztrointesztinális traktusra (pH 2,0-8,0), illetve a hüvely lumenére (pH 4,1-5,5, a menstruációs ciklus 2. napján pH 6,7) jellemző pH értékeken. A CO₂ tenzió kiválasztásánál a szájüregre (légköri CO₂ tenzió), a gasztrointesztinális traktusra [5,1-29 (v/v) %] és a hüvely lumenére [6,1-8,3 (v/v) %] jellemző értékeket vettük figyelembe. A hemint a morfológiai átalakulást kiváltó legkisebb 50 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A *C. albicans* fonalas növekedését elősegítő RPMI-FBS tápközeghez adott heminnel a szervezetben kialakuló vérzést szerettük volna modellezni kísérleteinkben.

A videomikroszkóp rendszerünkkel gyűjtött adatok alapján elmondható, hogy a *C. albicans* törzsek pH 7,0 és pH 8,0 értékeken valódi hifa morfológiát képeztek, függetlenül a hemin jelenlététől vagy az alkalmazott CO₂ tenziótól. Ezzel ellentétben a savas pH értékek (pH 4,2, pH 5,3) teljesen gátolták a valódi hifa morfológia kialakulását, elősegítve a pszeudohifa morfológia megjelentését. Az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzsek a szülői törzsekhez hasonlóan vagy valódi hifa (pH 7,0 és 8,0), vagy pszeudohifa (pH 4,2 és 5,3) morfológiai formát mutattak (**6. ábra**).



6. ábra A *C. albicans* jellegzetes morfológia formái. A *C. albicans* törzsekre jellemző pszeudohifa (A) és valódi hifa (B) morfológiai formákat videomikroszkóp rendszerrel (skála=100 µm) készített felvételeken mutatjuk be. A fonalas morfológia megjelenését savas (pH 5,3 és 4,2- pszeudohifa forma), semleges (pH 7,0- hifa forma) vagy alkalikus (pH 8,0- hifa forma) pH értékű 50 µg/ml heminnel kiegészített RPMI-FBS tápközegben vizsgáltuk. A kultúrákat légköri, 5 vagy 10 % CO₂ tenzió mellett inkubáltuk.

A kísérleteinkkel megpróbáltunk bevezetni egy könnyen adaptálható, számszerűsíthető paramétert a fonalas morfológiai formák jellemzésére és a *C. albicans* sejtek fiziológiai állapotának, virulenciájának a leírására. A csírázási idő (csírázás megkezdéséig eltelt idő), az elágazási idő (a csírázástól az első hifa elágazásig eltelt idő) és a hifahossz (a hifa csúcstól az első hifa elágazásig) mérést végeztük el a *C. albicans* kultúrákban.

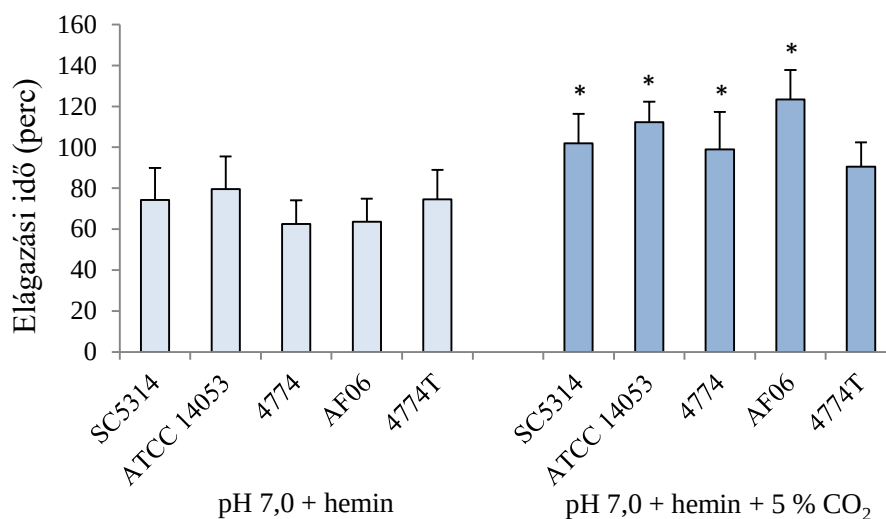
A pH, CO₂ és a hemin számos esetben szignifikánsan befolyásolta a sejtek csírázási idejét, de ezen változások törzsspecifikusnak bizonyultak, így a vizsgált körülmények között általános tendenciát nem tudtunk megállapítani.

A csírázási idővel szemben az elágazási időkben tapasztalt változásokat az alkalmazott tenyésztési körülmények befolyásolták. Az 5 % CO₂ jelenléte megnövelte az első hifa elágazásig eltelt időt a hemint tartalmazó pH 7,0 semleges kémhatású kultúrákban (**7.A ábra**). Továbbá, a heminnel kiegészített kultúrák pH értékének semlegesről (pH 7,0) alkalikusra (pH 8,0) történő változtatása 5-ből 4 törzs esetében az elágazási idők szignifikáns növekedést (1,37-1,9-szeres) eredményezte (**7.B ábra**). A vizsgált körülmények elágazási időkre gyakorolt hatásáról megállapítható, hogy a heminnel kiegészített pH 7,0 értékű kultúrákat jellemezte a legrövidebb elágazási idő, azonban a pH alkalikus felé történő eltolódása és/vagy 5 % CO₂ tenzió alkalmazása az elágazási idő növekedését eredményezte.

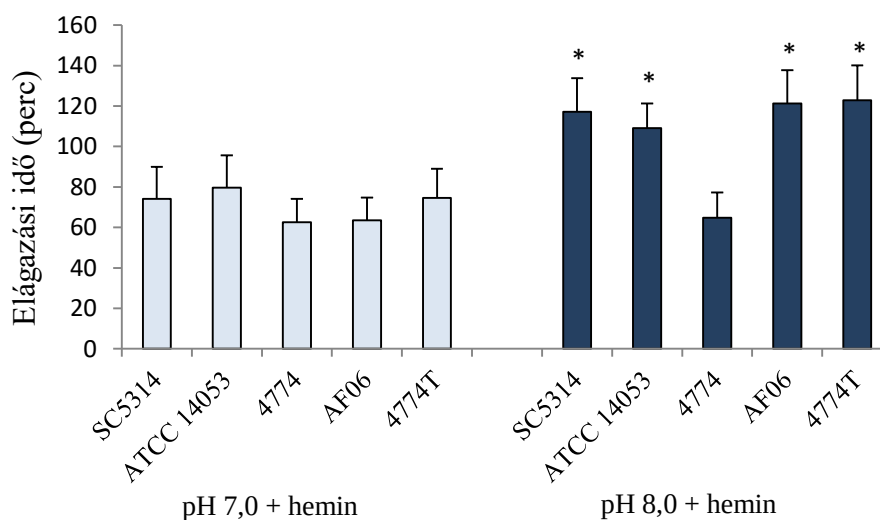
A **8. ábrán** látható, hogy az elágazási idők erős korrelációt mutattak az első elágazás megjelenésekor mért hifahosszakkal. Az elágazási idővel ellentétben, a *C. albicans* hifák

növekedési sebességét nem befolyásolta a pH (pH 7,0 vagy 8,0), továbbá a CO₂ (légköri vagy 5 %) és a hemin jelenléte sem, ugyanis a hosszabb elágazási idő hosszabb hifa hosszal, és így hasonló növekedési sebeséggel társult.

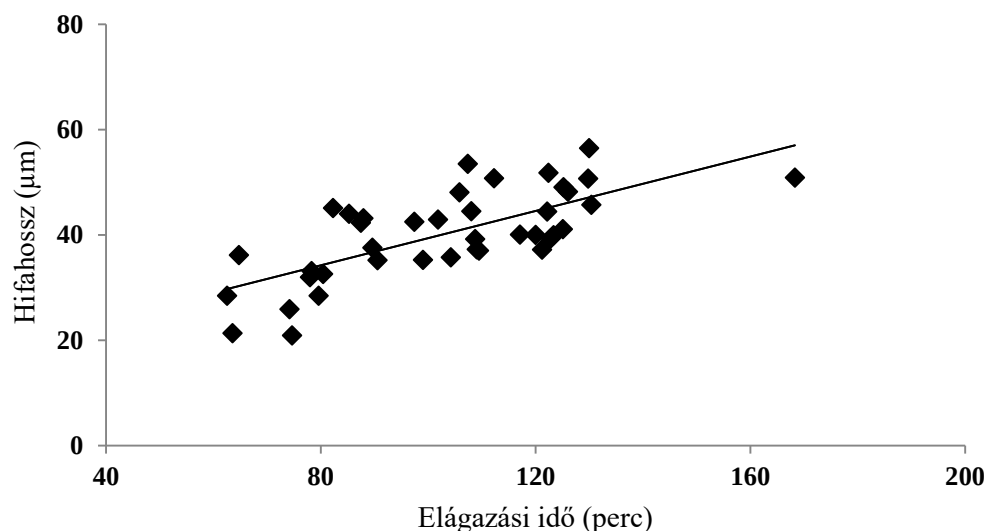
A



B



7. ábra A szén-dioxid (5 % CO₂; A rész) és a pH (pH 7,0 és 8,0; B rész) hatása az egyes *C. albicans* törzsek elágazási idejére. * Szignifikánsak a különbségek (p<0,05) egyazon törzs különböző kultúrái között.

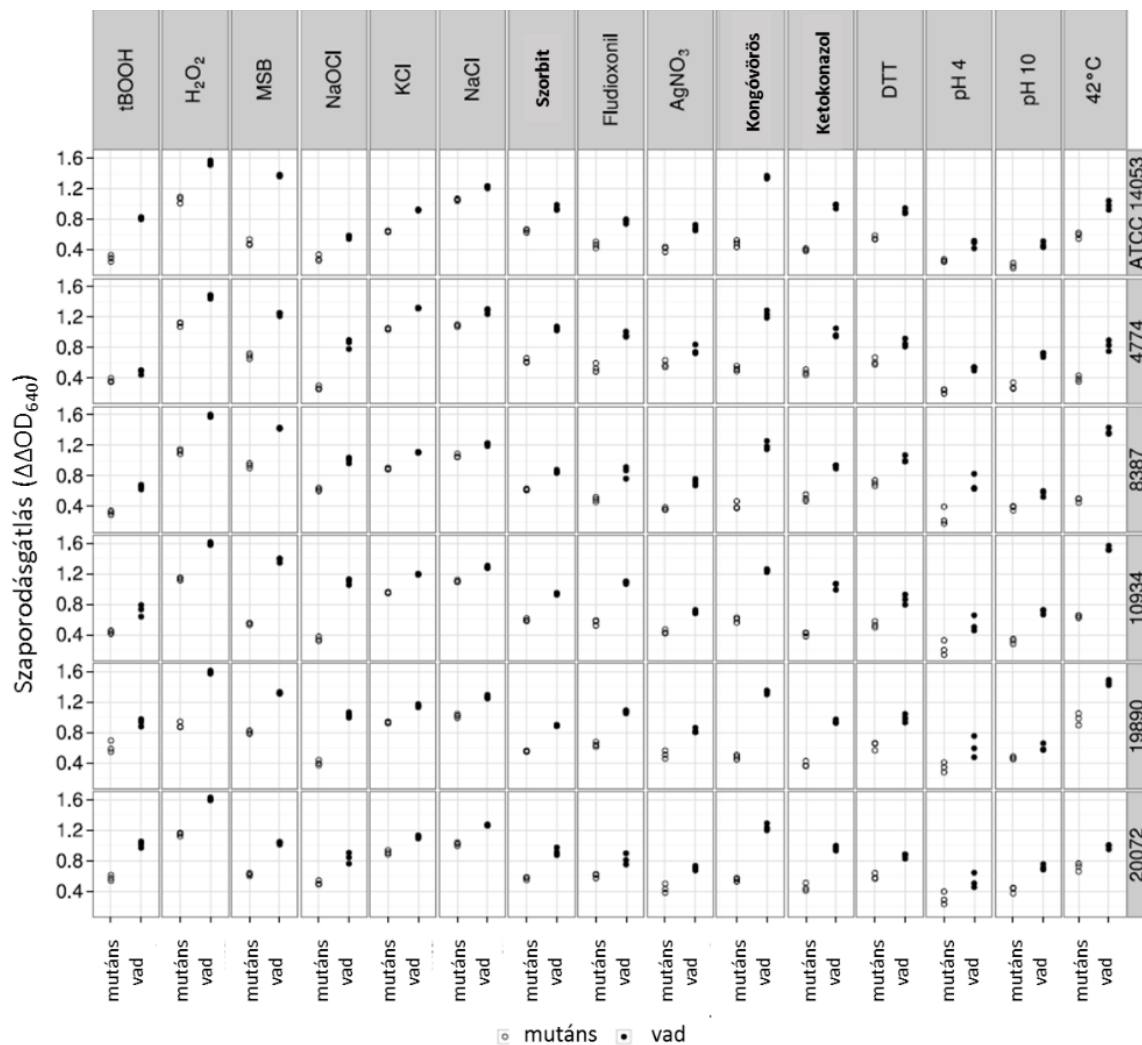


8. ábra A hifa növekedését jellemző morfológiai paraméterek összehasonlítása semleges és alkalikus pH értékeken vizsgált *C. albicans* kultúrákban. Az elágazási idők átlaga (perc) és az első elágazás megjelenésekor meghatározott hifahossz (μm) átlaga közötti korrelációt Pearson féle korrelációs koefficienssel (r) jellemeztük, ami $r=0,71$ -nek adódott, azaz igen szoros kapcsolatot találtunk a két paraméter között.

5.1.2. Stressz keresztvédelem vizsgálata az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzseken

A *C. albicans*nak saját védelme és homeosztázisa fenntartása érdekében alkalmazkodnia kell az élőhelyén kialakuló és egyben gyorsan változó környezeti stresszhatásokhoz. A *S. cerevisiae* és a *S. pombe* élesztőknél már bebizonyosodott a keresztvédelem jelenléte, de *C. albicans*nál még bizonytalan a megléte. Így kísérleteinkben a *C. albicans* szülői és az oxidatív stresszhez alkalmazkodott mutáns sejteket mindazon stresszhatásnak kitettük, amivel a gazdaszervezetben találkozhat.

Az egyes stressz típusok sejtszaporodást gátló hatását leíró adatok R statisztikai környezettel [R Core Team, 2013] történő elemzését követően láthatóvá vált, hogy az *tBOOH* toleráns *C. albicans* törzseknél kapott értékek ($\Delta\Delta\text{OD}_{640}$, mutáns) mindegyik stressz generáló ágens esetén, függetlenül annak hatásától, szignifikánsan kisebbnek adódtak, a megfelelő szülői törzseknél feljegyzett adatoknál ($\Delta\Delta\text{OD}_{640}$, szülői) (**9. ábra**). Az egyoldalú *t* tesztek követő Holm (1979) korrekcióval meghatározott *p* értékek nem haladták meg 0,037 értéket. Megállapíthatjuk tehát, hogy az *tBOOH* toleráns törzsek megnövekedett oxidatív stressz toleranciája megerősítette a gomba oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, UPR-t kiváltó, pH (savas és alkalikus) és hőstresszt toleráló képességét is.



9.ábra A tBOOH toleráns *C. albicans* mutáns (szürke karika) és a megfelelő szülői (fekete pontok) törzsek vizsgálatánál alkalmazott stressz generáló ágensek okozta sejtszaporodás gátlásai. A tenyészetek szaporodását 11 órán át spektrofotometriásan ($\lambda=640$ nm) követtük nyomon. Az egyes stressz típusok szaporodást gátló hatását (ΔOD_{640}) a következőképpen határoztuk meg: a kontroll tenyészetek szaporodási értékeinek átlagából (átlag ΔOD_{640} , kontroll) kivontuk a stressznek kitett tenyészetek szaporodási értékeit (ΔOD_{640} , kezelt). A $\Delta\Delta\text{OD}_{640} = \text{átlag}\Delta\text{OD}_{640, \text{kontroll}} - \Delta\text{A}_{640, \text{kezelt}}$ értékeket minden törzs és minden stressz típus esetén meghatároztuk.

Mindezek után megvizsgáltuk, hogy a megnövekedett oxidatív stressz tolerancia által eredményezett általános stressz tolerancia kapcsolatban áll-e a *C. albicans* morfológiai átalakulásával. A **3. táblázatban** összefoglalt morfológiai változások csak igen lassan, az inkubáció idő második felében, 6-12 óra elteltével váltak megfigyelhetővé. Kivételt jelentenek ez alól a 42 °C-os hősokknak kitett tenyészetek, ahol az élesztő→hifa morfológiai átalakulás már az inkubációs idő 3. órájában megfigyelhető volt.

A **3. táblázatban** láthatjuk, hogy a vizsgált *C. albicans* szülői és mutáns törzsek kizárólag élesztő formában szaporodtak stresszmentes körülmények között, az

élesztő→(pszeudo)hifa morfológiai átalakulást különböző típusú környezeti stresszhatások váltották ki. A hőstressz (42 °C) minden tesztelt törzs esetén élesztő→hifa morfológiai átalakulást indukált, függetlenül azok *tBOOH* toleranciától. Emellett az oxidatív stresszt kiváltó H_2O_2 eredményezett a legtöbb esetben élesztő→pszeudohifa transzformációt a tanulmányozott törzseknél (**3. táblázat, 10. ábra**).

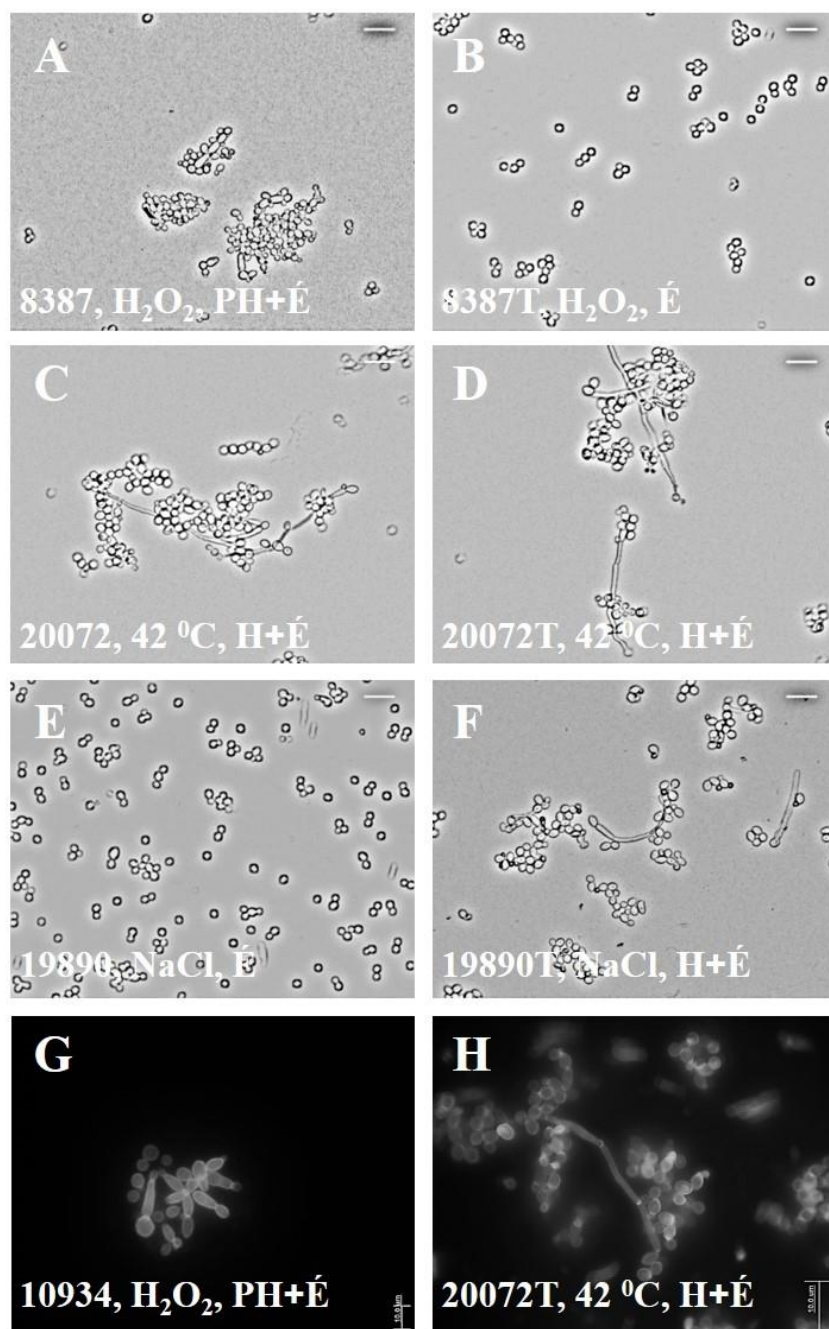
Az vizsgált stresszkörülmények között a *C. albicans* mutáns törzsek *tBOOH* toleranciája a 8387T törzs esetén gátolta, a 19890T törzsnél indukálta az élesztő→(pszeudo)hifa morfológiai átalakulást a szülői törzsekhez viszonyítva, azonban a legtöbb törzs és stresszhatás esetén az egyetlen megfigyelhető morfológiai forma az élesztő volt (**3. táblázat**).

A fonalas morfológiai formák (hifa, pszeudohifa) előfordulásának gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a *tBOOH* toleráns mutáns (élesztő: hifa: pszeudohifa - 100: 7,29: 7,29) és vad típusú (élesztő: hifa: pszeudohifa - 100: 6,25: 8,33) törzseknél. A morfológiai átalakulás százalékos eloszlása, a pszeudohifa és a hifa formákat tekintve, megegyezett a mutáns (14,58 %) és a szülői (14,58 %) sejteknél (**3. táblázat**). Fontos megjegyezni, hogy a fonalas sejt morfológiát csak élesztősejtekkel kevert formában figyeltük meg a tanulmányozott tenyészetekben (**3. táblázat**).

3. táblázat A *Candida albicans* szülői és *tBOOH* toleráns törzsek morfológiája az alkalmazott stresszt kiváltó ágensek jelenlétében.

Stressz- körülmények	ATCC 14053	AF06	4774	4774T	8387	8387T	10934	10934T	19890	19890T	20072	20072T
Kontroll	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
<i>tBOOH</i>	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
H ₂ O ₂	PH+É	PH+É	PH+É	É	PH+É	É	PH+É	É	É	É	É	É
MSB	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
NaOCl	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	PH+É	É
KCl	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É
NaCl	É	É	É	É	É	É	É	É	É	H+É	É	É
Szorbit	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É	É
Fludioxonil	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
AgNO ₃	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
Kongóvörös	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É
Ketokonazol	É	É	É	PH+É	É	É	É	É	É	É	PH+É	PH+É
DTT	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É	É
pH 4,0	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É	É	É
pH 10,0	É	É	É	É	É	É	É	É	É	PH+É	É	É
42 °C	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É	H+É

A tenyészetekben megfigyelt morfológiai formák az élesztő (É), hifa (H) és a pszeudohifa (PH) voltak. A hifa és pszeudohifa morfológia élesztősejtekkel kevert formában való megjelenését a H+É, PH+É jelöli. A morfológiai formák előfordulása (É: H: PH-100: 6,77: 8,33 összes vizsgált törzsnél) kis mértékben különbözött a vad-típusú (É: H: PH-100: 6,25: 8,33), valamint *tBOOH*-toleráns (É: H: PH-100: 7,29: 7,29) törzseknél. A morfológiai átalakulás százalékos eloszlása (15,1 % az összes vizsgált törzsnél) a PH és a H formákat tekintve megegyezett a mutáns (14,58 %) és a vad típusú (14,58 %) sejteknél.



10. ábra A környezeti stressznek kitett *C. albicans* törzsekre jellemző morfológiai formák. Az élesztő (É), pszeudohifa (PH), hifa (H) formákat fénymikroszkóppal (A-F; skála= 20 μm) és fluoreszcens mikroszkóppal (G és H; skála=10 μm) készített felvételeken mutatjuk be.

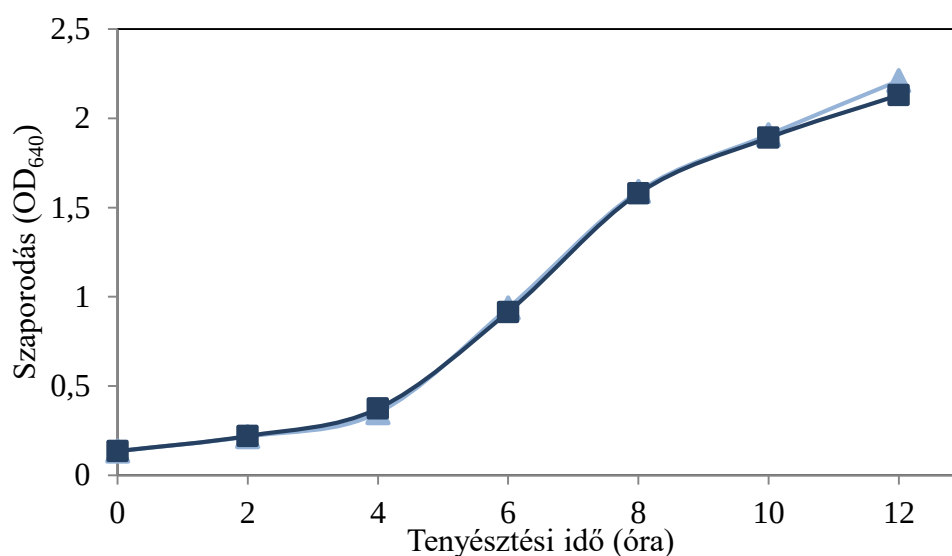
5.2. A betametazon hatása a *C. albicans* szaporodására és virulenciájára

5.2.1. Betametazon hatása a *C. albicans* szaporodására

A BM *C. albicans* SC5314 szaporodására gyakorolt hatást 1-4 mM koncentrációban, süllyesztett kultúrában (YPD) és szilárd (YPDA) tápközegen egyaránt megvizsgáltuk. A 4 mM

BM-nal kezelt minták szaporodásában nem figyelhető meg különbség a kontroll tenyészetéhez képest, sem folyadék kultúrában (**11. ábra**), sem pedig a YPD agar tápközegen.

A további fiziológiai vizsgálatokban preferáltan 4 mM koncentrációban alkalmaztuk a BM-t. Ha szignifikáns különbséget tapasztaltunk ezen a koncentráción, a 2 mM BM hatását is teszteltük.



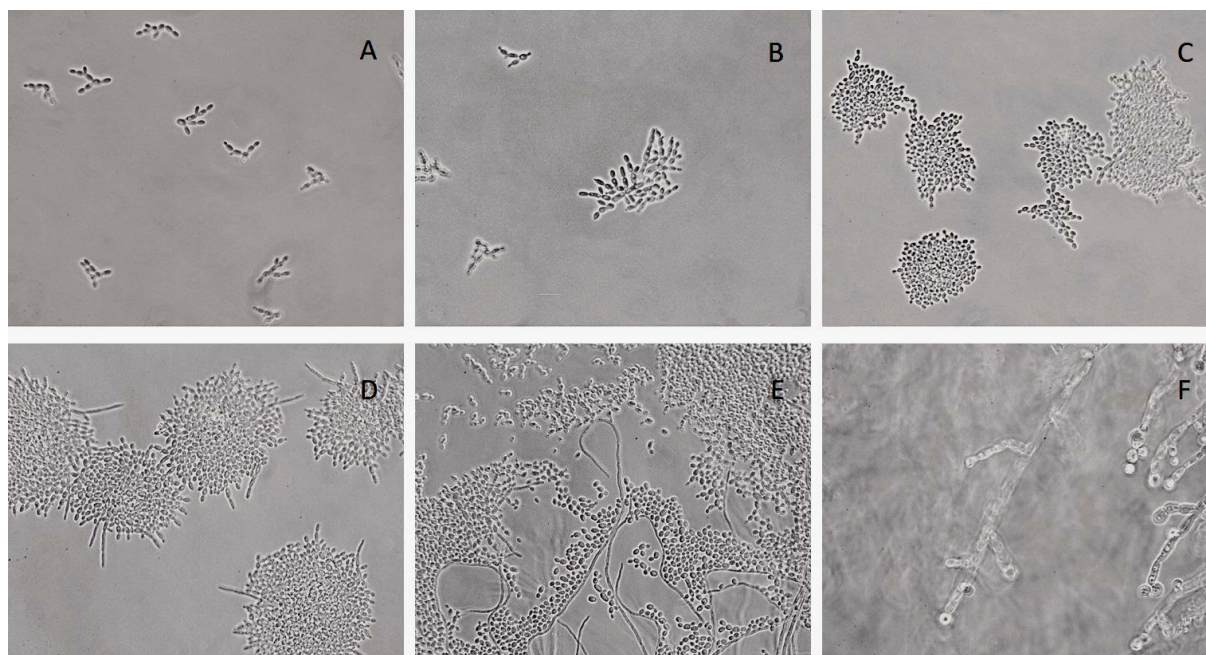
11. ábra A kontroll (▲) és BM-al kezelt (■) *C. albicans* SC5314 szaporodása YPD süllyesztett kultúrában.

5.2.2. Csírázás vizsgálata birka szérum jelenlétében

A kontroll és a 4 mM BM-nal előkezelt sejtek csírázókéességét birka szérum jelenlétében, a csírázó sejtek számával határoztuk meg. A vizsgálati körülmények között a BM nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek csírázását 60 perc elteltével (**4. táblázat**).

5.2.3. Pszeudohifa és klamidospóra képzés kukoricaliszt táptalajon

A 4 mM BM-nal előkezelt és kezeletlen sejtek pszeudohifa és klamidospóra képzését KLA-Tween táptalajon 62 órán keresztül mikroszkopikusan vizsgáltuk. Az inkubációs idő harmadik órájában mind a kontroll, mind a glükokortikoszteroiddal előkezelt sejtek esetében megfigyeltük a pszeudohifa képzést. A kísérlet kilencedik órájára újabb sarjsejtek jelentek meg a mintákban. A vizsgálat 24. órájára már szerteágazó hifákat figyeltünk meg (**12. ábra**, **4. táblázat**). Az inkubációs idő végére megjelent a *C. albicans*-ra jellemző képlet, a klamidospóra. Nem tapasztaltunk különbséget a BM-nal előkezelt és a kontroll minták élesztő→pszeudohifa morfológiai változásának sebességében és klamidospóra képzésében (**4. táblázat**).



12. ábra A *C. albicans* SC5314 pszeudohifa (A-E) és klamidospóra (F) képzése KLA-Tween táptalajon. A felvételek az inkubációs idő 3., 6., 9., 12., 24 és 62. órájában fénymikroszkóppal készültek.

4. táblázat A betametazon előkezelés hatása a *C. albicans* SC5314 virulencia faktoraira.

Virulencia faktorok	Kontroll kultúrák	BM-nal (2 mM) előkezelt kultúrák	BM-nal (4 mM) előkezelt kultúrák
Csíratömlő képzés (%)			
30 perc	51,8 ± 7	n.h.	53 ± 4
60 perc	94 ± 2	n.h.	95 ± 2
Foszfolipáz aktivitás ^a	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ^{**}
Hifázóképesség	+	+	++
Pszeudohifa képzés	+	n.h.	+
Klamidospóra képzés	+	n.h.	+

A táblázatban három független mérés adataiból számított középértékek és azok szórásai (S.D.) szerepelnek. Az „n.h.” megjelölés arra utal, hogy nem lett meghatározva a vizsgált paraméter.

^{**} Szignifikáns volt a különbség ($p < 0,01$) a kontroll és a 4 mM BM-nal előkezelt minták között. A szignifikancia vizsgálatokhoz Student-féle *t*-tesztet használtunk.

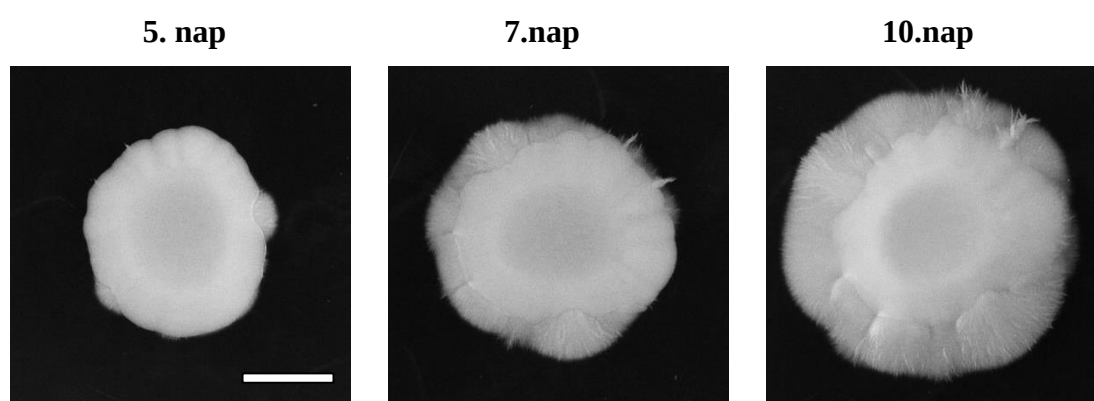
^a Az extracelluláris foszfolipáz aktivitást $[(1/Pz)-1]$ értékkel jellemeztük, ahol a Pz a telepátmérő és a feltisztulási zóna átmérőjének hányadosa [Gyetvai és mtsai., 2007].

5.2.4. Hifázóképesség jellemzése Spider táptalajon

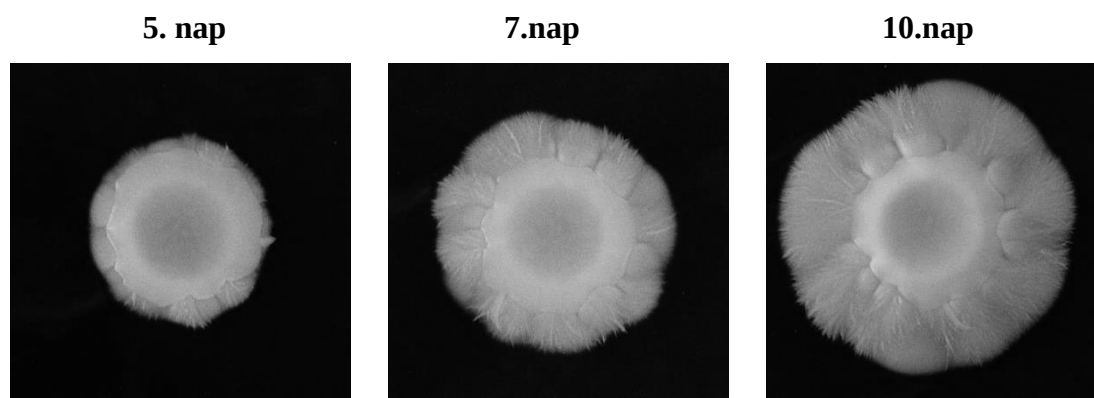
A *C. albicans* kontroll és 2-4 mM BM-nal előkezelt minták hifázóképességét Spider táptalaj felszínén követtük nyomon, amely lehetővé tette az élesztő→hifa morfológiai átalakulás vizsgálatát.

A 4 mM szteroiddal előkezelt sejtek esetében gyorsabb hifaképzést tapasztaltunk már az inkubációs idő ötödik napján (**13. ábra, 4. táblázat**). A 2 mM BM előkezelés esetén nem tapasztaltunk különbséget a hifaképzésben a kontrollhoz viszonyítva (**4. táblázat**).

Candida albicans SC5314 (kezeletlen minta)



Candida albicans SC5314 (4 mM BM-nal előkezelt minta)



13. ábra A BM-nal előkezelt és kezeletlen *C. albicans* sejtek hifázó képessége 30 °C-on Spider táptalajon.

A felvételek az inkubációs idő 5., 7. és 10. napján készültek. Skála=10 mm.

5.2.5. Extracelluláris foszfolipáz aktivitás meghatározása tojássárgája táptalajon

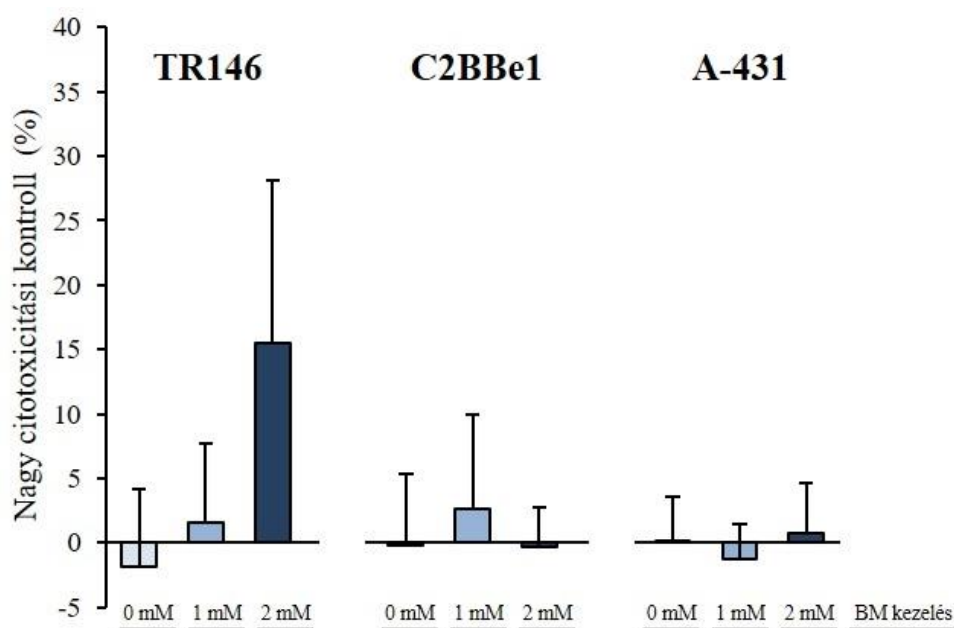
A 4 mM szteroiddal előkezelt és kezeletlen minták EP aktivitása között szignifikáns különbséget találtunk. A kezelt sejtek EP aktivitása a 3. napon közel kétszer nagyobbak

bizonyult a kontroll mintához képest. A 2 mM BM előkezelésnél nem tapasztaltunk különbséget az EP aktivitásokban a kontrollhoz viszonyítva (**4. táblázat**).

5.3. A betametazon hatása a *C. albicans* infekció dinamikájára emberi epitélium sejt modelleken

5.3.1. Betametazon koncentrációk kiválasztása a patogenitás vizsgálatokhoz

A citotoxicitási vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált szájüregi, vastagbél és hüvelyi epitélium sejt vonalak érzékenyeknek bizonyultak a 4 mM BM kezelésre. A szájüregi epitélium sejteket >45 %-ban, a vastagbél és hüvelyi epitélium sejteket >20 %-ban károsította a BM kezelés 24 órás inkubációs idő alatt. Így a kísérletekben 1 és 2 mM koncentrációban alkalmaztuk a BM-t. A sejt károsodás mértéke mind a két koncentráción elhanyagolható mértékű volt (< 4 %), kivételt ez alól a 2 mM BM nyomásnak kitett TR146 sejtek jelentettek, ahol nem szignifikáns mértékű $15,5 \pm 12,6$ % citotoxicitást jegyeztünk fel (**14. ábra**).



14. ábra A BM kezelések hatása a *C. albicans* SC5314-el nem fertőzött szájüregi (TR146), vastagbél (C2BBel), illetve hüvelyi (A-431) epitélium sejtek károsodására. A citotoxicitás vizsgálatokat 1 vagy 2 mM BM hozzáadásával vagy anélkül (0 mM BM), 24 órás inkubációs időt követően végeztük el (BM kezelés). A BM citototoxicitását a laktát dehidrogenáz aktivitás mérésével határoztuk meg. A pozitív lízis kontrollokat (*C. albicans* sejtekkel nem fertőzött és BM-nal nem kezelt epitélium sejtek), az inkubációs idő lejártát követően 0,1 % Triton X-100 reagenssel szétroncsoltuk és az így mért LDH aktivitás értékeket tekintettük 100 %-os sejt károsodásnak.

5.3.2. A *C. albicans* adhéziós képességének vizsgálata

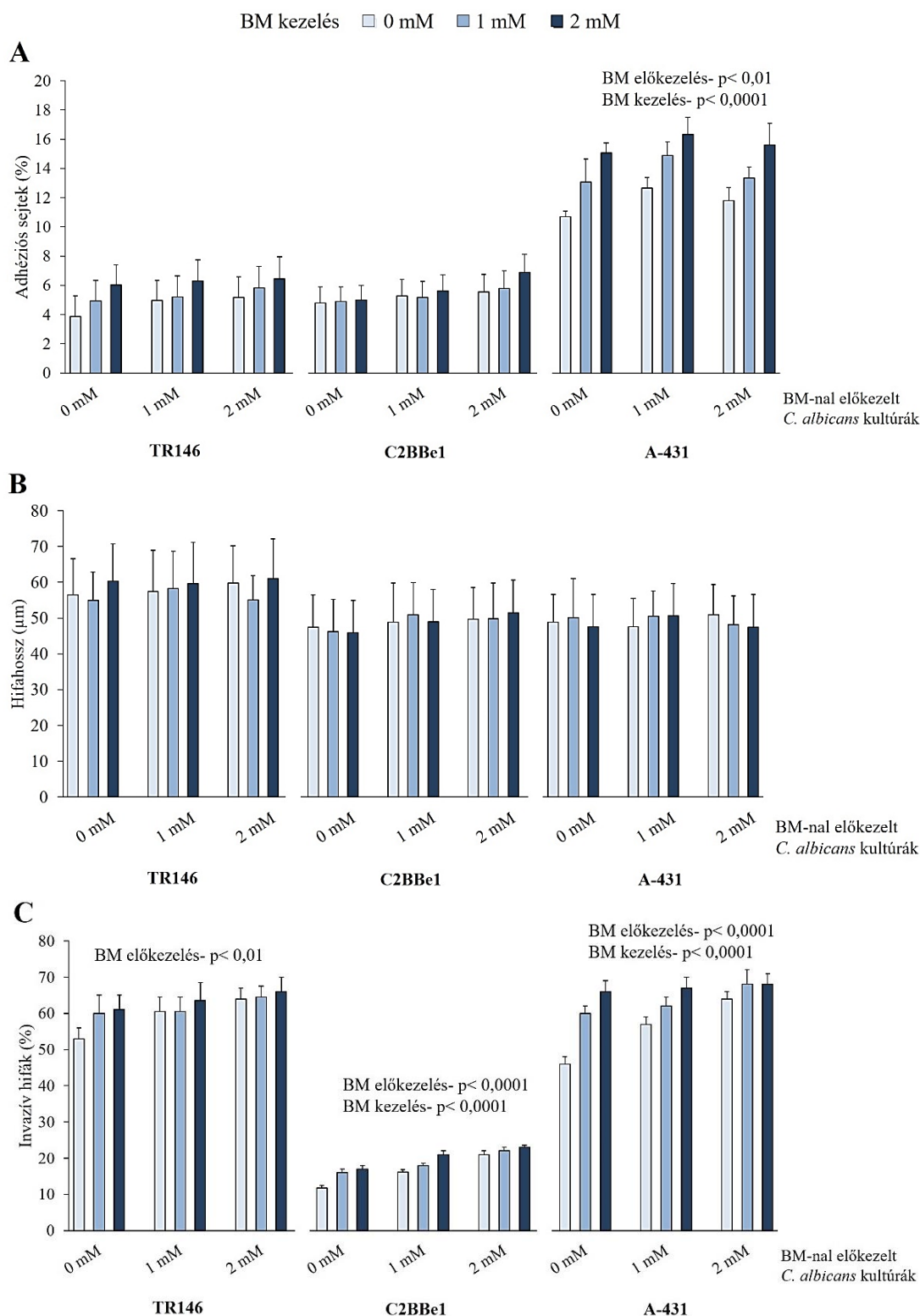
A *C. albicans* epitélium sejtekhez történő tapadását 1 órás fertőzést követően vizsgáltuk meg. A *C. albicans* sejtek 4-7 %-a (4×10^3 - 7×10^3) tapadt a szájüregi és a bél epitélium sejtekhez, míg a hüvelyi epitélium sejtvonala esetén ez az érték 10-16 % között alakult. A gomba hüvelyi epitélium sejtekhez (A-431) történő adhézióját szignifikánsan megnövelte a BM kezelés minden BM-nal előkezelt (0, 1 és 2 mM) *C. albicans* minta esetében. Azonban a TR146 szájüregi és C2BBel vastagbél sejtvonalaiknál nem tapasztaltuk a BM kezelés és előkezelés hatását a *C. albicans* adhéziójára (**15. A ábra**).

5.3.3. A *C. albicans* kezdeti sejtkárosító képességének vizsgálata

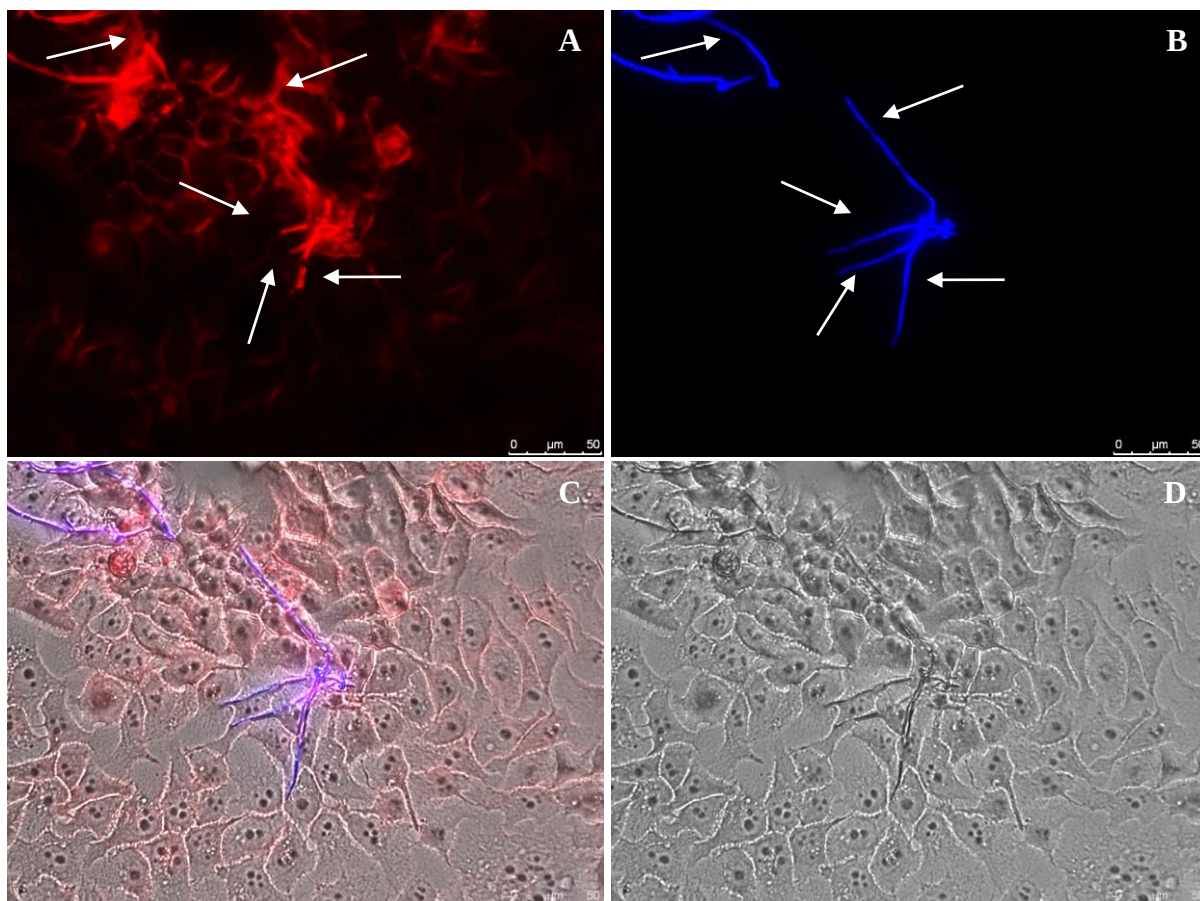
A BM kezelések *C. albicans* invazív képességére gyakorolt hatását 3 órás inkubációs időt követően vizsgáltuk meg. A CFW és Alexa-ConA fluoreszcens festékekkel történő jelölés lehetővé tette a hifahossz, az invazív (csak CFW jelölt) és nem invazív (CFW és Alexa-ConA jelölt) hifák vizsgálatát (**16. ábra**).

A 1-2 mM BM-nal történő elő-, illetve utókezelés nem befolyásolja szignifikánsan a *C. albicans* hifák hosszát egyik sejtvonala esetében sem. A hifahosszak $45,9 \pm 9 \mu\text{m}$ és $61,0 \pm 11 \mu\text{m}$ között alakultak (**15. B ábra**).

Az epitélium sejtek invázióját figyelembe véve, a *C. albicans* hifák 46-68 %-a ($4,6 \times 10^4$ - $6,8 \times 10^4$) bizonyult invazívnak a szájüregi és a hüvelyi epitélium sejtek esetében, míg a C2BBel vastagbél epitélium sejtvonalaiknál ez az érték 12-23 %-nak ($1,2 \times 10^4$ - $2,3 \times 10^4$) adódott (**15. C ábra**). Az 1 és 2 mM BM kezelések jelentősen stimulálták a *C. albicans* hifák szájüregi és vastagbél epitélium sejtvonalaikba történő behatolását (**15. C ábra**), míg a BM előkezelések mind a három epitélium sejtvonala esetében szignifikánsan megnövelték az invazív *C. albicans* hifák számát (**15. C ábra**).



15. ábra: A BM előkezelés és kezelés hatása a *C. albicans* SC5314 szájüregi (TR146), vastagbél (C2BBel), illetve hüvelyi (A-431) epitélium sejtekhez történő adhéziójára (A), a *C. albicans* hifák hosszára (B) és az invazív hifák arányára (C). A *C. albicans* kultúrákat 1 vagy 2 mM BM jelenlétében vagy hiányában (0 mM BM) tenyésztettük elő (BM előkezelés). A fertőzést 1 vagy 2 mM BM hozzáadásával vagy anélkül (0 mM BM) végeztük el (BM kezelés). Az invazív hifák százalékos értékét a CFW festékkel jelölt invazív hifák száma alapján határoztuk meg. A 2 utas ANOVA varianciaanalízissel kapott szignifikáns eredményeket (BM előkezelés és kezelés hatása) feliratok jelzik az ábrán. A-431 epitél sejteken az adhéziós vizsgálatot Marina Pekmezovic (HKI, Jena) végezte el.

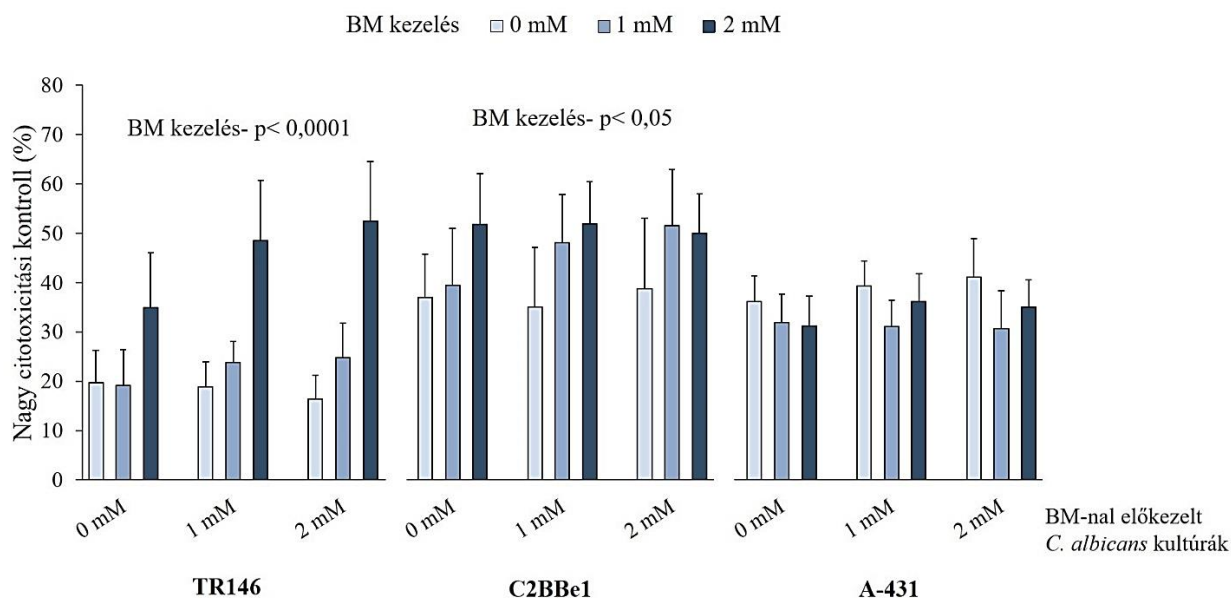


16. ábra A *C. albicans* hifák epitélium sejtekbe történő behatolását bemutató felvételek. (A) A *C. albicans* hifák extracelluláris részét Alexa-ConA fluoreszcens festékkel jelöltük (pirosan jelölt), (B) a *C. albicans* hifák extracelluláris és intracelluláris részét CFW reagenssel festettük (kéken jelölt), (C) A és B képek átfedése (átfedő rész rózsaszín), (D) differenciál interferencia kontraszt (DIC) felvétel. A nyilak mutatják a csak CFW-tal festődött invazív hifákat.

5.3.4. A *C. albicans* fertőzés és a betametazon kezelés citotoxikus hatásának vizsgálata

A *C. albicans* fertőzés, illetve a BM kezelések együttes hatását az epitélium sejtek károsodására a LDH aktivitás mérésével határoztuk meg.

A kezeletlen invazív *C. albicans* sejtekkel fertőzött szájüregi TR146 sejtek megközelítőleg 20 %-a, míg a vastagbél C2BBel és hüvelyi A-431 epitélium sejtek 36-37 %-a károsodott a 24 órás inkubációs idő alatt (**17. ábra**). A 2 mM koncentrációban alkalmazott BM jelentősen megnövelte a szájüregi és vastagbél epitélium sejtek *C. albicans* általi károsodását (**17. ábra**). A *C. albicans* sejtek BM előkezelésének nem volt szignifikáns hatása az epitélium sejtek károsodására, habár megnövelte a citotoxicitás mértékét a TR146 szájüregi epitélium sejtek esetében (**17. ábra**).

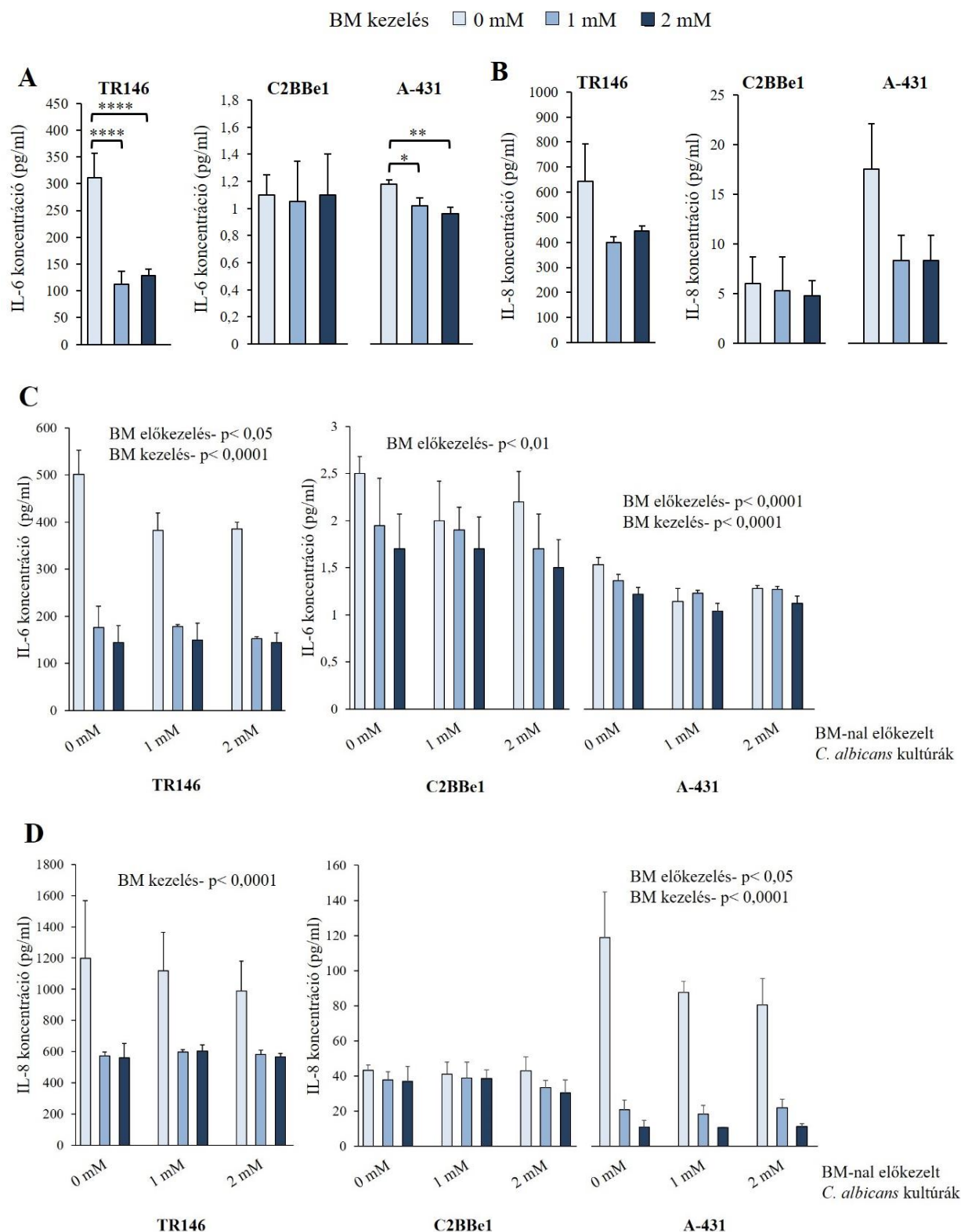


17. ábra: A BM előkezelés és kezelés, illetve a *C. albicans* SC5314 fertőzés együttes hatása a szájüregi (TR146), vastagbél (C2BBel), illetve hüvelyi (A-431) epitélium sejtvonalak károsodására. A Triton X-100 reagenssel szétroncsolt pozitív lízis kontrollok (*C. albicans* sejtekkel nem fertőzött és BM-nal nem kezelt epitélium sejtek) LDH értékeiket tekintettük 100 %-os sejt károsodásnak (nagy citotoxicitási kontroll). A BM előkezeléskor a *C. albicans* kultúrákat 1 vagy 2 mM BM jelenlétében vagy hiányában (0 mM) tenyésztettük elő. A BM kezelés alkalmával a fertőzést 1 vagy 2 mM BM hozzáadásával vagy anélkül (0 mM) végeztük el. A 2 utas ANOVA varianciaanalízissel kapott szignifikáns eredményeket (BM előkezelés és kezelés hatása) feliratok jelzik az ábrán.

5.3.5. A betametazon kezelés és a *C. albicans* fertőzés hatása az epitélium sejtek interleukin termelésére

A 24 órás 1 és 2 mM BM-nal kezelt *C. albicans* SC5314 sejtekkel történő infekciót követően az epitélium sejtek által termelt IL-6 és IL-8 koncentrációkat határoztuk meg (**18. ábra**), melyek a dendritikus sejtek, a polimorfonukleáris leukociták és a T_h sejtek toborzásában vesznek részt.

A BM kezelés IL-6 és IL-8 felszabadulást gátló hatása megfigyelhető volt a *C. albicans*sal nem fertőzött epitélium sejtvonalaknál (**18. A,B ábrák**). A *C. albicans*sal fertőzött epitélium sejtek BM kezelése szignifikánsan csökkentette a patogén által kiváltott IL-6 és IL-8 termelést, kivételt ezalól a C2BBel IL-8 koncentrációja mutatott (**18. C,D ábrák**). Azonban a C2BBel vastagbél és A-431 hüvelyi epitélium sejtek hígítatlan mintáiból mért IL-6 szintek igen alacsonynak adódtak (**18. C ábra**), így a BM kezelés és a *C. albicans* sejtek együttes hatását leíró eredményeket fenntartással kell kezelni.



18. ábra A szájüregi (TR146), vastagbél (C2BBel), illetve hüvelyi (A-431) epitélium sejtek interleukin termelésének a vizsgálata. Az IL-6 és IL-8 koncentrációkat a BM-nal kezelt, de *C. albicans* SC5314-el nem fertőzött epitélium sejtek (A, B) felülszójából, illetve BM előkezelt *C. albicans* sejtekkel fertőzött mintákból (C, D) határoztuk meg. A 2 utas ANOVA varianciaanalízissel kapott szignifikáns eredményeket (BM előkezelés és kezelés hatása) feliratok jelzik az ábrán. $\square$ Szignifikánsak a különbségek (Tukey-féle teszt; *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001) a BM kezelés hatására.

Elmondhatjuk azonban, hogy a *C. albicans* kultúrák BM előkezelése jelentősen gátolta a szájüregi epitélium sejtek IL-6 és a hüvelyi sejtek IL-8 termelését (**18. C,D ábrák**). Megállapíthatjuk, hogy IL-6 és IL-8 felszabadulás mértéke tükrözi a citotoxicitás vizsgálatnál kapott eredményeket (**17., 18. C,D ábrák**).

Érdekes módon, a *C. albicans* fertőzéskor mért IL-8 szintek kevésbé változtak a BM-nal kezelt C2BBel sejteknél, mindemellett a BM kezelés jelentősen gátolta a bélhámsejtek IL-6 termelését a vizsgált körülmény mindegyikénél (**18. A,C ábrák**).

5.4. A betametazon kezelés hatása a *C. albicans* antifungális anyagokkal szembeni érzékenységére

A gyulladáscsökkentő szteroidokkal együtt gyakran alkalmaznak antifungális szereket a kialakuló mikózisok kezelésére. Így, két polién antifungális szer az AmB és a NIT, illetve az ergoszterin bioszintézist gátló FLU BM-nal történő esetleges interakcióját is megvizsgáltuk.

A 0,12 µg/ml AmB és a 1,25 µg/ml NIT közel 60 %-os szaporodásgátlást okozott az inkubációs idő 6. órájára, míg 12 óra elteltével 32 és 36 %-al vetették vissza a *C. albicans* SC5314 sejtek szaporodását a kezeletlen kontrollhoz (100 %) képest (**5. táblázat**). A 4 mM BM hatására mind az AmB, mind pedig a NIT esetében a polién antifungális szer által kiváltott gátlóhatás csökkenését figyeltük meg. A 4 mM BM az AmB gátló hatását 23 %-ra, míg a NIT-ét 28 %-ra csökkentette az inkubációs idő végére az antifungális szerrel kezelt (AmB, NIT) kultúrákkal történő összehasonlításakor. A 2 mM BM alkalmazása nem befolyásolta az AmB és a NIT antifungális hatását (**5. táblázat**).

A FLU (2,0 µg/ml) 31 és 21 %-os szaporodásgátlást okozott az inkubációs idő 6. és 12. órájára. A 4 mM BM a FLU hatását azonban nem befolyásolta (**5. táblázat**).

5.5. A betametazon kezelés hatása a *C. albicans* oxidatív stressz érzékenységére

5.5.1. *C. albicans* szaporodása menadion jelenlétében

Megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott glükokortikoid befolyásolja-e a *C. albicans* oxidatív stressz érzékenységét. Az oxidatív stresszt szuperoxidot generáló MSB-tal idéztük elő.

Az inkubációs idő végére a 0,5 mM MSB 56 %-os, a 0,4 mM MSB 44 %-os, míg a 0,3 mM MSB 12 %-os szaporodásgátlást okozott a kezeletlen kontrollhoz (100 %) képest (**6. táblázat**). Azonban a 0,5 mM MSB és a 2-4 mM BM, illetve a 0,4 mM MSB és a 4 mM BM

koncentrációfüggő módon erősítették egymás hatását (szinergizmus), teljesen gátolva a *C. albicans* gombasejtek szaporodását (6. táblázat).

5. táblázat Antifungális hatások vizsgálata, a betametazon antifungális szerekkel (amfotericin B, nisztatin, flukonazol) történő interakciója.

Kezelések ^b	Szaporodás (OD ₆₄₀) ^a	
	Inkubációs idő	
	6 óra	12 óra
Kezeletlen kontroll	1,31 ± 0,03	2,28 ± 0,05
+ 2 mM BM	1,27 ± 0,09	2,18 ± 0,04
+ 4 mM BM	1,25 ± 0,04	2,19 ± 0,08
+ AmB	0,54 ± 0,03 *** , c	1,55 ± 0,03 *** , c
+ AmB + 2 mM BM	0,56 ± 0,03 *** , c; *** , d	1,59 ± 0,03 *** , c; *** , d
+ AmB + 4 mM BM	0,69 ± 0,03 *** , c; *** , d; *** , e	1,75 ± 0,03 *** , c; *** , d; *** , e
+ NIT	0,43 ± 0,03 *** , c	1,45 ± 0,07 *** , c
+ NIT + 2 mM BM	0,41 ± 0,03 *** , c; *** , d	1,47 ± 0,05 *** , c; *** , d
+ NIT + 4 mM BM	0,39 ± 0,03 *** , c; *** , d	1,64 ± 0,04 *** , c; *** , d; *** , e
+ FLU	0,90 ± 0,02 *** , c	1,80 ± 0,02 *** , c
+ FLU + 4 mM BM	0,87 ± 0,02 *** , c; *** , d	1,76 ± 0,03 *** , c; *** , d

^a – A *C. albicans* SC5314 törzs szaporodását az optikai denzitás értékekben (OD₆₄₀) bekövetkező változásokkal követtük nyomon. A táblázatban 3 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását tüntettük fel.

^b – A BM-t (2 vagy 4 mM), AmB-t (0,12 µg/ml; 0,13 µM), NIT-t (1,25 µg/ml; 1,3 µM) és a FLU-t (2,0 µg/ml; 6,5 µM) a zárójelben feltüntetett koncentrációkban alkalmaztuk.

^{c, d, e} - Szignifikáns különbség volt a kezeletlen kontroll, BM-nal és az antifungális szerrel kezelt (AmB, NIT, FLU) kultúrákkal történő összehasonlításakor.

*** - A szignifikáns különbséget (p < 0,001) Student- féle t-tesztel állapítottuk meg.

6. táblázat A *C. albicans* sejtek szaporodásának vizsgálata betametazon és menadion jelenlétében.

Kezelések ^b	Sejtszaporodás ^a	
	Inkubációs idő	
	6 óra	12 óra
Kezeletlen kontroll	1,31 ± 0,03	2,28 ± 0,05
+ 2 mM BM	1,27 ± 0,09	2,18 ± 0,04
+ 4 mM BM	1,25 ± 0,04	2,19 ± 0,08
+ 0,5 mM MSB	0,35 ± 0,03 ^c	1,0 ± 0,1 ^c
+ 0,5 mM MSB + 2 mM BM	0,198 ± 0,001 ^{c; d; e}	0,17 ± 0,03 ^{c; d; e; f}
+ 0,5 mM MSB + 4 mM BM	0,12 ± 0,01 ^{c; d; e}	0,15 ± 0,02 ^{c; d; e; f}
+ 0,4 mM MSB	0,41 ± 0,02 ^c	1,28 ± 0,03 ^c
+ 0,4 mM MSB + 2 mM BM	0,27 ± 0,01 ^{c; d; e}	0,93 ± 0,01 ^{c; d; e}
+ 0,4 mM MSB + 4 mM BM	0,19 ± 0,01 ^{c; d; e}	0,23 ± 0,02 ^{c; d; e; f}
+ 0,3 mM MSB	0,41 ± 0,03 ^c	1,75 ± 0,05 ^c
+ 0,3 mM MSB + 2 mM BM	0,38 ± 0,04 ^{c; d}	1,4 ± 0,1 ^{c; d; e}
+ 0,3 mM MSB + 4 mM BM	0,34 ± 0,02 ^{c; d; e}	1,24 ± 0,07 ^{c; d; e; f}

^a – A *C. albicans* SC5314 törzs szaporodását az optikai denzitás értékekben (OD₆₄₀) bekövetkező változásokkal követtük nyomon. A táblázatban 3 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

^b – A BM-t (2 vagy 4 mM) és a MSB-ot (0,3-0,5 mM) a zárójelben feltüntetett koncentrációkban alkalmaztuk.

^{c, d, e, f} – Szignifikáns különbség (p<0,001) volt a kezeletlen kontroll, BM-nal és az antifungális hatású MSB-tal kezelt kultúrákkal történő összehasonlításakor. Kivételt jelentett a 0,3 mM MSB és a 0,3 mM MSB + 4 mM BM 6 órás kultúrák szaporodása, ahol p<0,05 volt a szignifikancia érték. A szignifikancia vizsgálatokhoz Student-féle *t*-tesztet használtunk.

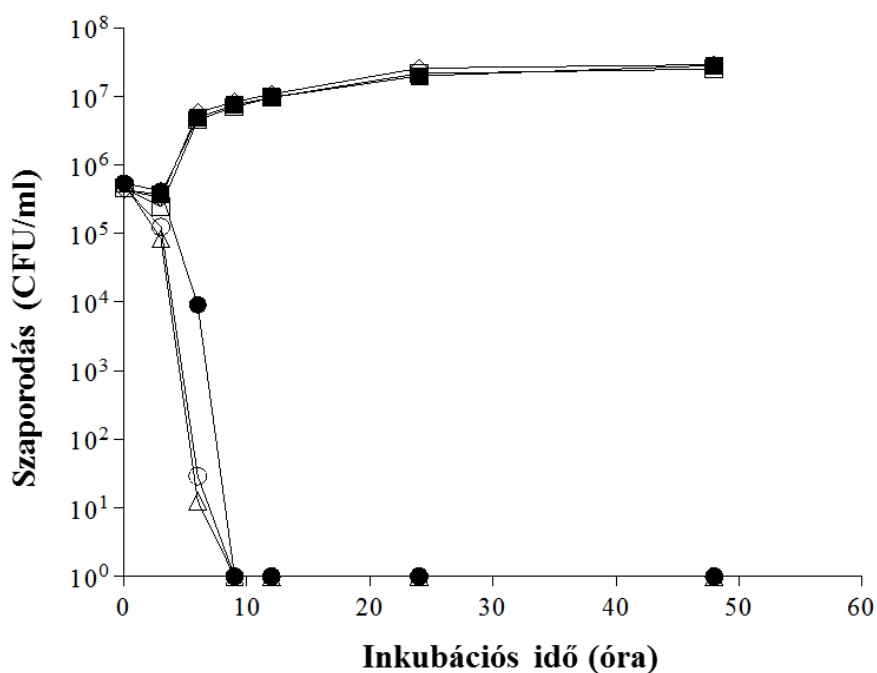
^f – A BM és MSB közötti szinergista interakciót, az interakciós érték (IR) jellemzi, melyet az Abbott formulát felhasználva határoztunk meg. Az IR >1,5 szinergista hatásra utal [Moreno és mtsai., 2003; Toth és mtsai., 2013].

5.5.2. Túlélési képesség vizsgálata

A túlélési képesség mérésekor megvizsgáltuk, hogy a BM befolyásolja-e *C. albicans* sejtek túlélési képességét MSB jelenlétében.

Az 0,5 mM MSB és 2-4 mM BM együttes alkalmazása RPMI-1640 tápközegben fungicid (**19. ábra, 7. A táblázat**), míg YPD tápfolyadékban fungisztikus hatást váltott ki (**7. B táblázat**).

A kezeletlen minták CFU értéke százszor nagyobb volt YPD tápközegben (7. B táblázat), mint RPMI-1640 tápfolyadékban a 12 órás inkubációs idő után (19. ábra, 7. A táblázat). A MSB az inkubációs idő 6. óráját követően szignifikánsan csökkentette a túlélő sejtek számát RPMI-1640 tápközegben, azonban a 2-4 mM BM hozzáadása jelentősen fokozta a tapasztalt fungicid hatást és a kísérlet 12. órájára valamennyi sejt elpusztult (19. ábra, 7. A táblázat). Másrészt a 0,5 mM MSB és a 2-4 mM BM kombinációja fungisztikus hatást váltott ki YPD tápközegben, azaz gátolta a *C. albicans* sejtek szaporodását a 12 órás inkubációs idő alatt, de nem pusztította el azokat (7. B táblázat).



19. ábra A *C. albicans* SC5314 sejtek túlélése betametazon és menadion jelenlétében és hiányában RPMI-1640 tápközegben. A felnőtt telepek számát (CFU) kontroll kultúrában (◇), valamint 2 mM BM (□), 4 mM BM (■), 0,5 mM MSB (●), 2 mM BM + 0,5 mM MSB (○) és 4 mM BM + 0,5 mM MSB (△) jelenlétében vizsgáltuk.

7. táblázat A *C. albicans* sejtek túlélési képességét összefoglaló táblázat betametazon és menadion jelenlétében RPMI-1640 (A) és YPD (B) tápközegben.

A

Kezelés ^b	Szaporodás RPMI-1640 tápközegben (CFU/ml) ^a		
	Inkubációs idő (óra)		
	0	6	12
Kezeletlen kontroll	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^5$	$(6 \pm 2) \times 10^6$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^7$
+ 2,0 mM BM	$(4,6 \pm 0,6) \times 10^5$	$(4,6 \pm 0,6) \times 10^6$	$(9,8 \pm 0,6) \times 10^6$
+ 4,0 mM BM	$(4,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(5 \pm 2) \times 10^6$	$(9,7 \pm 0,6) \times 10^6$
+ 0,5 mM MSB	$(5,5 \pm 0,5) \times 10^5$	$(9 \pm 1) \times 10^3$ ^c	0 ^c
+ 0,5 mM MSB + 2 mM BM	$(4,8 \pm 0,3) \times 10^5$	(30 ± 9) ^{c; d; e}	0 ^{c; d}
+ 0,5 mM MSB + 4 mM BM	$(5,5 \pm 0,4) \times 10^5$	(10 ± 2) ^{c; d; e}	0 ^{c; d}

B

Kezelés ^b	Szaporodás YPD tápközegben (CFU/ml) ^a		
	Inkubációs idő (óra)		
	0	6	12
Kezeletlen kontroll	$(7,5 \pm 0,2) \times 10^5$	$(6,6 \pm 0,7) \times 10^7$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^9$
+ 2,0 mM BM	$(7,1 \pm 0,6) \times 10^5$	$(6,2 \pm 0,5) \times 10^7$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^9$
+ 4,0 mM BM	$(7,3 \pm 0,5) \times 10^5$	$(5,8 \pm 0,6) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^9$
+ 0,5 mM MSB	$(6,8 \pm 0,4) \times 10^5$	$(8 \pm 3) \times 10^5$ ^c	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^6$ ^c
+ 0,5 mM MSB + 2 mM BM	$(6,8 \pm 0,4) \times 10^5$	$(7 \pm 1) \times 10^5$ ^{c; d}	$(7 \pm 1) \times 10^5$ ^{c; d; e}
+ 0,5 mM MSB + 4 mM BM	$(6,7 \pm 0,2) \times 10^5$	$(7,2 \pm 0,4) \times 10^5$ ^{c; d}	$(7,5 \pm 0,6) \times 10^5$ ^{c; d; e}

^a – A *C. albicans* SC5314 törzs szaporodását a CFU értékekben bekövetkező változásokkal követtük nyomon. A táblázatban 3 független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

^b – A BM-t (2 vagy 4 mM) és a MSB-ot (0,5 mM) a zárójelben feltüntetett koncentrációkban alkalmaztuk.

^{c, d, e} - Szignifikáns különbség ($p < 0,001$) volt a kezeletlen kontroll, BM-nal és az antifungális hatású MSB-tal kezelt kultúrákkal történő összehasonlításakor. A szignifikancia vizsgálatokhoz Student-féle *t*-tesztet használtunk.

5.5.3. Antioxidáns enzimaktivitások meghatározása

Az élesztősejtek védelmük érdekében számos antioxidáns enzimet termelnek a RS eliminálására. Megvizsgáltuk a 2-4 mM BM és 1,5 mM MSB hatását ezen enzimek specifikus aktivitására. A szuperoxidot generáló MSB kezelés szignifikánsan megnövelte a kataláz, a GR, a GPx és a SOD aktivitásokat (**8. táblázat**).

A 4 mM BM kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kataláz, de növekedett a GPx aktivitás. A 2 mM BM nem volt szignifikáns hatással a kataláz és a GPx enzimek aktivitására. A kataláz és a SOD esetében a 4 mM BM csökkentette a MSB kezelés által kiváltott enzimaktivitás növekedést (**8. táblázat**).

8. táblázat Specifikus antioxidáns enzimaktivitások összehasonlítása betametazon és menadion kezelés hatására.

	kezeletlen kultúrák	BM-nal (4 mM) kezelt kultúrák	MSB-tal kezelt kultúrák	BM-nal (4 mM) és MSB-tal kezelt kultúrák
Kataláz [kat/(mg protein)]	0,41 ± 0,08	0,26 ± 0,05 ^{*, a}	0,71 ± 0,06 ^{***, a}	0,37 ± 0,04 ^{***, b; ***, c}
GR [mkat/(kg protein)]	0,65 ± 0,06	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ^{**, a}	0,95 ± 0,1 ^{***, a; ***, b}
GPx [mkat/(kg protein)]	0,063 ± 0,007	0,11 ± 0,01 ^{***, a}	0,21 ± 0,03 ^{***, a}	0,25 ± 0,04 ^{***, a; ***, b}
G6PD [mkat/(kg protein)]	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,4	3,9 ± 0,4
SOD [unit/(mg protein)]	5,1 ± 0,8	4,6 ± 0,7	7,1 ± 0,7 ^{***, a}	4,5 ± 0,5 ^{***, c}

	kezeletlen kultúrák	BM-nal (2 mM) kezelt kultúrák	MSB-tal kezelt kultúrák	BM-nal (2 mM) és MSB-tal kezelt kultúrák
Kataláz [kat/(mg protein)]	0,41 ± 0,08	0,45 ± 0,02	0,71 ± 0,06 ^{***, a}	0,83 ± 0,09 ^{***, a; ***, b}
GPx [mkat / (kg protein)]	0,063 ± 0,007	0,049 ± 0,004	0,21 ± 0,03 ^{***, a}	0,18 ± 0,03 ^{***, a; ***, b}

A táblázatban négy független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

^{a, b, c} - Szignifikáns volt a különbség a kezeletlen kontroll, BM-nal és az antifungális hatású MSB-tal kezelt kultúrákkal történő összehasonlításakor.

^{*, **, ***} - Szignifikáns különbségek (p<0,05, 0,01 és 0,001) meghatározásához Student-féle *t*-tesztet használtunk.

5.5.4. Az oxidált és redukált glutation tartalom, továbbá a reaktív részecskék mennyiségi meghatározása

Az MSB kezelés hatására jelentősen megnőtt az SC5314 *C. albicans* sejtek RS tartalma, ami a glutation metabolizmus, vagyis a GSH és a GSSG koncentráció szignifikáns növekedését és a GSH/GSSG redox egyensúly negatív irányú változását eredményezte (**9. táblázat**).

A 4 mM BM kezelés hatására szignifikánsan növekedett a sejtek RS tartalma és a GSH/GSSG egyensúly eltolódott a GSSG koncentráció irányába. A 2 mM BM kezelés nem volt hatással a sejtek RS mennyiségére.

A 4 mM BM jelentősen megnövelte a MSB kezelés által kiváltott RS szintet és a GSSG koncentrációt (**9. táblázat**).

9. táblázat Az oxidált, redukált glutation tartalom és a reaktív részecskék mennyiségi összehasonlítása betametazon és menadion kezelés hatására.

	kezeletlen kultúrák	BM-nal (4 mM) kezelt kultúrák	MSB-tal kezelt kultúrák	BM-nal (4 mM) és MSB-tal kezelt kultúrák
DCF ^a [nmol/DCF (OD ₆₄₀)]	20 ± 3	32 ± 5 ^{**} , b	45 ± 6 ^{***} , b	76 ± 10 ^{***} , b; ^{***} , c; ^{***} , d
GSH [nmol/(mg protein)]	231 ± 25	240 ± 25	285 ± 30 [*] , b	280 ± 30 [*] , b
GSSG [nmol/(mg protein)]	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2 ^{**} , b	2.6 ± 0.3 ^{***} , b	3.2 ± 0.4 ^{***} , b; ^{***} , c
GSH/GSSG	289 ± 48	200 ± 33 [*] , b	110 ± 17 ^{***} , b	88 ± 14 ^{***} , b; ^{***} , c

	kezeletlen kultúrák	BM-nal (2 mM) kezelt kultúrák	MSB-tal kezelt kultúrák	BM-nal (2 mM) és MSB-tal kezelt kultúrák
DCF ^a [nmol/DCF (OD ₆₄₀)]	20 ± 3	15 ± 3	45 ± 6 ^{***} , b	51 ± 15 ^{***} , b; ^{***} , c

A táblázatban négy független mérés adataiból számolt középértéket és azok szórását (S.D.) tüntettük fel.

^a - A reaktív részecskék koncentrációját a 2',7'-diklórfloreszcín-diacetáttól képződő fluoreszcens termék, a 2',7'-diklórfloreszcín (DCF) mérésével jellemeztük.

^b, ^c, ^d - Szignifikáns különbség volt a kezeletlen kontroll, BM-nal és az antifungális hatású MSB-tal kezelt kultúrákkal történő összehasonlításakor.

^{*}, ^{**}, ^{***} - Szignifikáns különbségek (p<0,05; 0,01 és 0,001) meghatározásához Student-féle *t*-tesztet használtunk.

6. Eredmények kiértékelése

A *C. albicans*ra jellemző élesztő és (pszeudo)hifa morfológiai formák, illetve ezen képletek egymásba történő átalakulásának a lehetősége jelentős előnyhöz juttatja a gombát a fertőzés különböző stádiumaiban, így a kolonizáció, a felületi fertőzés, a mély szöveti fertőzés és végül a disszeminált fertőzés esetén. A morfológiai képletek közötti átváltást számos környezeti tényező egyaránt előidézi és szabályozza, legyen szó akár az előhelyén uralkodó környezeti feltételek megváltozásáról, a különböző nyomelemekért vívott harcról, a gazdaszervezet kolonizációjakor őt érő legkülönbözőbb környezeti stresszhatásokról vagy éppen az immunszuppresszív beavatkozásokról. A doktori disszertációmban így a következő kérdéseket szeretnénk volna megválaszolni: (i) A *C. albicans* élőhelyét jellemző környezeti tényezőkben bekövetkező változások felelősek-e a candidiasisok kialakulásáért? (ii) A fertőzéskor egy adott stresszhez történő adaptáció védelmet eredményez-e a *Candida* sejtek számára más stresszhatásokkal szemben? (iii) Az immunszuppresszív terápiák nyomán fennálló immunválasz hiány vajon az egyedüli oka a gombás fertőzések kialakulásának?

6.1. Környezeti tényezők hatása a *C. albicans* fonalas formáinak elágazási idejére

Kísérleteinkben videomikroszkóp rendszerrel vizsgáltuk a CO₂ (légköri, 5 és 10 %) és a hemin (50 µg/ml) *C. albicans* morfológiai átalakulására gyakorolt hatását az általa elfoglalt anatómiai helyekre, azaz szájüregre, a gasztrointesztinális traktusra, illetve a hüvely lumenére jellemző pH értékeken. A *Candida* törzsek 37 °C-on, fonalas növekedést kiváltó RPMI-FBS tápközegben történő tenyésztése [Nagy és mtsai., 2015] valódi hifa (pH 7,0 és 8,0) vagy pszeudohifa (pH 4,2 és 5,3) morfológiának kedvezett.

A széles körben elterjedt humán kommenzalista *C. albicans*ról ismert, hogy képes az emberi szervezet kolonizációjára és inváziójára egyaránt [Jackson, 2009; Rizzetto és mtsai., 2014]. A *C. albicans* morfológiai átalakulásában és így az infekció kialakulásában központi szerepet játszanak a különböző környezeti faktorok és a gazdaszervezet vas készleteinek a megszerzése [Bullen, 1981; Santos és mtsai., 2003]. Ezen tényezők közé tartoznak a hőmérséklet (35-42 °C), a vérszérum [Han és mtsai., 2011], a CO₂ tenzió (hipoxia, magas CO₂ szint), az alkalikus pH érték [Persi és mtsai., 1985], a hemoglobin (1mg/ml koncentrációban, Pendrak & Roberts, 2007) és a hemin (5-100 µg/ml, Casanova és mtsai., 1997, Santos és mtsai., 2003). Arról sem szabad elfelejtenünk, hogy a gazdaszervezet sikeres inváziójához elengedhetetlen az élesztő→hifa és hifa→élesztő morfológiai átalakulások megfelelő időzítése

és sebessége [Lo és mtsai., 1997; Mavor és mtsai., 2005]. Viszont a hifa kialakulásának bármely zavara az invázió sikertelenségét, illetve csökkent virulenciát eredményezhet [Hausauer és mtsai., 2005; Palmer és mtsai., 2005]. Érdeemes megjegyezni, hogy a *C. albicans* fertőzéskor, így a szájüreg, vagy épp a vese, máj és a lép invazív candidiasisa esetén, egyaránt megfigyelhetők az élesztősejt és a fonalas formák [Pope & Cole, 1982; Webb és mtsai., 1998; Lionakis és mtsai., 2011; Mayer és mtsai., 2013]. Míg a valódi hifa bizonyítottan központi szerepet játszik az invázió folyamatában, addig a pszeudohifa kevésbé virulens a hematogén módon szétterjedő fertőzéskor (disszeminált candidiasis), de a valódi hifához hasonlóan egyaránt képes áthatolni a gazdaszervezet szövetein [Sudbery és mtsai., 2004; Shen és mtsai., 2008; Sudbery, 2011].

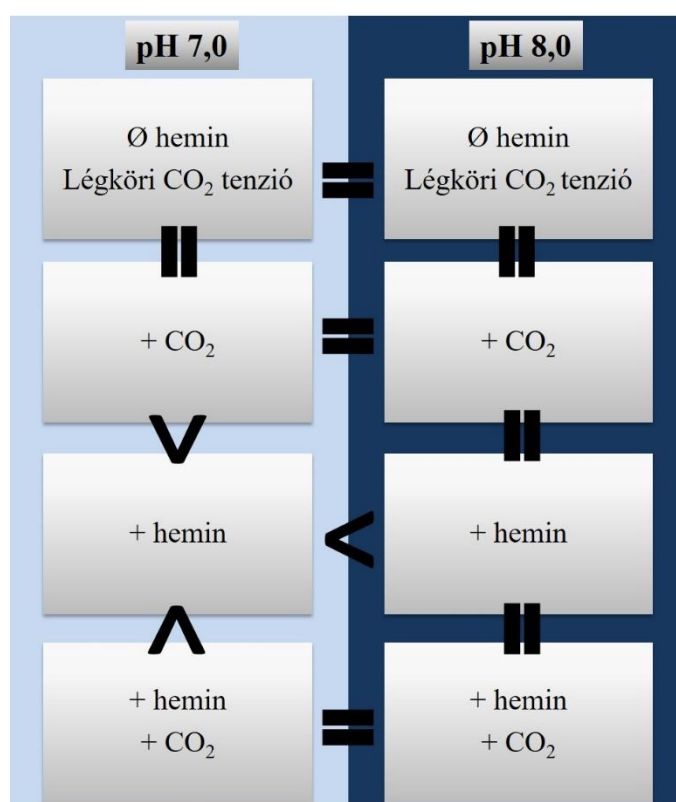
Számos tanulmány leírta már a CO₂, a vasforrás szerepét betöltő hemin és a pH *C. albicans* morfológiai átalakulását indukáló hatását, azonban ezen hatások számszerűsítésére ezidáig még nem dolgoztak ki módszert. Így kutatásainkban a fonalas formák jellemzésére, továbbá a *C. albicans* sejtek fiziológiai állapotának a leírására három paraméter vizsgálatát is elvégeztük: a csírázásig és a hifa első elágazásig eltelt idők meghatározását, továbbá a hifahossz mérését. Az alkalmazott paraméterek közül a sejtek csírázási idejében bekövetkező változások törzsspecifikusnak bizonyultak, a hifa elágazási idejével ellentétben az egyes paraméterekhez köthető általános tendenciát nem tudtunk megállapítani. Az elágazási idő mérése emellett lehetővé tette a tenyésztési edénnyel nem paralell növekedő hifahosszak méréséből adódó pontatlanságok elkerülését. Ezen túlmenően az elágazási idők korrelációt mutattak az első elágazás megjelenésekor mért hifahosszakkal, vagyis a hifák növekedési ütemét nem befolyásolja szignifikánsan a tenyésztési körülmények változása. Az eredményeink kiértékelésénél figyelembe vettük Barelle és munkatársai [2003; 2006] által tett megállapításokat is, vagyis a hifa elágazás mértékét befolyásolja a gomba fiziológiai állapota, a tápanyag tartalom vagy egyes metabolitok koncentrációjának a megváltozása. Így az elágazások megjelenésének időpontja jelzésértékű lehet arra nézve, hogy mennyire ideális a környezet a gomba növekedéséhez [Prosser, 1990]. Ugyanis a nélkülözhetetlen tápanyagok kimerülése a hifa elágazás frekvenciájának csökkenését eredményezi és így a szöveti invázió kiváltó okaként jegyezhetjük fel [Barelle és mtsai., 2003; 2006].

A hifákat jellemző első elágazási idők elemzését követően a következő következtetéseket vontuk le a tényezők kombinált hatását illetően: heminnel kiegészített semleges pH értékű *C. albicans* tenyészeteket jellemezte a legrövidebb elágazási idő, míg a pH értékének semlegesről (pH 7,0) alkalikusra (pH 8,0) történő eltolódása, illetve a semleges pH 7,0-es kultúra 5 % CO₂-al történő kiegészítése az elágazási idők növekedést eredményezte (**20. ábra**). Figyelemre

méltó, hogy savas pH értékeken (pH 4,2 és 5,3) és 5 és 10 % CO₂ jelenlétében csak pseudohifa morfológia kialakulását figyelhettünk meg.

Ezen szakirodalmi és kísérleti eredmények alapján feltételezzük, hogy a videomikroszkóp technika révén könnyű, gyors és pontos meghatározást lehetővé tevő elágazási idő egy megfelelő paraméter a *C. albicans* sejtek fiziológiai állapotának a leírására.

A hifa elágazás kialakulására tett megfigyeléseink így olyan hipotézisek, modellek felállítására ösztönöztek bennünket, amelyek megválaszolhatják azon kérdést, hogy az emberi szervezeten belül számos anatómiai helyet elfoglaló *C. albicans* hogyan képes különböző típusú candidiasisokat kiváltani [Jackson és mtsai., 2009; Rizzetto és mtsai., 2014]:



20. ábra A különböző tenyésztési körülmények (neutrális/alkalikus pH, légköri/5 % CO₂ tenzió és 50 µg/ml hemin) együttes hatása a *C. albicans* hifák elágazási idejére.

(i) Így megállapítottuk, hogy neutrális pH értéken, hemin jelenlétében és légköri CO₂ tenzió mellett az elágazási idő lerövidül (**20. ábra**), ami a szájüreg egyszerűsített modelljének tekinthetünk a különböző patológiás állapotok következtében jelentkező fogínyvérzéskor [Akpan & Morgan, 2002; Aframian és mtsai., 2006; Ergun és mtsai., 2010; Oyetola és mtsai., 2015]. Érdeemes továbbá megjegyezni, hogy az emberi szervezetben az oxidált ferri (Fe³⁺) hemoglobinnál felszabaduló hemin ugyancsak indukálja a *C. albicans* élesztő→hifa

morfológiai átalakulását, amely valószínűsíti a mukozális *Candida* fertőzés kialakulását [Casanova és mtsai., 1997; Webb és mtsai., 1998; Santos és mtsai., 2003; Mech és mtsai., 2014].

(ii) Abban az esetben, ha a *C. albicans* hifa formája eléri a mélyebb szöveteket, szerveket vagy a vérereket, a pH érték és a CO₂ koncentráció megnövekedik, ami eredményeink alapján hosszabb elágazási időhöz **(20. ábra)** és így kevésbé elágazó micélium kialakulásához vezethet [Fradin és mtsai., 2005]. Ezt a megfigyelést alátámasztja számos korábbi tanulmány, amelyben nagyon ritkán elágazó *C. albicans* hifákat írtak le a fertőzött szövetekben [Pope & Cole, 1982; Saville és mtsai., 2003; Sudbery, 2011], ugyanis a hifák subapikális részei a sejtciklus G1 fázisában rekednek [Veses & Gow, 2008; Belcher és mtsai., 2010].

(iii) A pH érték vagy a CO₂ koncentráció növekedése hemin jelenlétében hosszabb elágazási időt eredményezett **(20. ábra)**. Ezen környezeti tényezők kedveznek a *C. albicans* vékonybélben történő inváziójának vérzés/fekély esetében [DeSesso & Jacobson, 2001; Zwolinska-Wcisło és mtsai., 2001; Sargent és mtsai., 2010]. Azonban figyelembe kell vennünk, hogy a *C. albicans* sejtek egy részét az eddigi morfológiai képletektől különböző ún. GUT (gasztointesztinális traktus által indukált átalakulás) morfortípus jellemzi a gasztrointesztinális traktusban [Pande és mtsai., 2013]. Így további kísérletek szükségesek azon kérdés megválaszolására, hogy a bél lumenében rendelkezésre álló tápanyagok, illetve a bél gázok összetétele (például a jelentősen csökkent O₂ tenzió) a kommenzalista életciklusra jellemző morfológiát vagy pedig a gomba invázióját előkészítő morfológiai átalakulást fogja-e támogatni [White és mtsai., 2007; Stichernoth és mtsai., 2011; Pande és mtsai., 2013].

(iv) Az RPMI-FBS tápközeg savas pH (4,2 és 5,3) értéke és az alkalmazott 5-10 % CO₂ a hüvely lumenben érzékelhető körülmények egyszerűsített modelljének tekinthetjük, ugyanis a menstruációs ciklus alatt a hüvely pH értéke 4,2 (14. napon) és 6,6 (2. napon), míg a CO₂ tenziója 6,1 % és 8,3 % között periodikusan változik [Wagner & Ottesen, 1982]. Adatainkból látható, hogy a savas pH (4,2 vagy 5,3) gátolta az élesztő→hifa morfológiai átváltást, ugyanakkor élesztő→pszeudohifa tranzíciót eredményezett, ami védelmet jelenthet az invazív *Candida* fertőzésekkel szemben a menstruációs ciklus 4-14. napja között. Másrésről a menstruációs ciklus alatti pH növekedés (a 2. napon akár pH 6,6-ig), a viszonylag nagy CO₂ tenzió (6,1 % a menstruációs ciklus 2. napján), valamint a menstruációs folyadék hemoglobin tartalma elősegítheti a hifa forma képződését és vele együtt akár a *C. albicans* invázióját is [MacLaughlin és mtsai., 1986]. Azonban Bochenska és mtsai (2013) leírták, hogy a *C. albicans* aszpartát proteázai által antibakteriális peptideket, úgynevezett hemocidineket, szabadítanak fel a humán hemoglobinnal. Így a menstruáció alatt ezen peptidek részt vehetnek a hüvely nyálkahártyáját károsító legkülönbözőbb mikrobiális fertőzések elleni védekezésben. Tekintettel

arra, hogy a hemocidinek igen gyenge aktivitást mutattak a *C. albicans*sal szemben, további kutatások szükségesek azon folyamatok feltérképezésére, amelyek a menstruáció alatt kontrollálják a különböző *Candida* fajokat [Bocheńska és mtsai., 2013].

Az invazív candidiasis kialakulásának kockázatát tovább súlyosbítják azok az orvosi szempontból jelentős tényezők, mint például a különböző gyógyszeres kezelések, cukorbetegség, műtétek, többszörös traumák, katéterek alkalmazása és a neutropénia, amelyek megváltoztatják a testnedvek pH-értékeit és CO₂ koncentrációját [Wagner & Ottesen, 1982; Persi és mtsai., 1985; Davis, 2003; Mayer és mtsai., 2013]. Reményeink szerint a jövőbeli *C. albicans* elleni terápiás eljárások kiterjednek majd a fiziológiailag releváns pH-értékek és a CO₂-koncentrációk fertőzés helyén történő helyreállításra, megelőzve vagy legalább megakadályozva a *Candida* sejtek mélyebb szövetekben történő megjelenését. Egy másik lehetséges terápiás megközelítés a *C. albicans* sejtek felszínén lévő hemoglobin/hem-kötő receptorokon keresztüli hemoglobin és hemin felvétel megzavarása lehet [Weissman & Kornitzer, 2004; Chen és mtsai., 2011b; Kuznets és mtsai., 2014; Crawford & Wilson, 2015]. Érdemes megjegyezni, hogy a *C. albicans* dimorf morfológiai átalakulása a mikológia széleskörűen tanulmányozott területe és ígéretes célpontja az antifungális gyógyszerfejlesztésnek [Jacobsen és mtsai., 2012].

Elmondhatjuk, hogy videómikroszkóp rendszer segítségével sikeresen alkalmaztunk egy számszerűsíthető paramétert, az elágazási időt, a *C. albicans* morfológiai, fiziológiai és virulencia állapotának a jellemzésére, az emberi szervezet különböző anatómiai helyein fennálló környezeti feltételek mellett. Ezen túlmenően az elágazási időket összehasonlító elemzésünk lehetővé tette olyan egyszerű modellek és hipotézisek felállítását, amelyek magyarázatot adhatnak a szájüreget, valamint a bél és a hüvelyi lument kolonizáló *C. albicans* sejtek egymástól eltérő élettanára és patogenitására. Őszintén reméljük, hogy hipotéziseink és a rájuk épülő jövőbeli *in vitro* és *in vivo* kísérletek mélyebb betekintéssel szolgálnak majd az emberi szervezetet kolonizáló és fertőző gomba inváziós fegyvertárába, így eredményezve új anti-*C. albicans* ellenes szerek és terápiák kifejlesztését.

6.2. Stressz keresztvédelem vizsgálata az oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzseken

A humán szervezetben a gombákkal szembeni immunválaszban jelentős szerepet játszanak a fagocita sejtek, amelyek az általuk termelt peroxidok segítségével pusztítják el a kórokozó mikroorganizmusokat. A környezeti stresszválasz tanulmányozását így olyan *C.*

albicans klinikai izolátumokból létrehozott mutáns törzseken végeztük el, amelyek antioxidáns védelmi rendszere a fennálló belső oxidatív stressz miatt folyamatosan indukált. Ezen törzseket egyre növekvő *tBOOH* koncentrációjú tápoldatban történő tenyésztéssel hozták létre Fekete és munkatársai [2007 és 2008]. Így a krónikus oxidatív stresszhez adaptálódott mutáns törzsek lehetőséget nyújtottak a keresztvédelem tanulmányozására, azaz annak vizsgálatára, hogy az oxidatív stresszhez történő alkalmazkodás védelmet jelent-e más stresszhatásokkal szemben. A *C. albicans* a humán szervezetben igen ellenséges környezettel és összetett stresszhatásokkal szembesül. Ellen kell állnia a PMNL sejtek támadásának, amelyek gátolják a *C. albicans* sejtek proliferációját és blokkolják az élesztő→fonalas forma átalakulást [Hube, 2004]. A leukociták fagoszómájában a *C. albicans* változó pH értékekkel, antimikrobiális peptidekkel, ROS és RNI jelenlétével és tápanyagszegény környezettel szembesül [Fradin és mtsai., 2005]. A candidiasisok kezelésére alkalmazott antifungális szerek pedig gátolják a gomba ergoszterin bioszintézisét, sejtorganelumainak összeszerelődését, kötődnek a sejtmembrán szterinjéhez, vagyis sejtfal, illetve sejtmembrán integritás stresszt idéznek elő. [Odds és mtsai., 2003; Grillot & Lebeau, 2005; Lewis, 2011; Lewis & Fothergill, 2015]. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a folyamatosan indukált antioxidáns védelmi rendszerrel rendelkező, oxidatív stresszhez adaptálódott *C. albicans* mutáns törzsek megnövekedett toleranciát mutattak a gazdaszervezetben fellelhető oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, UPR-t kiváltó, pH és hőstresszrel szemben. Az általunk tanulmányozott oxidatív stressz toleráns *C. albicans* mutáns törzsekben megfigyelt stressz keresztvédelem kialakulására a következő hipotéziseket állítottuk fel:

(i) Számos irodalmi adat leírja a Hog1-függő MAPK kulcsszerepét a *C. albicans* számos stresszválaszának a szabályozásában, beleértve az oxidatív, ozmotikus, nehézfém stresszre, antifungális szerek által kiváltott stresszre, illetve a neutrofil sejtekkel történő találkozásakor leírt stresszhatásokra adott válaszokat [Alonso-Monge és mtsai., 2003, 2006; Smith és mtsai., 2004; Enjalbert és mtsai., 2006; Cheetham és mtsai., 2011; Miramón és mtsai., 2012]. Ezen megfigyelések alátámasztják azt az elképzelést, hogy a Hog1-nek kulcsszerepe van az opportunistá patogén élesztő stressz keresztvédelmének a szabályozásában. Mindazonáltal egyéb alternatív szabályozó útvonalak jelenléte is feltételezhető a keresztvédelem szabályozásában, amelyek kapcsolatban állnak a Hog1 útvonallal. Például a hőstressznek kitett *C. albicans* kultúráknál megfigyelt stressz keresztvédelmi mintázatok eltérést mutattak a más stressztípusoknál leírtaktól, illetve az antioxidáns enzimek termelése is függetlennek bizonyult a Hog1 MAPK szignalizációs útvonaltól [Enjalbert és mtsai., 2006; Gónzalez-Párraga és mtsai., 2010; Leach és mtsai., 2012]. Figyelembe véve, hogy a Hog1 nem vesz részt a *C. albicans*

védelmében hőstressz esetén, így elképzelhető, hogy az oxidatív stresszhez adaptálódott *C. albicans* kultúráknál leírt megnövekedett hőtolerancia, a Hog1- től különböző szignalizációs útvonal által szabályozott folyamat.

(ii) A pékélesztő esetében már kimutatták, hogy a gombasejtek enyhe stresszhez (NaCl, dithiotreitol vagy hőstressz) történő adaptálódása a gének rendkívül változatos expresszáldását eredményezi. Azonban ezeknek a géneknek csak a törtresze expresszáldódik egy későbbi H₂O₂ kezelés alkalmával [Berry és mtsai., 2011]. Mitöbb, egyes gének H₂O₂ toleranciában betöltött szerepét nagymértékben befolyásolta az előkezelés típusa is. A kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a *C. albicans* antioxidáns védelmi rendszere igen hatékony a legkülönbözőbb stresszhatásokkal szemben. Így igen érdekes lenne azon kérdés megválaszolása, hogy az élesztők oxidatív stresszhez történő alkalmazkodása, például az immunsejtekkel történő találkozaskor, áll-e az általános stressz adaptálódás középpontjában [Fradin és mtsai., 2005]. Az bizonyos, hogy az antioxidatív védelem szerepe megkérdőjelezhetetlen a hiperozmotikus, nehézfém [Dziadkowiec és mtsai., 2007] sejtfa [Liu és mtsai., 2010], DTT [Trotter & Grant 2002], ecetsav [Semchyshyn és mtsai., 2011], hideg [Zhang és mtsai., 2003a] és a fagyás-olvadás okozta [Park és mtsai., 1998] stressz, valamint a hősokk [Davidson és mtsai. 1996] elleni küzdelemben. Így feltételezzük, hogy az oxidatív stresszhez történő alkalmazkodás kitüntetett szerepet játszik az élesztők általános stressz adaptációjában. Ebben a tekintetben a kísérleti adataink nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy az általunk tapasztalt keresztvédelem lehetséges, hogy egy egyszerű mellékterméke az antioxidatív védelmi rendszer elemein keresztül zajló stressz adaptációnak [Berry és mtsai., 2011].

(iii) Munkánk során egy további lehetséges elméletet is megvizsgáltunk a *C. albicans* környezeti stresszre adott egyedi válaszait illetően. Egyes feltételezések szerint a *C. albicans* a morfológiai formák közötti átváltással (élesztő→(pszeudo)hifa tranzíció) válaszol az őt érő sokrétű környezeti stresszhatásokra [Gasch, 2007]. A fentiek alapján így megvizsgáltuk, hogy az általunk tapasztalt általános stressz tolerancia kapcsolatban áll-e a *C. albicans* morfológiai átalakulásával az egyes stressz hatásoknak kitett tenyészetekben. Láthattuk, hogy a vizsgált *C. albicans* szülői és mutáns törzsek kizárólag élesztő formában növekedtek a stresszmentes körülmények esetén, míg az élesztő→(pszeudo)hifa morfológiai átalakulás csak elszórtan jelentkezett az egyes stresszhatásokra. Az általunk vizsgált feltételek közül a 42 °C-os inkubáció, valamint a H₂O₂ kezelések voltak a leghatékonyabbak az élesztő→(pszeudo)hifa morfológiai átalakulás kiváltására. A hasonló stressztípusok által kiváltott morfológiai átalakulásról már korábban is beszámoltak olyan *C. albicans* kultúrákban, amelyeket proapoptotikus dózísú ecetsav (40-60 mmol/l, 30 °C-on, 200 perc), H₂O₂ (0,4-10 mmol/l, 30

°C-on, 3-6 óra) vagy lovasztatin (12,5 mg/ml, 28 °C-on, 4- 24 óra) kezelésnek tették ki [Phillips és mtsai., 2003; Nasution és mtsai., 2008; da Silva Dantas és mtsai., 2010; Gyetvai és mtsai., 2006]. Számos tanulmány a Hog1 és a Cek1 MAPK-okat a *C. albicans* morfológiai átalakulását szabályozó fehérjékként írják le, ahol is a Hog1 a morfogenezis negatív regulátoraként szerepel. Ugyancsak érdemes megjegyezni, hogy a kísérleteinkben H₂O₂ kezelésnek kitett *C. albicans* kultúrákban megfigyelt pszeudohifa morfológiai forma kialakulása a Cek1 MAPK és a Cph1 transzkripciós faktor szabályozása alá tartozik. Ezen eredmények mindegyike a keresztvédelem és a dimorf átalakulás összetett és egyben sokrétű szabályozására, illetve kapcsolatára utalhat a környezeti stressznek kitett *C. albicans* sejtekben, ahol a Hog1 MAPK igen fontos, de nem egyedüli szabályozó molekulaként van jelen.

Elmondhatjuk, hogy a *C. albicans* sejtek morfológiai átalakulását az alkalmazott stresszkezelés és annak típusa befolyásolta, és nem pedig a sejtek megnövekedett oxidatív stressz toleranciája. Az eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *C. albicans* sejtek válaszolhatnak morfológiai átalakulással a környezeti stresszre, de valószínűleg ez nem áll kapcsolatban az oxidatív stresszhez alkalmazkodott sejtek stressz keresztvédelmével. Úgy véljük, hogy az ezen területen folytatott további kutatásoknak mindenképpen az opportunistá humán patogén stressz adaptációs folyamataiban és a stressz által kiváltott dimorf átalakulásban résztvevő stressz jelátviteli útvonalak pontos szerepének, azok kölcsönhatásainak és target génjeink tisztázására, feltérképezésére kellene irányulniuk.

6.3. Glükokortikoid kezelés hatása a *C. albicans* virulenciájára

A humán gyógyászatban alkalmazott kortikoszteroidok gyulladásgátló és immunszuppresszív hatásuk révén megnövelik a gombafertőzések iránti fogékonyságot, ugyanakkor a *C. albicans* fiziológiájára hatva elősegítik a candidiasis kialakulását is [Schäcke és mtsai., 2002; Lionakis & Kontoyiannis, 2003]. A szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy ezek a szerek fokozzák a *C. albicans* szaporodását, csírázóképeségét, hifázását, extracelluláris aszpartát proteáz és foszfolipáz aktivitását, szájüregi epitélium sejtekhez történő adhézióját, illetve megnövelik a szájnyálkahártya és a gastrointesztinális régió kolonizálási rátáját [Bykov, 1989; Lionakis & Kontoyiannis, 2003; Gyetvai és mtsai., 2007]. Mindemellett a kortikoszteroid terápiával párhuzamosan gyakran alkalmaznak antifungális szereket a fellépő candidiasis kezelésére. Ismert, hogy egyes ergoszterin bioszintézis gátlásában résztvevő antifungális szerek aktivitása módosul glükokortikoidok hatására, amely a membránpermeabilitás változásainak, lehetséges szteroid-antifungális szer komplex

kialakulásának, illetve a mikroba metabolizmusában bekövetkező változásoknak tulajdonítható [Lampen és mtsai., 1960; Raab, 1971; Gyetvai és mtsai., 2007]. Érdekes még megjegyezni, hogy korábbi tanulmányok a glükokortikoidok oxidatív stresszt fokozó tulajdonságáról is beszámoltak [Ohta és mtsai., 1996], így nem meglepő módon Gyetvai és mtsai. (2007) kimutatták a *C. albicans* sejtek oxidatív stressz érzékenységeinek növekedését nagy dózisú MP jelenlétében, amit antioxidánsok hozzáadása sem mérsékelte.

A glükokortikoidokról rendelkezésre álló ezen eredmények tükrében, így a következő kérdéseinkre kerestük a választ az elvégzett vizsgálatainkban: (i) A klinikumban széleskörűen alkalmazott BM befolyásolja-e a *C. albicans* virulenciáját, fiziológiáját? (ii) A BM szteroid terápia befolyásolja-e a candidiasis kezelésére alkalmazott antifungális szerek hatását? (iii) A BM hatással van-e a *C. albicans* sejtek oxidatív stressz érzékenysége? (iv) A BM kezelés hogyan befolyásolja a *C. albicans* fertőzés menetét epitélium sejtmodellekben?

Az élettani vizsgálatainkban 1, 2 és/vagy 4 mM koncentrációban alkalmaztuk a BM-t, a tapasztalt fiziológiai eredményektől függően. A BM rendszeres topikális használatokor (0,05-0,13%) – lásd a bőrgyógyászati és szemészeti felhasználásokat – a kísérletekben tesztelt koncentrációkat alkalmazzuk [Corbett és mtsai., 1993; Suharwardy és mtsai., 1994; Abelardo és mtsai., 2009; Sticherling és mtsai., 2013].

Gyetvai és mtsai (2007) korábban kimutatták, hogy a nagydózisú MP befolyásolja a *C. albicans* szaporodását, csírázását, hifázóképességét, extracelluláris foszfolipáz és proteáz aktivitását, illetve megnöveli az ergoszterinhez kötődő AmB antifungális hatását. Azonban *in vitro* élettani vizsgálatainkban bebizonyosodott, hogy az említett fiziológiai változásokat nagymértékben befolyásolják az alkalmazott glükokortikoszteroid koncentrációja és kémiai szerkezete. Ugyanis az általunk alkalmazott 4 mM BM előkezelés közvetlenül fokozta a *C. albicans* hifázását és foszfolipáz termelését, illetve hozzájárult az AmB és a Nit polién antimikotikumok hatásának a csökkenéséhez. Ugyanakkor a BM nem volt hatással a *C. albicans* sejtek csírázási képességére és szaporodására. Mindemellett a kenőcsökben, krémekben és gélekben általában használt 2 mM koncentrációjú BM nem befolyásolta a *C. albicans* sejtek kataláz és a GPx antioxidáns enzimek aktivitásait és az intracelluláris RS mennyiségét. Eredményeink arra utalnak, hogy a BM oxidatív stressz érzékenységet fokozó hatása dózisfüggőnek bizonyult, ugyanis 4 mM koncentrációban alkalmazott BM kezelés csökkentette a *C. albicans* sejtek kataláz aktivitását, megnövelte az intracelluláris RS koncentrációt, illetve a GSH/GSSG redox egyensúly felborulását is eredményezte. A fenti eredmények tükrében így nem meglepő módon az antioxidáns védelmet csökkentő 2-4 mM BM fokozta a *C. albicans* sejtek oxidatív stresszt kiváltó MSB-tal szembeni érzékenységét. A

nagy dózisú glükokortikoidok és a MSB között tapasztalt szinergizmus egyik lehetséges magyarázata a plazmamembrán fluiditásában bekövetkező változásban keresendő. Felmerült annak a lehetősége, hogy a szteroidok és az antifungális szerek módosítják a *C. albicans* membránját, ami hatással lehet a *C. albicans* fiziológiai tulajdonságaira, így például a sejtek oxidatív stresszel szembeni fokozott érzékenységére is. Ezt a feltételezést támasztja alá azon megfigyelés is, hogy a MSB és a MP együttes szaporodásgátló hatása antioxidánsok (C-vitamin, E-vitamin, peroxidáz) hozzáadásával sem mérsékelhető [Gyetvai és mtsai., 2007]. Érdeemes megjegyezni, hogy a 0,5 mM MSB 2-4 mM BM-nal történő kombinált alkalmazása fungisztatikus hatást eredményezett a *C. albicans* gyors szaporodását kiváltó komplex YPD tápközegeben. Azonban a 0,5 mM koncentrációban alkalmazott MSB, illetve az MSB és BM együttes alkalmazása fungicidnek bizonyult a lassabb sejt proliferációt biztosító RPMI-1640 tápközegeben.

A szuperoxidot generáló vegyületek, mint amilyen a menadion (ismertebb nevén K3 vitamin), aminek a vízoldható formája az MSB, valamint ennek a kémiaiag módosított származékai citotoxikusnak bizonyultak különböző emlős sejtvonalakra nézve, korlátozva a humán alkalmazhatóságukat. Az IC₅₀ érték minden esetben 100 µM alatt maradt, így nem meglepő, hogy előszeretettel alkalmazzák ezeket a vegyületeket a tumor sejtek nagyobb érzékenységét kihasználó rákellenes terápiák részeként [Lamson & Plaza, 2003; Acharya és mtsai., 2009; Verrax és mtsai., 2009; Aguilo és mtsai., 2012; Kitano és mtsai., 2012; Suresh és mtsai., 2013]. Emellett a K3 vitamin szemészeti alkalmazása is korlátozott, hiszen kedvezőtlenül befolyásolja a kötőhártya fibroblasztok proliferációját, a sebgyógyulást, mindemellett szemlencse és retina károsodást is eredményez [Bhuyan és mtsai., 1997; Zhang és mtsai., 2003b; Hegde & Varma, 2005; Olsen és mtsai., 2011; Pinilla és mtsai., 2014]. Minazonáltal a MSB-tal elvégzett kísérleti eredményeink nem zárják ki a glükokortikoid tartalmú szemcseppek, illetve krémek kevésbé citotoxikus oxidánsokkal történő kombinálásának a lehetőségét, ami elfogadhatóbbá és alkalmasabbá tenné a készítményt a felületi mikózisok megelőzésére és/vagy kezelésére [Chlebowski és mtsai., 1985; OztopScu és mtsai., 2004; Shukla és mtsai., 2007; Kitano és mtsai., 2012].

A vizsgált glükokortikoidokra (BM, MP) tehát általánosan jellemző volt, hogy fokozzák a humán patogén gomba hifázó képességét és foszfolipáz termelését, befolyásolják (pozitívan vagy akár negatívan) az antifungális szerek hatásfokát, illetve sebezhetőbbé teszik az élesztősejteket az oxidálószerekkel szemben. Mivel kevés irodalmi adat lelhető fel a kortikoid terápia során jelentkező *C. albicans* fertőzés patogenezisére, így megpróbáltuk felderíteni a BM (elő)kezelés hatását a *C. albicans* epitélium sejtvonalakhoz történő tapadására, az élesztő- hifa

morfológiai átalakulást követő invázió folyamatára, valamint ezen események által kiváltott sejtkárosodásra és az epitélium sejtek interleukin termelésére.

Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az epitélium sejtek fertőzésekor alkalmazott 4 mM BM toxikusnak bizonyult a vizsgált sejtvonalakra, különösképpen a szájüregi TR146 epitélium sejtekre, ahol a sejt károsodás mértéke meghaladta a 45 %-ot. Ezen megfigyelés alapján javasoljuk a forgalomban lévő készítményekben lévő glükokortikoidok toxikus koncentráció-határértékeinek a pontos meghatározását.

Az 1 és 2 mM koncentrációban alkalmazott BM kezelések fokozták a *C. albicans* sejtek hüvelyi epitélium sejtekhez történő tapadását. A BM ugyancsak előmozdította a gomba epitélium sejtekbe történő behatolását, ugyanis a BM előkezelés minden sejtípusnál, míg a BM kezelés a vastagbél és a hüvelyi epitélium sejteknél növelte meg az invazív hifák számát. Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy a BM előkezelés/kezelés következtében nem történt változás a hifák hosszában, tehát a megnövekedett invazív hifa arány független ettől a paramétertől. Az itt kapott eredményeink összhangban vannak a Spider táptalajon tapasztalt hifázási eredményekkel, ugyanis a *C. albicans* 2 mM BM-nal történő előkezelése nem befolyásolta a hifa képzés sebességét. Ezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a BM kezelés nem a hifák növekedési sebességén keresztül, hanem az invazív hifák száma révén befolyásolja a gomba invazív képességét. Azonban *C. albicans* hifák TR146 szájüregi és A-431 hüvelyi epitélium sejtekbe történő behatolása hatékonyabbnak bizonyult (44-68 %) a C2BBel vastagbél epitélium sejtek inváziójánál (12-23 %). Ezen eltérés valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a szájüregi epitélium sejtek inváziója mind aktív penetrációval, mind pedig indukált endocitózissal bekövetkezhet, míg a bélhám sejteké csak aktív penetráción keresztül valósulhat meg [Dalle és mtsai., 2010].

Érdekes módon a *C. albicans* sejtek BM előkezelése csak kis mértékben befolyásolta az epitélium sejtek károsodását és azok citokin termelését. Jóllehet ezen megfigyeléseink összhangban vannak Gyetvai és munkatársai (2007) által tapasztaltakkal, ugyanis ők nem találtak szignifikáns különbséget az intraperitoneálisan oltott egerek peritoneális mosófolyadékából kitenyésztett 4 mM MP-nal előkezelt és kontroll *C. albicans* sejtek számában. Így ezen adatok egyértelműen jelzik számunkra, hogy a glükokortikoidok *C. albicans*-ra kifejtett sokoldalú élettani hatása csak ideiglenes, és a gombasejtek igen gyorsan regenerálódnak miután a glükokortikoid hatása megszűnik. Ugyanakkor a *C. albicans* sejtek BM-nal történő előkezelésével szemben, a 2 mM koncentrációban alkalmazott BM fokozta a szájüregi- és bélhámsejtek *C. albicans* általi károsodást, azonban ilyen mértékű károsító hatást nem figyeltünk meg az A-431 hüvelyi epitélium sejteknél. A kísérleti adataink alapján felmerült

annak a lehetősége, hogy a különböző típusú epitélium sejtvonalak más-más válasszal reagálnak a patogén általi invázió folyamatára, melynek szerves részét képezi a különböző citokinek (G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α) és kemokinek (IL-8, RANTES, CCL20) termelése és felszabadulása. Mint ahogy azt korábban már említettem az általuk termelt interleukinok kiemelt szerepet játszanak az immunsejtek - makrofágok, monociták, dendritikus sejtek, neutrofilek és T-limfociták - fertőzés helyére történő toborzásában. Így például az orális candidiasis elleni védelemben az IL-1 β , IL-6 és TGF- β révén differenciálódott Th17 sejtek, illetve az IL-8, GM-CSF és G-CSF által odavonzott cirkuláló neutrofilek kulcsszerepét azonosították [Ashman & Papadimitriou, 1995; Mostefaoui és mtsai., 2004; Jayatilake és mtsai., 2007; Naglik és mtsai., 2011; Höfs és mtsai., 2016]. Ezen irodalmi adatok összhangban vannak és egyben magyarázzák is a TR146 szájüregi epitélium sejteknél tapasztalt igen nagy IL-6 és IL-8 koncentrációkat.

Ami a Caco-2 és H4 bélhám epitélium sejteket illeti, az elsődlegesen a neutrofileket aktiváló IL-8 kemokin szerepét azonosították a candidiasis elleni védelemben [Saegusa és mtsai., 2007; Murzyn és mtsai., 2010; Falgier és mtsai., 2011; Naglik és mtsai., 2011]. A kísérleteinkben a *C. albicans* sejtekkel fertőzött C2BBel (Caco-2 klón) bélhámsejteknél ugyan jelentős növekedést tapasztaltunk mind az IL-6, mind az IL-8 koncentrációkban, de a sejtvonal IL-6 termelése így is igen kicsinek adódott. Ugyanis az TR146 szájüregi és C2BBel bélhámsejtek IL-6 és IL-8 termelése között mintegy két nagyságrendbeli különbséget tapasztaltunk függetlenül a *C. albicans* fertőzések, vagy a tényleges BM előkezelések/kezelések hatásától. Mindazonáltal nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt, hogy az invazív *C. albicans* sejtek aránya is töredéke, 12- 23 %-a ($1,1 \times 10^4$ - $2,3 \times 10^4$), volt az össz *C. albicans* sejtekének 3 órás inkubálási időt követően.

Ami a vulvovaginális candidiasist illeti, a TNF- α és a IL-1 α gyulladáskeltő citokinek relatíve nagy koncentrációban történő termelődését figyelték meg, míg más interleukineknél, mint amilyen az IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és a monocita kemotaktikus fehérje-1 (MCP-1), jelentősen kisebb növekedését tapasztaltak a fertőzést követően [Steele & Fidel, 2002; Schaller és mtsai., 2004; Höfs és mtsai., 2016]. Vizsgálatainkban kapott eredményeink összhangban vannak ezen kísérleti eredményekkel, hiszen a *C. albicans* sejtekkel fertőzött, kezeletlen A-431 hüvelyi hámsejtek IL-6 koncentrációja ($1,53 \pm 0,08$ pg/ml) igen kicsinek adódott, illetve a IL-8 szintek $118,7 \pm 26,2$ pg/ml is lényegesen elmaradtak a TR146 szájüregi epitéliális sejtektől (1197 ± 370 pg/ml), de nagyobbak bizonyultak a C2BBel bélhám epitélium sejteknél tapasztaltaknál ($43,2 \pm 3$ pg/ml). Az eredményeink alapján tehát elmondhatjuk, hogy míg a *C.*

albicans fertőzés általános növekedést, addig a BM kezelések (néhány esetben a BM előkezelések is) általános csökkenést eredményeztek az interleukinok termelésében.

A *C. albicans* sejtek epitélium sejtekkel történő interakciójából származó élettani megfigyelések, illetve a glükokortikoidok *C. albicans* sejtekre gyakorolt közvetlen pozitív élettani hatásai egyaránt arra figyelmeztetnek bennünket, hogy ezen szerek helyi alkalmazása várhatóan megnöveli a betegek fogékonyságát a különböző epiteliális *Candida* fertőzések kialakulására. Mivel a *C. albicans* az egészséges egyének nyálkahártyáját kolonizálja, így az immunválasz hiánya vagy épp az immunsejtek általi felismerés rendellenes működése predesztináló tényezője a gombás fertőzések kialakulásának. Így az epitélium, a *C. albicans* és a glükokortikoidok hármass kölcsönhatásának mélyebb megértése elsődleges fontosságúnak tűnik a *Candida* fajok által okozott gombafertőzések megelőzése és/vagy visszaszorítása érdekében.

7. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben a predesztináló tényezők számának növekedésével és elterjedésével párhuzamosan emelkedett a *C. albicans* által okozott megbetegedések gyakorisága. Az opportunista humán patogén gomba betegséget okozó képességét gyakran kapcsolják össze a dimorf *C. albicans*-ra jellemző élesztő→fonalas morfológiai átalakulással. A humán szervezetben a gombát érő legkülönbözőbb stresszhatások, illetve azok megváltozása, kiváltó okai lehetnek az élesztő→fonalas forma közötti átváltásnak, így a candidiasis kialakulásának [Sudbery, 2004; Sardi, 2013].

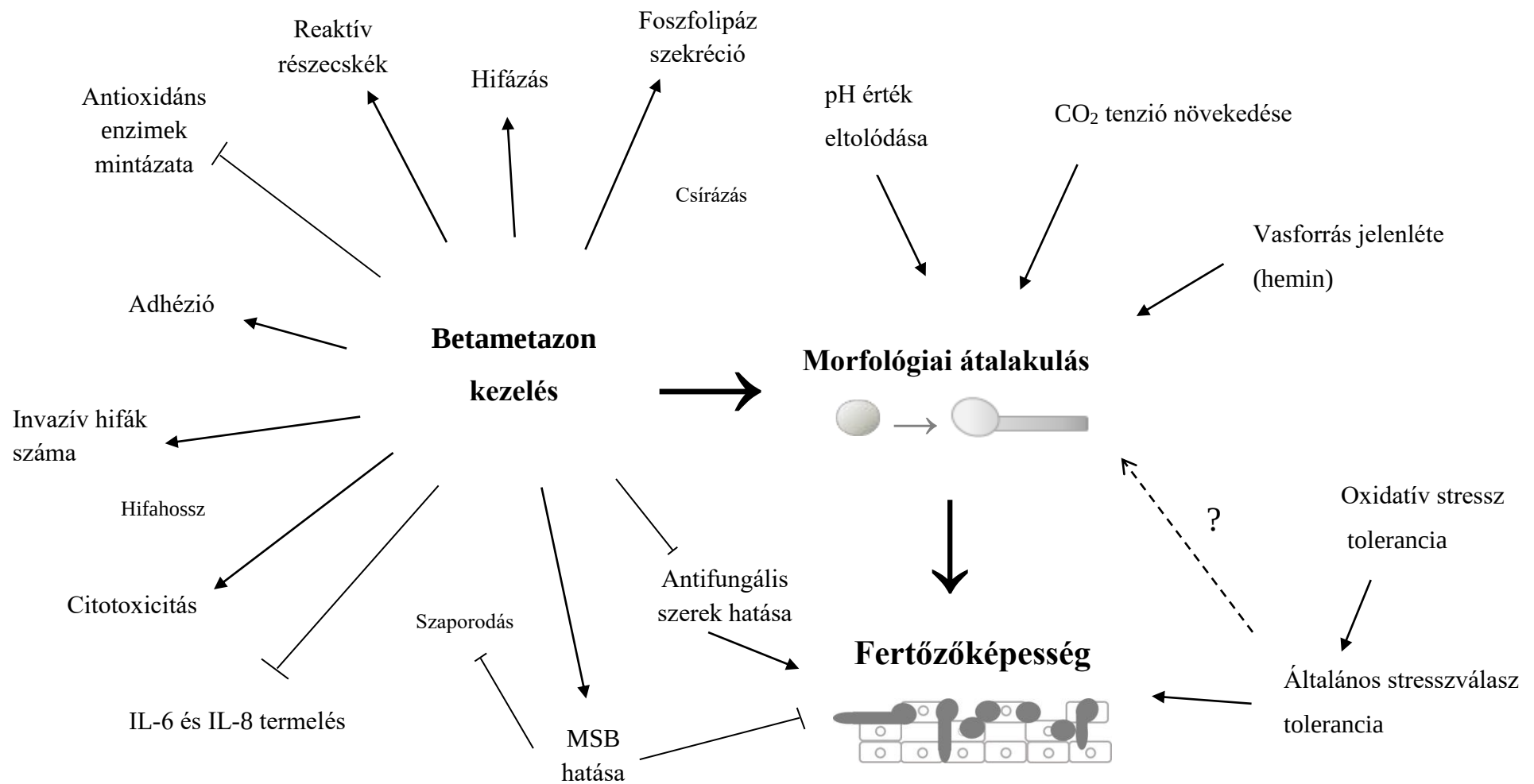
Kísérleteinkből kiderült, hogy a szájüreg, bél és hüvely nyálkahártyáját jellemző környezeti feltételekben bekövetkező változások, mint a pH eltolódása, CO₂ tenzió növekedése vagy vérzés létrejötte, befolyásolják a gomba morfológiai átalakulását, elősegítve a *Candida* infekció kialakulását **(6-8. ábrák, 21. ábra)**. A *C. albicans* fiziológiai és virulencia állapotának vizsgálatára kitűnően alkalmas, könnyedén mérhető, érzékeny morfológiai paraméter a hifa első elágazásáig eltelt idő.

A humán szervezetben, a behatoló mikroorganizmusok elpusztításában döntő szerepet játszanak a peroxidokat termelő fagocita sejtek. Kimutattuk, hogy a *C. albicans* krónikus oxidatív stresszhez történő alkalmazkodása védelmet jelent a gomba számára a gazdaszervezetet jellemző egyéb oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal, sejtmembrán, UPR, pH és hőstresszel szemben. Feltehetően az általunk vizsgált mutáns törzsekre jellemző folyamatosan indukált antioxidáns védelmi rendszer központi szerepet játszik az általános stressz toleranciában. Mindemellett a tapasztalt kereszttolerancia jelenségével nem hozható összefüggésbe a gomba morfológiai átalakulása, azaz a *C. albicans* a környezeti stresszre válaszolhat ugyan élesztő→hifa morfológiai átalakulással, de nem tekinthető ezen egyébként fontos virulencia faktor a környezeti stresszválasz indikátorának **(3. táblázat, 9. ábra, 21. ábra)**.

A glükokortikoidokat gyulladásgátló és immunszuppresszív hatásuk révén széles körben alkalmazzák a humán terápiában. Használatukkal kapcsolatban komoly problémát jelentenek a nagy gyakorisággal kialakuló gomba infekciók. Immunválaszt csökkentő hatásuk mellett azonban befolyásolhatják a gombák virulenciáját, morfológiai átalakulását. Így célunk volt egy a klinikumban használatos glükokortikoszteroid, a BM, opportunista patogén *C. albicans* virulenciájára és fiziológiájára gyakorolt hatásának a feltérképezése. Vizsgálataink révén kimutattuk, hogy a 4 mM koncentrációban alkalmazott BM előkezelés elősegíti a *C. albicans*

szövetekben történő elterjedéséért felelős extracelluláris foszfolipáz szekrécióját, valamint a gomba hifaképzését. A glükokortikoidokkal együtt gyakran alkalmaznak antifungális szereket a kialakuló mikózisok kezelésére. A BM kezelés azonban csökkentette a Nit és az AmB polién antifungális szerek hatásfokát, így a kortikoszteroidok és a polién antifungális szerek között fellépő interakció klinikai fontossággal bírhat a *C. albicans* fertőzések kezelésekor **(4 és 5. táblázat, 21. ábra)**. Továbbá, a BM kezelés módosította az élesztősejtek oxidatív stressz érzékenységét, ugyanis a szuperoxidot generáló MSB-tal történő együttes alkalmazása jelentős fungisztatikus (YPD tápközeg) vagy fungicid (RPMI-1640 tápközeg) hatást eredményezett, a tápközeg összetételétől függően. A helyileg alkalmazható glükokortikoid tartalmú gyógyszerek olyan oxidánsokkal kombinálva, mint a menadion és származékai, alkalmasak lehetnek egy új, hatékony antifungális stratégia kifejlesztésére a felületi mikózisok megelőzésére vagy kezelésére a bőrgyógyászat területén **(6-9. táblázatok, 21. ábra)**. Megvizsgáltuk a BM (1 és 2 mM) hatását a *C. albicans* szájüregi, bél vagy hüvelyi hámsejtekhez történő adhéziójára, inváziójára, valamint az epitélium sejtek károsodására és az interleukin felszabadulás mértékére. Elmondhatjuk, hogy a BM kezelés stimulálta a *C. albicans* hüvelyi epitélium sejtekhez történő tapadását és megkönnyítette a bél és hüvelyi epitélium sejtek invázióját függetlenül az invazív *C. albicans* hifák növekedési sebességétől bármely típusú epitélium sejten és vizsgált BM koncentráción. Ezen túlmenően, a BM fokozta a szájüregi és bélhám epitélium sejtek *C. albicans* általi károsítását. Emellett a BM csökkentette a szájüregi és hüvelyi epitélium sejtek IL-6 és IL-8 termelését, illetve a bélhámsejtek IL-6 felszabadulását. Ezen megfigyeléseink arra utalnak, hogy a BM glükokortikoszteroid alkalmazása várhatóan megnöveli a kockázatát a szájüregi, bélhám és hüvelyi epitélium *C. albicans* fertőzésének **(15-18. ábrák, 21. ábra)**.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a *C. albicans* környezetét jellemző faktorok bárminemű megváltozása, az immunválasz gyengülése esetleg hiánya, illetve az immunsejtek általi felismerés rendellenes működése predesztináló tényezője a candidiasisok kialakulásának. Így a morfológiai átalakulás infekcióban betöltött szerepének mélyebb megértése elsődleges fontosságúnak tűnik az általa okozott gombafertőzések megelőzése, gyors diagnosztizálása és/vagy viaszorítása érdekében.



21. ábra A *C. albicans* morfológiai átalakulását befolyásoló tényezők.

8. Summary

In the last decades, an increasing number of predisposing factors led to a dramatic increase in the incidence of *C. albicans* fungal infections. The invasive capability of *C. albicans*, which is an opportunistic pathogen dimorphic fungus, is frequently correlated to the yeast→hypha morphological transition. Within the human body the rapidly changing and diverse stress conditions promote yeast→hypha transitions and, therefore can result in various types of candidiasis [Sudbery, 2004; Sardi, 2013].

According to our experimental data the physiological changes such as the elevation of pH, increasing CO₂ concentration or bleeding in the oral cavity as well as in the intestinal and vaginal lumens are likely to facilitate the morphological transitions and even the invasion of the human body by *C. albicans* (**Figs 6-8 and 21**). In order to estimate the physiological and virulence statuses of *C. albicans* we monitored the time elapsed until the appearance of the first branch of hypha (“branching time”) as an easy-to use, well-established and sensitive morphological parameter.

In the human body, the peroxide-producer phagocytic cells play a crucial role in the destruction of the invading microorganisms. Our data indicates that the increased tolerance of *C. albicans* to the oxidative stress provided the fungus with a defence system also effective against oxidative, hyperosmotic, heavy metal, cell wall, cell membrane, unfolded protein, pH and thermal stress which all occur in the human body. The *C. albicans* mutants used in this study were characterized by continuously activated antioxidative defence system which may play an important role in the general stress tolerance of this opportunistic pathogen. In addition, the morphological transitions of *C. albicans* were not related to the stress cross-protection phenomena. Although the *C. albicans* may adapt to environmental stress by yeast→hyphae morphological transitions but this ability cannot be regarded as an alternative of the general environmental stress response (**Table 3, Figs 9 and 21**).

Glucocorticoids are widely used in the medicine for their anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Known and important side effects of such corticoid therapy increase the vulnerability of the patients to invasive fungal infections. This is probably a consequence of the immunosuppressive effects of the steroids, however, these drugs may also have a direct effect on the virulence and morphological transitions of *Candida* species. Our aims were to investigate the effects of the glucocorticoid betamethasone (BM) on the physiology and virulence of the opportunistic human pathogen *C. albicans*. In our research, we found out that 4 mM BM pre-treatments stimulated the extracellular phospholipase production

and hypha formation of *C. albicans*. The glucocorticoids often supplemented with antifungal agents in the clinical practice for the treatment of fungal infection. Because the BM treatments decreased the efficiency of the polyene antimycotics amphotericin B and nystatin against *C. albicans* the corticosteroid-polyene drug interactions may be of clinical importance when *C. albicans* infections are treated (**Tables 4 and 5, Fig. 21**). In addition, BM treatments modified the oxidative stress sensitivity of *C. albicans* cells. When the superoxide-generating agent MSB was combined with 2 or 4 mM BM these drug combinations resulted in either fungistatic (YPD medium) or fungicidal (RPMI-1640 medium) effects depending on the composition of cultural media. The combination of glucocorticoid medications with oxidants like menadione or menadione derivatives in topical applications may be a viable alternative in the development of new and efficient antifungal strategies for the prevention or even the cure of fungal infections, *e.g.* in the field of dermatology (**Tables 6-9, Fig. 21**). We investigated the effects of BM (1 and 2 mM) on the adherence and invasion of *C. albicans* to the oral, intestinal or vaginal epithelial cells as well as cell damages and interleukin releases of epithelial cells. The BM treatments stimulated the adherence of *C. albicans* to the vaginal epithelial cells and also promoted the invasion of the intestinal and vaginal epithelial cells by the fungus. These treatments did not influence the growth rates of invading *C. albicans* hyphae at any tested various epithelial cell types or BM concentrations tested. In addition, BM enhanced the *C. albicans*-initiated cell damages observed in oral and intestinal epithelial cell lines. Furthermore, the exposure of the oral and vaginal cells to BM decreased the expression of the proinflammatory IL-6 and IL-8 in these cell types and also the release of IL-6 by intestinal cells (**Figs 15-18 and 21**). These observations suggested that the use of applications of BM glucocorticoid may predispose patients to both superficial and mucosal *C. albicans* infections in the oral cavity, the gut and also in the vagina.

In summary, any disadvantageous environmental changes, *e.g.* the absence or suppression of immune recognition/immune response can lead to candidiasis. Therefore, a better understanding of the morphological transitions taking place during *C. albicans* infection seems to have a primary importance in the prevention, diagnosis and alleviation of fungal infections in the future.

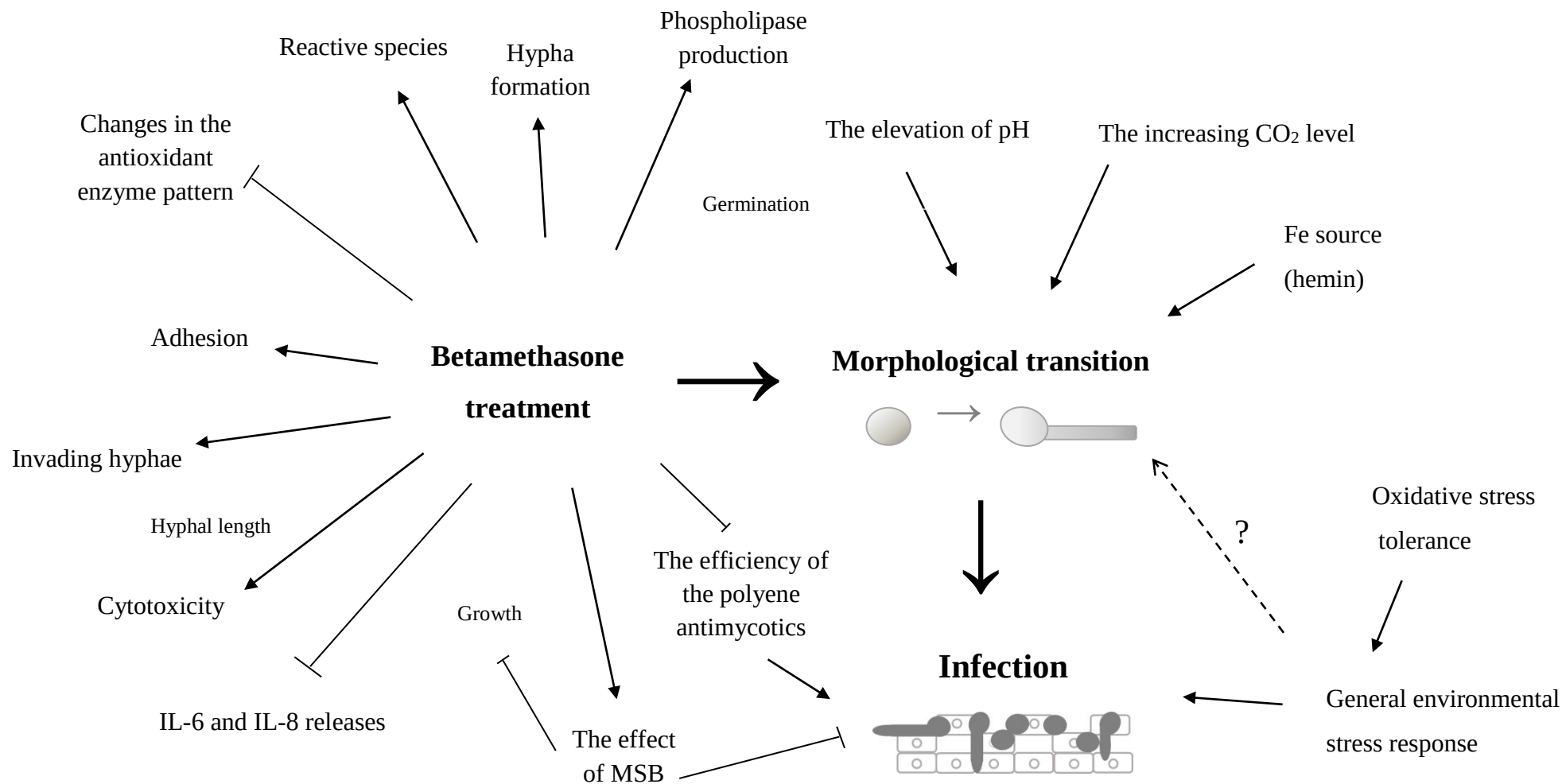


Figure 21. The morphological transitions of *C. albicans* are influenced by factors.

9. A kísérleti munkában résztvevő társszerzők munkájának ismertetése

Az értekezés alapjául szolgáló négy közlemény elkészítése során a társszerzők az alábbi részekben működtek közre:

Jakab Á, Antal K, Emri T, Boczonádi I, Imre A, Gebri E, Majoros L, Pfliegler WP, Szarka M, Balla Gy., Balla J, Pócsi I. The effect of hemin, carbon dioxide and pH on the branching frequencies of *Candida albicans* filamentous forms. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 2016, 63(4):387–403.

Kísérletek elvégzése: Jakab Ágnes

A videomikroszkóp rendszer kiépítése: Boczonádi Imre, Szarka Máté

Képelemzés elvégzése: Jakab Ágnes, Boczonádi Imre, Szarka Máté, Imre Alexandra

Statisztikai analízis: Dr. Antal Károly

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Jakab Ágnes, Dr. Emri Tamás, Prof. Dr. Pócsi István

Kézirat revízió: Prof. Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Balla György, Prof. Dr. Balla József, Dr. Majoros László, Dr. Gebri Enikő, Dr. Pfliegler Walter Péter

Jakab Á, Mogavero S, Förster TM, Pekmezovic M, Jablonowski N, Dombrádi V, Pócsi I, Hube B. Effects of the glucocorticoid betamethasone on the interaction of *Candida albicans* with human epithelial cells. Microbiology-(UK). 2016, 162(12):2116-2125.

Kísérletek elvégzése: Jakab Ágnes

Az A-431 epitélium sejteken végzett adhézión vizsgálat elvégzése: Marina Pekmezovic

Statisztikai analízis: Dr. Mogavero Selene

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Jakab Ágnes, Dr. Mogavero Selene, Förster Toni M, Jablonowski Nadja, Prof. Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Hube Bernhard

Az ábrák elkészítése: Dr. Mogavero Selene, Jakab Ágnes

Kézirat revízió: Prof. Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Hube Bernhard, Dr. Mogavero Selene, Prof. Dr. Dombrádi Viktor

Jakab Á, Emri T, Sipos L, Kiss Á, Kovács R, Dombrádi V, Kemény-Beke Á, Balla J, Majoros L, Pócsi I. Betamethasone augments the antifungal effect of menadione-towards a novel anti-*Candida albicans* combination therapy. J. Basic Microbiol. 2015, 55(8):973-981.

Kísérletek elvégzése: Jakab Ágnes, Kiss Ágnes, Sipos Lilla

Enzimológiai kísérletek megtervezése: Jakab Ágnes, Dr. Emri Tamás

Idő-ölés kísérlet megtervezése: Jakab Ágnes, Dr. Kovács Renátó

Statisztikai analízis: Jakab Ágnes, Dr. Emri Tamás

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Jakab Ágnes, Dr. Emri Tamás, Prof. Dr. Pócsi István

Kézirat revízió: Prof. Dr. Pócsi István, Prof. Dr. Dombrádi Viktor, Prof. Dr. Balla József, Dr. Majoros László, Dr. Kemény-Beke Ádám

Jakab Á, Antal K, Kiss A, Emri T, Pócsi I. Increased oxidative stress tolerance results in general stress tolerance in *Candida albicans* independently of stress-elicited morphological transitions. Folia Microbiol. 2014, 59:333-340.

Kísérletek elvégzése: Jakab Ágnes, Kiss Ágnes

Statisztikai analízis: Dr. Antal Károly

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Jakab Ágnes, Dr. Emri Tamás, Prof. Dr. Pócsi István

Kézirat revízió: Prof. Dr. Pócsi István

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban őszinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnnek Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető, egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette és szakmai irányításával, értékes tanácsaival mindvégig támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek az enzimológiai kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségért, és hogy lelkiismeretesen segítette munkámat, továbbá Dr. Leiter Éva és Dr. Pfliegler Valter Péter egyetemi adjunktusoknak értékes tanácsaikért.

Szeretném megköszönni Dr. Szemán-Nagy Gábor egyetemi adjunktusnak, Boczonádi Imre és Szarka Máté PhD hallgatóknak a videomikroszkópia terén nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Bernhard Hube (Department of Microbial Pathogenicity Mechanisms, Hans Knöll Institute, Jena, Germany) tanszékvezetőnek, amiért lehetővé tette számomra, hogy laborjában dolgozzak, támogatva így szakmai fejlődésemet, Dr. Selene Mogaveronak hasznos tanácsaiért, az elvégzett statisztikai kiértékelésért és az ábrák szerkesztésénél nyújtott nélkülözhetetlen segítségért; Toni M. Förster PhD hallgatónak és Nadja Jablonowski laboránsnak értékes tanácsaikért, illetve Marina Pekmezovic PhD hallgatónak a A-431 epitélium sejteken végzett adhéziós vizsgálatért.

Szeretném megköszönni Dr. Majoros László egyetemi docensnek a klinikai *C. albicans* törzseket, szakmai tanácsait és Dr. Kovács Renátó László tanársegédnek (DE ÁOK Orvosi Mikrobiológia Intézet) a túlélési képesség vizsgálatához nyújtott szakmai tanácsait és baráti támogatását.

Köszönettel tartozom Dr. Antal Károly főiskolai docensnek (EKE TTK Állattani Tanszék) a statisztikai kiértékelésért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Gálné Dr. Miklós Ida egyetemi docensnek (DE TTK Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék) a fluoreszcens mikroszkóp használatának lehetőségéért és ott Dr. Papp László Attilának a fluoreszcens képek elkészítéséért.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Dombrádi Viktor egyetemi tanárnak (DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet), Prof. Dr. Balla József egyetemi tanárnak (DE ÁOK Belgyógyászati Intézet, Nephrológiai Nem Önálló Tanszék), Prof. Dr. Balla György (DE ÁOK Gyermekgyógyászati Intézet, Neonatológiai Nem Önálló Tanszék) egyetemi tanárnak, Dr. Kemény-Beke Ádám egyetemi docensnek (DE ÁOK Szemészeti Tanszék) és Dr. Gebri Enikő

Zsuzsanna tanársegédnek (DE FOK, Arc- Állcsont és Szájsebészeti nem önálló Tanszék) hasznos tanácsaikért és hogy támogatták munkámat, szakmai fejlődésemet.

Szeretném megköszönni Kiss Ágnes, Sipos Lilla, Imre Alexandra, Bíró Brigitta, Borus Fanni, Farkas Csilla és Andrásdi Zsanett szakdolgozóknak a lelkes és odaadó munkájukat, továbbá a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék minden dolgozójának segítségüket, hogy munkámat kellemes légkörben barátok közt végezhettem, illetve Pócsi Imre laboratóriumi asszisztensnek, aki nélkülözhetetlen szakmai segítséget nyújtott a laboratóriumi munkám elindulásánál.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szüleimnek, nővéremnek, páromnak és barátaimnak a doktori munkám során nyújtott támogatásukért, biztatásukért.

A dolgozat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA K108989, K75883 és K112181) támogatásával készült.

Szakirodalmi jegyzék

Abelardo E, Pope L, Rajkumar K, Greenwood R, Nunez DA. A double-blind randomised clinical trial of the treatment of otitis externa using topical steroid alone versus topical steroid-antibiotic therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009, 266:41–45.

Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*. 1997, 24:1122–1128.

Acharya BR, Choudhury D, Das A, Chakrabarti G. Vitamin K3 disrupts the microtubule networks by binding to tubulin: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry*. 2009, 48:6963–6974.

Aframian DJ, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis*. 2006, 12:420–423.

Aguilo JJ, Iturralde M, Monleon I, Inarrea P, Pardo J, Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA. Cytotoxicity of quinone drugs on highly proliferative human leukemia T cells: reactive oxygen species generation and inactive shortened SOD1 isoform implications. *Chem Biol Interact*. 2012, 198:18–28.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002, 78:455–459.

Almeida RS, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res*. 2009; 9:1000–1012.

Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, Pla J. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2003, 2:351–361.

Alonso-Monge R, Román E, Nombela C, Pla J. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2006, 152:905–912.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 1985, 113:548–555.

Ashman, RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev*. 1995, 59:646–672.

Barelle CJ, Bohula EA, Kron SJ, Wessels D, Soll DR, Schäfer A, Brown AJ, Gow NA. Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2003, 2:398–410.

Barelle, CJ, Richard ML, Gaillardin C, Gow NA, Brown AJ. *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryot Cell*. 2006, 5:359–367.

Bates S, de la Rosa JM, MacCallum DM, Brown AJP, Gow NAR, Odds FC. *Candida albicans* Iff11, a secreted protein required for cell wall structure and virulence. *Infect. Immun*. 2007, 75:2922–2928.

- Belcher JD**, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal*. 2010, 12:233-248.
- Berbee ML**, Taylor JW. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can J Bot*. 1993, 71:1114–1127.
- Berman J**, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*. 2002; 3:918–930.
- Berry DB**, Guan Q, Hose J, Haroon S, Gebbia M, Heisler LE, Nislow C, Giaever G, Gasch AP. Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet*. 2011, 7: e1002353
- Bhuyan DK**, Huang X, Kuriakose G, Garner WH, Bhuyan KC. Menadione-induced oxidative stress accelerates onset of Emory mouse cataract in vivo. *Curr Eye Res*. 1997, 16:519–526.
- Bocheńska O**, Rapala-Kozik M, Wolak N, Braś G, Kozik A, Dubin A, Aoki W, Ueda M, Mak P. Secreted aspartic peptidases of *Candida albicans* liberate bactericidal hemocidins from human hemoglobin. *Peptides*. 2013, 48:49-58.
- Bodey GP**, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*. 2002, 112:380-385.
- Botas CM**, Kurlat I, Young SM, Sola A. Disseminated candidal infections and intravenous hydrocortisone in preterm infants. *Pediatrics*. 1995, 95:883-887.
- Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72:248-254.
- Brajtburg J**, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990, 34(2):183-188.
- Brown, AJP**. Expression of growth form-specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*, 2002, pp. 87–94. In R.A. Calderone (ed.) ASM press, Washington DC, USA.
- Brown AJ**, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene IV, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S, Leach MD. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol*. 2014, 217(Pt 1):144-155.
- Bykov VL**. Morphological analysis of the effect of corticosteroids on the development and course of vaginal candidiasis. *Akush. Ginekol (Mosk)*. 1989, 2:35-37.
- Bullen JJ**. The significance of iron in infection. *Reviews of Infectious Diseases*. 1981, 3:1127-1138.
- Cabib E**, Bowers B. Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J Biol Chem*. 1971, 246:152–159.
- Calderone RA**, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001, 9(7):327–335.
- Carver PL**. Micafungin. *Ann Pharmacother*. 2004, 38:1707-1721.

- Casanova M**, Cervera AM, Gozalbo D, Martinez JP. Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1997, 65:4360-4364.
- Cassone A**. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 2015, 122:785–794.
- Causton HC**, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2001, 12:323–337.
- Chang HT**, Tsai PW, Huang HH, Liu YS, Chien TS, Lan CY. LL37 and hBD-3 elevate the β -1,3-exoglucanase activity of *Candida albicans* Xog1p, resulting in reduced fungal adhesion to plastic. *Biochem. J*. 2012, 441:963–970.
- Cheetham J**, MacCallum DM, Doris KS, da Silva DA, Scorfield S, Odds F, Smith DA, Quinn J. MAPKKK-independent regulation of the Hog1 stress-activated protein kinase in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2011, 286:42002–42016.
- Chen D**, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*. 2003, 14: 214–229.
- Chen SCA**, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr. Opinion in Pharm*. 2010, 10:522–530.
- Chen SC**, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*. 2011a, 71(1):11-41.
- Chen C**, Pande K, French SD, Tuch BB, Noble SM. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2011b, 10:118-135.
- Chiu DTY**, Stults FH, Tappel AL. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta*. 1976, 445:558–566.
- Chlebowski RT**, Dietrich M, Akman S, Block JB. Vitamin K3 inhibition of malignant murine cell growth and human tumor colony formation. *Cancer Treat. Rep*. 1985, 69:527–532.
- Conti HR**, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect*. 2010, 12:518–527.
- Corbett MC**, Hingorani M, Boulton JE, Shilling JS. Subconjunctival betamethasone is of benefit after cataract surgery. *Eye Lond*. 1993, 7:744–748.
- Coutinho AE**, **Chapman KE**. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011, 335(1):2-13.
- Crawford A**, Wilson D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res*. 2015, 15(7) doi: 10.1093/femsyr/fov071.

Csank C, Haynes K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth FEMS Microbiol Lett. 2000, 189:115–120.

da Silva DA, Patterson MJ, Smith DA, MacCallum DM, Erwig LP, Morgan BA, Quinn J. Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. Mol Cell Biol. 2010, 30:4550–4563.

Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell Microbiol. 2010, 12:248–271.

Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93:5116–5121.

Davis D, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Ibrahim AS. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. Infect Immun. 2000, 68:5953–5959.

Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. Curr Genet. 2003, 44:1-7.

den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, Van't Hof W, Bolscher JG, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. Biochem J. 2005, 388(Pt 2):689-695.

Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. Aust N Z J Obstet. Gynaecol. 2001, 41:326–328.

Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. Lancet 2003, 362:1142-1151.

DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food Chem Toxicol. 2001, 39:209-228.

Dziadkowiec D, Krasowska A, Liebner A, Sigler K. Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol. 2007, 52:120–126.

Eisman B, Alonso-Monge R, Román E, Arana D, Nombela C, Pla J. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2006, 5:347-358.

Emri T, Bartók G, Szentirmai A. Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum* FEMS Microbiol Lett. 1994, 117:67–70.

Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. Free Radic Biol Med. 1997, 23:809–814.

Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. Mol Biol Cell. 2003, 14:1460-1467.

- Enjalbert B**, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJ, Quinn J. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2006, 17:1018–1032.
- Enoch DA**, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*. 2006, 55:809-818.
- Ergun S**, Cekici A, Topcuoglu N, Migliari DA, Külekçi G, Tanyeri H, Isik G. Oral status and *Candida* colonization in patients with Sjögren's Syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010, 15:e310-315.
- Ernst JF**. Transcription factors in *Candida albicans*- environmental control of morphogenesis. *Microbiology*. 2000, 146:1763–1774.
- Eschenauer G**, DePestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Management* 2007, 3:71-97.
- Falgier C**, Kegley S, Podgorski H, Heisel T, Storey K, Bendel CM, Gale CA. *Candida* species differ in their interactions with immature human gastrointestinal epithelial cells. *Pediatr Res*. 2011, 69:384-389.
- Fanello S**, Bouchara JP, Jousset N, Delbos V, Le Flohic AM. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. *J Hosp Infect*. 2001, 47(1):46-52.
- Fekete A**, Emri T, Gyetvai A, Gazdag Z, Pesti M, Varga Z, Balla J, Cserhádi C, Emődy L, Gergely L, Pócsi I. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a *t*-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 2007, 7:834-847.
- Fekete A**, Pócsi I, Emri T, Gyetvai A, Gazdag Z, Pesti M, Karányi Z, Majoros L, Gergely L, Pócsi I. Physiological and morphological characterization of *tert*-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J Basic Microbiol*. 2008, 48:480-487.
- Fidel PL Jr**. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol*. 2004, 12(5):220-227.
- Fidel PL**. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol*. 2007, 57:2–12.
- Fradin C**, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*. 2005, 56:397–415.
- Gantner BN**, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J*. 2005, 24:1277–1286.
- Garey KW**, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 2006; 43:2531.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. Genomic expression programmes in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2000, 11:4241–4257.

Gasch AP. Comparative genomics of the environmental stress responses in ascomycete fungi. *Yeast*. 2007, 24:961–976.

Garzillo C, Bagattini M, Bogdanović L, Di Popolo A, Iula VD, Catania MR, Raimondi F, Triassi M, Zarrilli R. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. *Ital J Pediatr*. 2017;43(1):10.

Ghannoum MA. *Candida albicans* antifungal-resistant strains: studies on adherence and other pathogenicity related characteristics. *Mycoses*. 1992, 35(5-6):131-139.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol Rev*. 2000, 13:122–143.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973, 51:1417–1423.

González-Párraga P, Alonso-Monge R, Plá J, Argüelles JC. Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS Yeast Res*. 2010, 10:747–756.

Gow NA. Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol*. 1997, 8(1-2):43-55.

Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2002, 5(4):366-371.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011, 10(2):112-122.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 2012, 15(4):406-412.

Grillot R, Lebeau B. Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals, 2005, A. Bryskier (ed), ASM Press, Washington DC, USA.

Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, Müller E, Putensen C, Rotstein C, Sganga G, Venditti M, Zaragoza Crespo R, Kullberg BJ. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med*. 2009, 35:55–62.

Gyetvai A, Emri T, Takács K, Dergez T, Fekete A, Pesti M, Pócsi I, Lenkey B. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS Yeast Res*. 2006, 6(8):1140-1148.

Gyetvai Á, Emri T, Fekete A, Varga Z, Gazdag Z, Pesti M, Belágyi J, Emődy L, Pócsi I, Lenkey B. High-dose methylprednisolone influences the physiology and virulence of *Candida albicans*

ambiguously and enhances the candidacidal activity of the polyene antibiotic amphotericin B and the superoxide- generating agent menadione. FEMS Yeast Res. 2007, 7:265-275.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol. 2004, 42:1519-1527.

Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. Front Neuroendocrinol. 2008, 29(2):273-291.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, 2007.

Han TL, Cannon RD, Villas-Boas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. Fungal Genet Biol. 2011, 48:747-763.

Hausauer DL, Gerami-Nejad M, Kistler-Anderson C, Gale CA. Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. Eukaryot Cell. 2005, 4:1273-1286.

Hegde KR, Varma SD. Combination of glycemic and oxidative stress influences implications in augmentation of cataract formation in diabetes. Free Radic. Res. 2005, 39:513-517.

Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001, 98:14637-14642.

Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G, Ernst JF. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. Infection and Immunity. 2002, 70:5246-5255.

Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand J Stat. 1979, 6:65-70.

Hovi L, Saarinen-Pihkala UM, Vettinen K, Saxen H. Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. Bone Marrow Transplant. 2000, 26:999-1004.

Howard DH. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. Clinical Microbiol. Rev. 1999, 12:394-404.

Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. J Microbiol. 2016, 54(3):149-169.

Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. Virulence. 2012, 3(3):251-61.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2004, 7(4):336-341.

- Jackson AP**, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, Aslett M, Barrell JF, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot PW, Goodwin TJ, Quail MA, McQuillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream MA, Renauld H, Spiering MJ, Tivey A, Gow NA, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* és *Candida albicans*. *Genome Res.* 2009, 19:2231-2244.
- Jacobsen ID**, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012, 10:85–93.
- Jamieson DJ**, Stephen DW, Terrière EC. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996, 138:83-88.
- Jayatilake JA**, Samaranayake LP, Lu Q, Jin LJ. IL-1alpha, IL-1ra and IL-8 are differentially induced by *Candida* in experimental oral candidiasis. *Oral Dis.* 2007, 13:426-433.
- Khader SA**, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2009, 2(5):403-411.
- Kitano T**, Yoda H, Tabata K, Miura M, Toriyama M, Motohashi S, Suzuki T. Vitamin K3 analogs induce selective tumor cytotoxicity in neuroblastoma. *Biol Pharm Bull.* 2012, 35:617-623.
- Klein RS**, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1984, 311(6):354-358.
- Klepser ME**, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42(5):1207-1212.
- Klepser ME**. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacotherapy.* 2001, 21(8 Pt 2):124S-132S.
- Klingspor L**, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegraki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, Ruhnke M, Arikian-Akdagli S, Salonen J, Dóczy I. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin Microbiol Infect.* 2015, 21(1):87.e1-87.e10.
- Knight SA**, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and Immunity.* 2005, 73:5482-5492.
- Koehler AP**, Chu KC, Houang ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999, 37(2):422-426.
- Kontoyiannis DP**, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002, 359(9312):1135-1144.
- Kovács R**, Gesztelyi R, Berényi R, Domán M, Kardos G, Juhász B, Majoros L. Killing rates exerted by caspofungin in 50 percent serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against *C. krusei* and *C. inconspicua*. *J Med Microbiol.* 2013, 63:186-194.

- Kullberg BJ**, Oude Lashof AM. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res.* 2002, 7:183191.
- Kuznets G**, Vigonsky E, Weissman Z, Lalli D, Gildor T, Kauffman SJ, Turano P, Becker J, Lewinson O, Kornitzer D. A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog.* 2014, 10:e1004407.
- Lampen JO**, Arnow PM, Safferman RS. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J Bacteriol.* 1960, 80:200–206.
- Lamson DW**, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin K. *Altern. Med. Rev.* 2003, 8:303–318.
- Leach MD**, Budge S, Walker L, Munro C, Cowen LE, Brown AJP. Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog.* 2012, 8:e1003069
- Lewis JG**, Learmonth RP, Watson K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 1995, 141:687–694.
- Lewis RE**. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin Proc.* 2011, 86(8):805–817.
- Lewis RE**, Fothergill AW. 2015. Diagnosis and Treatment of Fungal Infections. Eds: D. R. Hospenthal, M. G. Rinaldi.
- Li F**, Palecek SP. EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell.* 2003, 2:1266–1273.
- Li F**, Palecek SP. Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology.* 2008, 154:1193–1203.
- Lim CS**, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012, 31(1):21–31.
- Lionakis MS**, Lim JK, Lee CC, Murphy PM. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun.* 2011, 3:180–199.
- Lionakis MS**, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003, 362:1828–1838.
- Liu H**, Köhler J, Fink GR. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science.* 1994, 266:1723–1726.
- Liu HP**. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2001, 4:728–735.
- Liu X**, Zhang X, Zhang Z. Cu, Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2010, 584:1245–1250.
- Lo HJ**, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997, 90:939–949.

MacLaughlin DT, Santoro NF, Bauer HH, Lawrence D, Richardson GS. Two-dimensional gel electrophoresis of endometrial protein in human uterine fluids: qualitative and quantitative analysis. *Biol Reprod.* 1986, 34:579-585.

Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Saiman L, Patterson JE, Rinaldi MG, Wenzel RP, Soll DR. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. *J Clin Microbiol.* 1999, 37:2817-2828.

Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets.* 2005, 6:863-874.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013, 4(2):119-128.

Mech F, Wilson D, Lehnert T, Hube B, Thilo Figge M. Epithelial invasion outcompetes hypha development during *Candida albicans* infection as revealed by an image-based systems biology approach. *Cytometry A.* 2014, 85:126-139.

Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 1998, 1:687-692.

Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJ, Kurzai O, Hube B. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One.* 2012, 7:e52850.

Modrzejewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol.* 2015, 61:3-9.

Moisan M, Minni AM, Dominguez G, Helbling JC, Foury A, Henkous N, Dorey R, Béracochéa D. Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids.* 2014, 81:109-115.

Moreno AB, del Pozo AM, Borja M, San Segudo B. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 2003, 93:1344-1353.

Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3640-3645.

Mostefaoui Y, Bart C, Frenette M, Rouabhia M. *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cell Microbiol.* 2004, 6:1085-1096.

Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol.* 2011, 2011:346307.

Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*- epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015, 6:338-346.

Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, Höfs S, Gratacap RL, Robbins J, Runglall M, Murciano C, Blagojevic M, Thavaraj S, Förster TM, Hebecker B, Kasper L, Vizcay G, Iancu SI, Kichik N, Häder A, Kurzai O, Luo T, Krüger T, Kniemeyer O, Cota E, Bader O, Wheeler RT, Gutschmann T, Hube B, Naglik JR. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*. 2016, 532(7597):64-68.

Murdoch D, Plosker GL. Anidulafungin. *Drugs*. 2004, 64:2249-2258.

Murzyn A, Krasowska A, Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Łukaszewicz M, Dziadkowiec D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. *FEMS Microbiol Lett*. 2010, 310:17-23.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003, 67(3):400-428.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004, 6(10):915-926.

Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*. 2011, 13:963-976.

Nagy G, Hennig GW, Petrenyi, K, Kovacs L, Pocsí I, Dombradi V, Banfalvi G. Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014, 98:5185-5194.

Nasution O, Srinivasa K, Kim M, Kim YJ, Kim W, Jeong W, Choi W. Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2008, 7:2008-2011.

Nather K, Munro CA. Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS Microbiol Lett*. 2008, 285:137-145.

Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2015, 15(10):630-642.

Nicholls S, Straffon M, Enjalbert B, Nantel A, Macaskill S, Whiteway M, Brown AJP. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2004, 3:1111-1123.

Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010, 75(1):1-12.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010, 51(5):561-570.

Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*. 1984, 105:457-464.

Odds FC. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol*. 1985, 12:45-93.

Odds FC. *Candida* and Candidosis. second ed. Bailliere Tindall, London, United Kingdom, 1988.

- Odds FC**, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003, 11(6):272-279.
- Ohta Y**, Okada H, Majima Y, Ishiguro I. Anticataract action of vitamin E: its estimation using an in vitro steroid cataract model. *Ophthalmic Res.* 1996, 28(Suppl 2):16-25.
- Olsen, KW**, Bantseev V, Choh V. Menadione degrades the optical quality and mitochondrial integrity of bovine crystalline lenses. *Mol Vis.* 2011, 17:270-278.
- Oyetola EO**, Owotadem FJ, Agbelusi GA, Fatusi OA, Sanusi AA. Oral findings in chronic kidney disease: implications for management in developing countries. *BMC Oral Health.* 2015, 15:24.
- OztopScu P**, Kabadere S, Mercangoz A, Uyar R. Comparison of vitamins K1, K2 and K3 effects on growth of rat glioma and human glioblastoma multiforme cells in vitro. *Acta Neurol Belg.* 2004, 104:106-110.
- Palmer GD**, Robinson PG, Challacombe SJ, Birnbaum W, Croser D, Erridge PL, Hodgson T, Lewis D, McLaren A, Zakrzewska JM. Aetiological factors for oral manifestations of HIV. *Oral Dis.* 1996, 2(3):193-197.
- Palmer GE**, Kelly MN, Sturtevant JE. The *Candida albicans* vacuole is required for differentiation and efficient macrophage killing. *Eukaryot Cell.* 2005, 4:1677-1686.
- Pande K**, Chen C, Noble SM. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet.* 2013, 45:1088-1091.
- Park JI**, Grant CM, Attfield PV, Dawes IW. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Appl Environ Microbiol.* 1997, 63:3818-3824.
- Park JI**, Grant CM, Davies MJ, Dawes IW. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *J Biol Chem.* 1998, 273:22921-22928.
- Patterson JE**. Epidemiology of fungal infections in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 1999, 1:229-236.
- Pendrak ML**, Yan SS, Roberts DD. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Archives of Biochem and Biophys.* 2004, 426:148-156.
- Pendrak ML**, Roberts DD. Hemoglobin is an effective inducer of hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Medical Mycology.* 2007, 45:61-71.
- Perlroth J**, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007, 45:321-346.
- Persi MA**, Burnham JC, Duhring JL. Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Infect Immun.* 1985, 50:82-90.
- Pfaller MA**. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.* 1995, 30(Suppl.):32938.

- Pfaller MA**, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN and the International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol. 2003, 41:78-83.
- Pfaller MA**, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007, 20:133-163.
- Phan QT**, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. Infect Immun. 2000, 68:3485-3490.
- Phillips AJ**, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100:14327-14332.
- Pinilla I**, Izaguirre LB, Gonzalvo FJ, Piazuolo E, Garcia-Gonzalez MA, Sanchez-Cano AI, Sopena F. In vitro vitamin K3 effect on conjunctival fibroblast migration and proliferation. Sci World J. 2014, 916713.
- Pinto MC**, Mata AM, López-Barea J. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions Arch. Biochem. Biophys. 1984, 228:1-12.
- Polke M**, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. Adv Appl Microbiol. 2015, 91:139-235.
- Pope LM**, Cole GT. Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and nonlethal yeast in the infant mouse. Scan Electron Microsc. 1982, 4:1667-1676.
- Prosser, J**. Growth of Fungal Branching Systems. Mycologist, 1990, 4: 60-65.
- Pryor BD**, Bologna SG, Kahl LE. Risk factors for serious infection during treatment with cyclophosphamide and high-dose corticosteroids for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1996, 39:1475-1482.
- R Core Team**. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2014, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org>.
- Raab WP**. The interaction of corticosteroids and antimicrobial agents used in topical therapy. Br J Dermatol. 1971, 84:582-589.
- Ramamoorthy S**, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. Rheum Dis Clin North Am. 2016, 42(1):15-31, vii. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002.
- Ramanan N**, Wang Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. Science. 2000, 288:1062-1064.
- Rangel-Frausto MS**, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE Jr, Jarvis W, Dawson J, Wenzel RP. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis. 1999, 29:253-258.
- Ray TL**, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. Infect Immun. 1988, 56(8):1942-1949.

Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005, 353(16):1711-1723.

Rigopoulos D, Ioannides D, Kalogeromitros D, Gregoriou S, Katsambas A Pimecrolimus cream 1% vs. betamethasone 17-valerate 0.1% cream in the treatment of seborrhoeic dermatitis. A randomized open-label clinical trial. *Br J Dermatol*. 2004, 151(5):1071-1075.

Rizzetto L, De Filippo C, Cavalieri D. Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. *Eur J Immunol*. 2014, 44:3166-3181.

Rodaki A, Bohovych IM, Enjalbert B, Young T, Odds FC, Gow NAR, Brown AJP. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2009, 20:4845-4855.

Roggenkamp R, Sahm H, Wagner F. Microbial assimilation of methanol. Induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett*. 1974, 41:283-286.

Rovin BH, Tang Y, Sun J, Nagaraja HN, Hackshaw KV, Gray L, Rice R, Birmingham DJ, Yu CY, Spetie DN, Aziz A, Hebert LA. Clinical significance of fever in the systemic lupus erythematosus patient receiving steroid therapy. *Kidney Int*. 2005, 68:747-759.

Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells *Arch Biochem Biophys*. 1993, 302:348-355.

Ruhnke M. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis: ASM Press, Washington, DC. 2002, pp. 307-325.

Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, Hosoi T. Cytokine responses of intestinal epithelial-like Caco-2 cells to non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts in the presence of butyric acid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007, 71:2428-2434.

Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr Infect Dis J*. 2000, 19(4):319-324.

Sandini S, Stringaro A, Arancia S, Colone M, Mondello F, Murtas S, Girolamo A, Mastrangelo N, De Bernardis F. The MP65 gene is required for cell wall integrity, adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol*. 2011, 11:106.

Santos R, Buisson N, Knight S, Danci A, Camadro JM, Lesuisse E. Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. *Microbiology*. 2003, 149:579-588.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013, 62:10-24.

- Sargent J**, O'Marcaigh A, Smith O, Butler K, Gavin P, O'Sullivan M. *Candida albicans* associated necrotizing vasculitis producing life-threatening gastrointestinal hemorrhage. *Hum Pathol*. 2010, 41:602-604.
- Saville SP**, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*. 2003, 2:1053-1060.
- Schäcke H**, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*. 2002, 96(1):23-43.
- Schaller M**, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005, 48(6):365-377.
- Schaller M**, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology*. 2004, 150:2807-2813.
- Semchyshyn HM**, Abrat OB, Miedzobrodzki J, Inoue Y, Lushchak VI. Acetate but not propionate induces oxidative stress in bakers' yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep*. 2011, 16:15-23.
- Shen J**, Cowen LE, Griffin AM, Chan L, Köhler JR. The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:20918-20923.
- Shukla S**, Wu CP, Nandigama K, Ambudkar SV. The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2. *Mol Cancer Ther*. 2007, 6:3279-3286.
- Smith DA**, Nicholls S, Morgan BA, Brown AJP, Quinn J. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2004, 15:4179-4190.
- Sobel JD**. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci*. 1988, 544:547-557.
- Song IH**, Buttgereit F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol*. 2006, 246:142-146.
- Spies CM**, Strehl C, van der Goes MC, Bijlsma JW, Buttgereit F. Glucocorticoids. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011, 25(6):891-900.
- Staab JF**, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Sciences*. 1999, 283:1535-1538.
- Staab JF**, Datta K, Rhee P. Niche-specific requirement for hyphal wall protein 1 in virulence of *Candida albicans*. *PloS One*. 2013; 8:e80842.
- Steele C**, Fidel PL. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2002, 70:577-583.

- Stehr F**, Kretschmar M., Kröger C. Hube B., Schäfer W. Microbial lipases as virulence factors. *Molecular Catalysis*. 2003, 22:347-355.
- Stephan F**, Bah MS, Desterke C, Rézaiguia-Delclaux S, Foulet F, Duvaldestin P, Bretagne S. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis*. 2002, 35:1477-1483.
- Sticherling M**, Eicke C, Anger T. Practicability of combined treatment with calcipotriol/betamethasone gel (Daivobet1 Gel) and improvement of quality of life in patients with psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013, 11:420-427.
- Stichternoth C**, Fraund A, Setiadi E, Giasson L, Vecchiarelli A, Ernst JF. Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2011, 10:502-511.
- Stuck AE**, Minder CE, Frey FJ. Risk of infectious complications in patients taking glucocorticosteroids. *Rev Infect Dis*. 1989, 11(6):954-963.
- Sudbery PE**. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011, 9:737-748.
- Sudbery PE**, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004, 12:317-324.
- Suharwardy J**, Ling C, Bell JA, Munton CG. A comparative trial between diclofenac-gentamicin and betamethasone-neomycin drops in patients undergoing cataract extraction. *Eye*. 1994, 8:550-554.
- Sung JM**, Ko WC, Huang JJ. Candidaemia in patients with dialysis-dependent acute renal failure: aetiology, predisposing and prognostic factors. *Nephrol Dial Transplant*. 2001, 16:2348-2356.
- Suresh S**, Raghu D, Karunagaran D. Menadione (vitamin K3) induces apoptosis of human oral cancer cells and reduces their metastatic potential by modulating the expression of epithelial to mesenchymal transition markers and inhibiting migration. *Asian Pac J Cancer*. 2013, 14:5461-5465.
- Swidergall M, Ernst JF**. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryot. Cell*. 2014, 13:950-957.
- Toth V**, Szilágyi M, Anton F, Leiter É. Pócsi I, Emri T. Interactions between naturally occurring antifungal agents. *Acta Biol. Hung*. 2013, 64:510-512.
- Trotter EW**, Grant CM. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2002, 46:869-878.
- Urban CF**, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006, 8:668-676.
- Van de Veerdonk FL**, Kullberg BJ, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010, 16:453-459.

- Verrax J**, Pedrosa RC, Beck R, Dejeans N, Taper H, Calderon PB. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. *Curr Med Chem*. 2009, 16:1821-1830.
- Veses V**, Gow NA. Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2008, 8:1339-1348.
- Vylkova S**, Nayyar N, Li W, Edgerton M. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(1):154-161.
- Wächtler B**, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, Wilson D, Hube B. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One*. 2012, 7:e36952.
- Wächtler 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*. 2011a, 6:e17046.
- Wächtler B**, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011b, 55:4436-4439.
- Wagner G, Ottesen B**. Vaginal physiology during menstruation. *Ann Intern Med*. 1982, 96:921-923.
- Webb BC**, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998, 43:244-249.
- Weindl G**, Wagener J, Schaller M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res*. 2010, 89(7):666-675.
- Weindl G**, Wagener J, Schaller M. Interaction of the mucosal barrier with accessory immune cells during fungal infection. *Int. J. Med. Microbiol*. 2011, 301:431-435.
- Weissman Z**, Kornitzer D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol Microbiol*. 2004, 4:1209-1220.
- Welch BL**. The generalization of “Student’s” problem when several different population variances are involved. *Biometrika*. 1947, 34:28-35.
- White SJ**, Rosenbach A, Lephart P, Nguyen D, Benjamin A, Tzipori S, Whiteway M, Mecsas J, Kumamoto CA. Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. *PLoS Pathog*. 2007, 3(12):e184.
- Wieser R**, Adam G, Wagner A, Schüller C, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Bilinski T. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 1991, 266:12406-12411.

Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MA. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. J. Oral Microbiol. 2013, 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.22434.

Wilson D, Hebecker B, Moyes DL, Miramón P, Jablonowski N, Wisgott S, Allert S, Naglik JR, Hube B. Clotrimazole dampens vaginal inflammation and neutrophil infiltration in response to *Candida albicans* infection. Antimicrob Agents Chemother 2013, 57:5178-5180.

Wisplinghoff H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. Clin Infect Dis. 2003, 36:1103-1110.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004, 39:309-317.

Wright WL, Wenzel RP. Nosocomial *Candida*. Epidemiology, transmission, and prevention. Infect Dis Clin North Am. 1997; 11(2):411-425.

Zelena D, Makara BG. Steroids: The physiologic and pharmacologic effects of glucocorticoids. Orv Hetil. 2015, 156(35):1415-1425.

Zhang L, Onda K, Imai R, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun. 2003a, 307:308-314.

Zhang C, Baffi J, Cousins SW, Csaky KG. 2003. Oxidant-induced cell death in retinal pigment epithelium cells mediated through the release of apoptosis-inducing factor. J Cell Sci. 2003b, 116:1915-1923.

Zwolinska-Wcisło M, Budak A, Bogdał J, Trojanowska D, Stachura J. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. Med Sci Monit. 2001, 7:982-988.

Tárgyszavak- Keywords

Candida albicans, morfológiai átalakulás, epitélium sejt, glükokortikoszteroid, betametazon, stressz tolerancia, menadion, oxidatív stressz, antimikotikum

Candida albicans, morphological transitions, epithelial cell, glucocorticoid, betamethasone, stress tolerance, menadione, oxidative stress, antimycotics



Nyilvántartási szám: DEENK/92/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jakab Ágnes
Neptun kód: C2FIP5
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10051691

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jakab, Á.**, Antal, K., Emri, T., Boczonádi, I., Imre, A., Gebri, E., Majoros, L., Pfliegler, V. P., Szarka, M., Balla, G., Balla, J., Pócsi, I.: Effects of hemin, CO₂, and pH on the branching of *Candida albicans* filamentous forms.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 63 (4), 387-403, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.63.2016.023>
IF: 0.568 (2015)
2. **Jakab, Á.**, Mogavero, S., Förster, T. M., Pekmezovic, M., Jablonowski, N., Dombrádi, V., Pócsi, I., Hube, B.: Effects of the glucocorticoid betamethasone on the interaction of *Candida albicans* with human epithelial cells.
Microbiology-(UK). 162 (12), 2116-2125, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000383>
IF: 2.268 (2015)
3. **Jakab, Á.**, Emri, T., Sipos, L., Kiss, Á., Kovács, R. L., Dombrádi, V., Kemény-Beke, Á., Balla, J., Majoros, L., Pócsi, I.: Betamethasone augments the antifungal effect of menadione-towards a novel anti-combination therapy.
J. Basic Microbiol. 55 (8), 973-981, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201400903>
IF: 1.585
4. **Jakab, Á.**, Antal, K., Kiss, Á., Emri, T., Pócsi, I.: Increased oxidative stress tolerance results in general stress tolerance in *Candida albicans* independently of stress-elicited morphological transitions.
Folia Microbiol. 59 (4), 333-340, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-014-0305-7>
IF: 1





További közlemények

5. Bertóti, R., Vasas, G., Gonda, S., Nguyen, M. N., Szóke, É., **Jakab, Á.**, Pócsi, I., Emri, T.:
Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil.
J. Basic Microbiol. 56 (10), 1071-1079, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201600082>
IF: 1.585 (2015)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,006

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,421**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.10.



További benyújtott közlemények

Pfliegler WP, Boros E, Pázmándi K, **Jakab Á**, Zsuga I, Kovács R, Urbán E, Bácsi A, Majoros L, Pócsi I (2016). Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates evolve new phenotypes, but not higher pathogenicity. Molecular Nutrition and Food Research.

Boros E, Pfliegler WP, Kovács R, **Jakab Á**, Majoros L, Barta Z, Pócsi I (2017). Diverse and dynamic: physiological traits of *Candida albicans* isolates from a single hospital show low niche specialization. J. Basic Microbiology.

Értekezés témájához kapcsolódó előadások és poszterek listája

Jakab Á., Mogavero, S., Emri, T., Hube, B., Pócsi, I. (2016) Betametazon glükokortikoszteroid hatása a *Candida albicans* virulenciájára. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2016. évi Nagygyűlése, Keszthely.

Jakab Á., Sipos, Kiss Á., Emri T., Pócsi I. (2014) Glükokortikoszteroid hatása az opportunistá patogén *Candida albicans* virulenciájára és oxidatív stressz érzékenységre. Tavaszi Szél Konferencia, 1. helyezett, Debrecen.

Jakab Á., Sipos L., Kiss Á., Emri T., Pócsi I. (2014) Glucocorticosteroid effects the virulence of major fungal pathogen *Candida albicans*. National Young Biotechnology Students' Associations Conference, Szeged.

Jakab Á. (2012) A *Candida albicans* morfológiai átalakulása és központi környezeti stresszválasza. Biotechnológia szimpózium, DAB székház, Debrecen.

Jakab Á., Karányi Zs., Kiss Á., Pócsi I., Pócsi I. (2012) A *Candida albicans* morfológiai átalakulása, mint nem általános környezeti stresszválasz. Mycology Clusiana 51, 31-32. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest.