Doktori (PhD) értekezés tézisei

Digitális mikroszkópia és képelemző technikák a fonalasgombák patogenitásának vizsgálatában

Tálas László

Témavezető: Dr. Szemán-Nagy Gábor György



DEBRECENI EGYETEM Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2019

1. BEVEZETÉS

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

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

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

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

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

Statikus, snap-shot elemzések:

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

Pásztázó elektronmikroszkópia

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

Fénymikroszkópia

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

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

Képelemzési módszerek fejlesztése

1. A képelemzési protokollok fejlesztéséhez egy már statikus képelemzési módszerrel korábban vizsgált fajt választottunk. Ebben a fázisban a fonalas gomba *Aspergillus fumigatus* letapadását és növekedési mintázatának változását vizsgáljuk dinamikus képelemzési módszerrel. Célunk az, hogy az antifungális szerek hatását kövessük az *Aspergillus fumigatus* letapadási és növekedési dinamikája alapján.

2. Képelemzési módszereink fejlesztését nemcsak a fonalas gombákon végezzük, hanem kiterjesztjük élesztő gomba viszgálatára is. A statikus spóravizsgálatokról való áttérést a dinamikus vizsgálatokra alkalmazzuk klinikai *Candida albicans* izolátumok összehasonlítása során is. Vizsgálatainkban mérjük a Brown mozgás megszűnését, mint a felülethez való adhézió indikátorát, valamint az első hifa megjelenését és az első hifa elágazásának kezdetét. Az elemezések kiterjednek a fonalas gomba (*A. fumigatus*) spóráinak és az élesztő (*C. albicans*) izolátumok növekedési dinamikáját jellemző paramétereinek összehasonlítására is. Feltételezzük, hogy a *C.albcans* és az *A.fumigatus* spóraletapadási dinamikái egyaránt vizsgálhatók a brown mozgás megszünésére alapuló dinamikus adhézióvizsgálati módszerrel.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Statikus képelemzési módszer kidolgozása Aspergillus nidulanson

3.1.1 Aspergillus nidulans általános minta előkészítése SEM-hez

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

- tNJ 11 kontroll: a TNJ 12 (delta-chiB) kontroll törzse

- tNJ 36 kontroll: egy általánosan használt kontroll törzs

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

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

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

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

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

3.1.3 Statikus képanalízis

A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) által készített képek információkat szolgáltatnak a gomba spórákról, azok szemmel látható morfológiai jellegzetességeiről. Ahhoz azonban, hogy számszerű adatokhoz jussunk, számítógépes szoftverek alkalmazása elengedhetetlen, melyek lehetőséget nyújtanak kvalitatív és kvantitatív mérések elvégzéséhez az adott képeken. Digitális képanalízis során a SEM által készített képeket az ImageJ számítógépes programmal elemeztük.

3.2 képelemzési módszer tökéletesítése *Aspergillus fumigatussal* fertőzött egerek szövettani metszetein

3.2.1 Aspergillus fumigatus izolátum

Mivel az *A. fumigatus* elsősorban a tüdőben okoz aszpergillózist, ezért az Af293-(FGSCA1100, IHEM18963) klinikai izolátumot választottuk, mely emberi tüdőszövetből származik, és ezt tenyésztettük 37 ° C-on nitrát minimál táptalajon (NMM).

3.2.2 Kísérleti állatok tenyésztési feltételei

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

3.2.3 Kísérleti állatok fertőzése

Az A. *fumigatus* törzs patogenitását három különálló kísérletben vizsgáltuk. A kísérlethez 8-10 hetes nőstény és hím BALB/c egereket használtunk. Az egércsoportokat *i.p.* (intraperitoneálisan) adott ciklofoszfamiddal (CP) (250mg/kg) tettük neutrofil sejtszám hiányossá (neutropeniássá) illetve s.c.(szubkután) adott hidrokortizonnal (HC) (125 mg/kg) tettük mind aneutrophilok, mind a lymphocyták számának csökkentésével leukopéniássá. A Nembutal-lal (100mg/kg) elaltatott egerek 3,5x10⁶ db konídiumot kaptak 50 µl-enként a fertőzéskor egyszer, intranazálisan. Ilyen körülmények között az inokulum normál légzéssel érte el a tüdőt. A kísérleti állatokat 3 alcsoportra osztottuk:

- a) nem fertőzött, immunszupresszánst nem kapott
- b) immunszupresszált, nem fertőzött
- c) immunszupresszánst nem kapott megfertőzött egerek.

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

3.2.4 A statikus képelemzés

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

A válogatást ezután kiterjesztettük minden képpontra addig, amíg a pixel értékek közötti különbségek elérhetőek voltak. Ezt úgy értük el, hogy egy pontra kattintottunk egy olyan képen, ami nem érte el azt az értékhatárt, ami a relatív szürke és telített színárnyalatokon alapult. Részecske analízist végeztünk, hogy megszámoljuk és megmérjük az alakokat a bináris képen. A 2 μ m² -nél kisebb tárgyakat figyelmen kívül hagytuk. A tárgyakon felfedezni vélt lyukakat a tárgy részének tekintettük, ugyanis ezek létrejöhettek a nem egyenletes festés következtében is. A különbségnormát az adateloszlás mértékének számításához a középértékből és t tesztből kalkuláltuk ki.

3.3 Mycoplasma in vitro fertőzés dinamikai képelemzése

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

3.3.1 Sejtkultúrák

- HaCaT sejtek. Emberi bőr hámsejtekből származik, melyek spontán *in vitro* átalakultak a hosszú inkubáció során.

 OCM-1 sejtek. Rosszindulatú OCM-1 (emberi choroidea melanoma-1) sejtvonal a helyi klinikai Szemészet Osztályról származik (84). Az OCM1 sejtvonal érhártya melanoma biopsziával nyert mintájából származik (85).

- Laphámrák (SCC) sejteket (86) Prof. Reinhard Zeidler, Helmholtztól kaptuk Münchenből.

3.3.2 Sejtnövekedés

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

3.3.3 Time-lapse scanning mikroszkópia (TLS)

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

- mycoplasmak valós idejű megjelenése

- fertőzés időtartama,

- megtámadott emlős sejtek bomlása.

3.3.4 A Dinamikus elemzés

A képelemzéshez a Fiji képelemző szoftvert használtunk. A sejtpázsit méretének meghatározásához a monolavert elválasztottuk a megfigyelt felületek hátterétől. Ezután a szegmentált területet -azaz a sejtek kötődését a tenvésztő felszínhez – a látótér százalékában kifejeztük. Hasonló módszert alkalmaztunk, amikor a Mycoplasma fertőzés biofilmjének kiteriedését határoztuk meg. Csak a *Mycoplasma* fertőzés biofilmie volt látható, az egyedi Mycoplasma sejteket nem lehetett látni a time-lapse képelemzés során a megvilágításra fizikai használt hullámhossz behatároló hatása miatt. Ahhoz, hogy az emlős seitek mozgékonyságát elemezni tudjuk, először a hátteret távolítottuk el a képekből. Így csak az elemezni kívánt struktúrák maradtak. Az egymást követő képek különbsége biztosított információt a mozgó sejtekről. Az így szerzett motilitási értékeket felhasználtuk az osztódási idő meghatározására is, amikor a sejtek leváltak a tenyésztési felületről. Ily módon az egyes sejtek leválásának ideje meghatározható. Digitális képelemzést alkalmaztunk öt, véletlenszerűen kiválasztott, reprezentatív régióra az egyes sejttenyészetekben.

3.4 Dinamikus képelemzési módszer fejlesztése Aspergillus fumigatus patogenitási dinamikájának vizsgálatához

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

3.4.1 Digitális képfeldolgozás

Az LTS rendszerek a számozott képsorozatokat egy specializált (barebone) Windows 7 operációs rendszert futtató egyéni számítógépre (Biological Image Processing Station, BIPS) továbbítják.

3.4.1.1 Képjavító szekvenciák

A képek betöltése után az elemzés a a képszűréssel/ a kép filtrációjával kezdődik, hogy A képek betöltése (1. a ábra) után az elemzés a a képszűréssel/ a kép filtrációjával kezdődik (1. b ábra), hogy kompenzáljuk a fourier-térben jelentkező, zavaró alacsony frekvenciát, egyenletlen megvilágítást, ami árnyékolást és nem egységes hátteret eredményezhet. Ez bonyolítja a szegmentálási folyamatot, mivel a képen belül szürke szintek lehetnek, amelyek mind az objektum, mind a háttér vonatkozásában közösek, ezért egy olyan küszöbérték (7.c ábra) kiválasztása, amely a kettőt elválasztja, nehéz lenne. Ha egy ilyen szürke színű képre küszöbértékeket alkalmazunk, az sok műterméket eredményez a vizsgálni kívánt szekvencián. A háttér szürke szintjének változásait úgy javíthatjuk, hogy a képet, mint 2D jelet kezeljük és high-pass filter/féligáteresztő szűrésnek tesszük ki, amely az ImageJ beépített "Bandpass Filter" funkciójával valósul meg. Ezáltal eltávolítjuk a képzajt Gauss szűréssel Fourier-térben. A szűrő sugara 40 μmes pixel-ekvivalensre van beállítva (40 képpont a hifák képéhez, 200 képpont a spórákhoz), ami nagy relatív paraméter a tipikus hifák szélességéhez képest (körülbelül 2-4 μm). Minden magas frekvenciájú speckle (foltos)

zajt ezt követően eltávolítunk a mediánszűréssel. A képet ezután súlyozottan három, 8 bit-es szürkeárnyalatos képre osztjuk, amelyek a három elsődleges színkomponenst (piros, zöld és kék) reprezentálják. A szürke szintű küszöb, amelyet az ImageJ az izoadatalgoritmussal számít - bináris képet eredményez (1. c ábra). A képanalízis következő szakasza attól függ, hogy a spórák vagy a hifák a vizsgálat elsődleges tárgyai (1. d ábra). Az életképes spórák és hifák ugyanazon a képen ritkán lesznek jelen, ugyanis a ki nem hifázott spórákat vagy elfedik a hifák, vagy a hifaelemzésnél műtermékként érzékeli őket a rendszer, és eltávolítja.



1. ábra: A gomba morfológiájának jellemzésére használt algoritmus.

3.4.1.2 Spórák elemzése

Spórák esetében (1.e ábra) a "Watershed " funkciót (1. f ábra) használtuk, az egymáshoz érő objektumok elválasztására (1. g ábra). A parancs először elvégzi az euklideszi távolság méréseket (Euclidean distance. mapping, EDM), és megtalálja a végső erodált pontokat (ultimate erosion point, UEP). Ezután a lehető legnagyobb mértékben meghosszabbítja az egyes UEP-eket (az EDM csúcsai vagy helyi maximum pontok) - akár a részecske széléig is, vagy akár egy másik (növekvő) UEP régiójáig. Az ismertetett eljárás illeszkedik a legjobban a sima, domború tárgyakhoz, amelyek túlságosan nem fedik át egymást. Az ImageJ "Particle Analyzer" -t a kvantitatív képelemzésére (1 h ábra) használja. Az Analyze Particles-t háromféle képpen használhatjuk

Az Analyze Particles-t háromféle képpen használhatjuk:Küszöbölt képen komponens detektálás , Méret és morfológia alapján történő válogatás, Szegmentált kép kvantitatív analízise . A terület (A) és körkörösség (B) adatainak alapján, az utóbbit a következőképpen definiálják: B = $4.\pi$.APP2 ahol, Ap a szóban forgó tárgy kivetített területe, és P a mért kerület. Kör esetén Ap = π r2 és P = 2π r, tehát B = 1.

Minél nagyobb a P az Ap-hez képest, annál kevésbé kör alakú az objektum, és így a B értéke csökken. Számos iparilag releváns gomba spórája, mint például az Aspergillus spórái viszonylag gömbölyűek. Az ettől eltérő alakokat ellipszoidnak vagy geoidnek nevezzük. A meghatározott minimális értéket (Ap, min) meghaladó vetített területekkel rendelkező tárgyak melyek továbbá a küszöbértéknél (Cs, min) nagyobb körkörösséggel rendelkeznek spóráknak tekinthetőek; a fennmaradó tárgyak műterméknek/artifaktumoknak minősülnek, és kizárandók az elemzésből.

4.4.1.3 Hífák elemzése

Ha hifák a vizsgálat tárgyai (1. j ábra), akkor egy bináris zárás (binary closing) műveletet hajtunk végre az analízis során, hogy eltávolítsuk az objektumok apró hibáit. Ezt követően a "Particle Analyzer "kiválogatja azokat az objektumokat, amely Ap, min fölötti vetített területre esik, és a kerekség kisebb, mint egy második küszöbérték (1.h,i ábra). Azokat a 46 tárgyakat, amelyek nem felelnek meg ezeknek a kritériumoknak, kizárja az elemzésből. A hifa elemek bináris képét ezután vázstruktúrákig erodáljuk ("skeletonisation") (1.. j ábra). Ez egy gyors párhuzamos algoritmus a digitális minta elvékonyításához, amelyben egy keresőfunkció jelzi a 256 lehetséges 3 × 3 szomszédos konfigurációt minden előtér pixelnél. Az algoritmus kiszámítja az indexek számát minden objektumra, és a keresési táblázatot használja annak eldöntésére, hogy a képpont kiküszöbölhető-e. A "skeletonisation" a képelemzés során időnként artifakt pontokat vagy ágakat eredményezhet. A műtermék pontok (olyan helyek, ahol a pixel nagyobb, mint egy képpont szélesség) az ágpontok helytelen osztályozásához vezethetnek, amik az artifakt ágak a hifák hosszának és a hifa csúcsok számának túlbecsléséhez vezethetnek (1. k ábra). Ezek eltávolíthatók "metszés" (1. i ábra) útján, ez az eljárás továbbá eltávolítja a megmaradt apró hibákat is a képről.

4.4.1.4 Digitális Analízis

Brown mozgás megszűnése, nem letapadt spórák mozgása, hifázás

A spórák mozgékonyságának értékeléséhez a különbségeket az egymást követő mozgó képek területeinek kivonásával pixelben fejeztük ki. Ezek a numerikus értékek biztosítják az információt a spórák helyzetváltozásáról, a mozgás korábbi állapotához viszonyítva. A mozgékonysági értékeket szintén felhasználtuk az idő meghatározására, amikor a spórák letapadtak a tenyésztőedény aljához.

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

Hifa kiterjedés mozgásának elemzése

A hifák növekedésének vizsgálatához hasonló módszert választottunk. Egy hifa területének vizsgálatánál a terület drasztikus emelkedése jelentette a hifanövekedés elindulását. Az összemosódó hifák elkerülése érdekében egy a felhasználó által irányított tér- és időbeli elkülönítő módszert használtunk. A módszer lényege, hogy a spórát egy 10 x 10 pixeles négyzetben vizsgáltuk, így a hifák kiterjedésének területét egységnyi időben és térben határoztuk meg. Ezáltal kiszűrtük a felülethez rosszul kitapadt hifákat, lebegő részecskéket és hifa részleteket az elemzendő területen, melyek eltorzítják a vizsgálat eredményét. Így csak azokat az egyedi spórákat vizsgáltuk, amelyek azonos fókuszsíkon végeztek mozgást.

3.5 Dinamikus képelemző módszer tökéletesítése Candida albicans izolátumokon

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

A kísérletre felhasznált klinikai izolátumok és kódolásuk a következő:

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

1MUT- AF06- tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs. 6mmol L^{-1} tBOOH- val kezelt mutáns

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A mutáns és klinikai törzsek tapadási és fertőzési stratégiája közötti eltérés vizsgálatához. rendszerünket CO_2 inkubátorban közel fiziológiás körülmények között állítottuk be és ezekkel hasonlítottuk össze.Külön vizsgáltuk az egyéni és csoportos spórákat törzsenként. A fent említett kritériumok alapján tudjuk legjobban detektálni egy spóra vagy spóracsoport letapadási és hifázási dinamikáját, amelyek a virulenciafaktor befolyásoló tényezői. Ezután egymás függvényében vizsgáltuk ezen értékeket, hogy megtudjuk, mennyire korrelálnak egymással eredményeink. Erre azért volt szükség, hogy meghatározzuk a vizsgált tényezők közötti kölcsönhatásokat.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Genetikailag módosított *Aspergillus nidulans* gombatörzsek spóramorfológiájának összehasonlító vizsgálata

4.1.2 Törzsek összesített spóravizsgálata

A 7 törzs spóráinak átmérőire vonatkozó adatokat összesítve egy közös diagramon jól látható, hogy az egyes törzsekhez tartozó spórák átmérői lineárisan növekvő egyeneseket alkotnak. (2. ábra)



2. ábra: Átmérők összefoglaló diagramja

4.1.3 Méretkülönbségek vizsgálatának eredménye

A genetikai módosítások befolyásolhatják a képződő spóra sejtek morfológiájának kialakulásának bizonyos szakaszait, ezzel egyedi jellegzetességeket képesek kialakítani. Az általános méretkülönbségekkel, melyeket a legnagyobb és legkisebb

spóra átmérőjének különbséget ad, ez a különbség számokkal is igazolható. (3. ábra)



3. ábra: gombatörzsek spóráinak általános méretklülönbségeinek növekevése

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

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

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

4.2 Aspergillus fumigatus patogenitási dinamikájának vizsgálata egér modellben

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

4.2.1 Szövettani vizsgálat és károsodás a tüdőben

A tüdőben lévő hifák fejlődését Gömöri-Grocott ezüstimpregnációval (GMS) is láthatóvá tettük. Az immunkompetens egerek tüdejéből nyert szöveti metszetekben nem látható konídium vagy hifa (4.a ábra). A CP immunszupresszált egerek szöveti metszetében GMS konjugátum már 6 óra elteltével megfigyelhető volt (4 b. ábra), a hifák 14 óra után jelentek meg (4 c. ábra), a hifák mérete fokozatosan nő 30 óra elteltével (4 d ábra), 48 óra (4 e. ábra) és 96 óra fertőzés után (4 f. ábra).



4. ábra: A tüdőszövet metszetei Gömöri-Grocott ezüstimpregnációval (GMS). a; kontroll tüdő metszet; b: fertőzött tüdő metszete 6 h; c: 14 h; d: 30 h; e: 48 h; f: 96 h; a fertőzés után

A HC (5 a. ábra) és az CP (5 b. ábra) immunszupresszió után 96 órával az immunszupresszáns által indukált hifák növekedésének összehasonlítása egyértelműen kimutatta, hogy a CP tüdőben való immunszupresszív hatása sokkal erősebb volt, mint a HC.



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

4.2.2 Hifa növekedés vizsgálata az agyban

Néhány egérnél hifa fejlődést figyeltünk meg az agyban a GMS után. Az immunkompetens, megfertőzött egerekben nem látható sem konídium, sem hifa (6 a. ábra). A CP-vel kezelt egerek mintáiban a fertőzés után 96 órával konídiumok, és hosszú hifák láthatók, azonban a konídiumok 50%-a nem mutatott hifanövekedést. (6 b. ábra)



- 6. ábra: Agyszövetek festése GMS-sel
- a: Kontroll agy szövet
- b: Agytörzs festése 96 h fertőzés után.

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

4.2.3 Pulmonális hifák hossza

Sem a hifanövekedést, sem a plakk képződést nem vizsgáltuk a megfertőzött, immunkompetens egereknél, mivel nem alakult ki plakk. Az hifafonalak növekedésének összehasonlítása immunszupresszánsok jelenlétében megmutatta, hogy 4 nappal a HC kezelés után kb. a hifák 40%-a 5µm-nél rövidebb volt. A hifa hosszabb volt a CP-vel kezelt egereknél a HC-vel kezeltekhez képest, ezért a további kísérletekhez CP-t használtunk, HC helyett. A maximális hifahossz nagyobb, mint 40µm volt CP-vel kezelteknél, és csak 26 µm volt HC-vel kezeltek esetében Ahossz eloszlása a CP kezelés után fokozatos növekedést mutatott.

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

10%-a elérte az átlag 15-30 μ m-es hosszt, és kevesebb, mint 2%-a akár 145 μ m-esre is megnőtt. A maximális hossz 165 μ m volt a 96 óra elteltével.

4.2.4 Pulmonális aszpergillózis

A hifák hossza mellett a plakkok átmérőjét és a hifa sűrűséget is összehasonlítottuk az immunszupresszált állatokban. Az átlagos pulmonalis plakkátmérők a HC-nél szignifikánsan kisebbek voltak, mint a CP-kezelt egereknél. A hifa sűrűség a tüdőben többnyire nagyobb volt, mint a CP kezelt egereknél. A hifális sűrűség a tüdőben közel háromszor magasabb volt CP kezelés után, mint HC kezelést követően.

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

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

4.3 Mycoplasma fertőzés korai detektálása dinamikus képelemzési módszerrel

4.3.1 A Mycoplasmával fertőzött sejttenyészetek morfológiája és dinamikája

A fertőzést követő első 15-20 órában a baktérium jelenlétére a tenyészetben a megváltozott sejtmorfológia, illetve a csökkent motilitás és osztódási képesség alapján következtethettünk. A kontroll tenyészettel ellentétben a fertőzött sejtek nem létesítenek adhéziós kapcsolatokat egymással, így nem alkotnak telepeket, ezen kívül nem képesek felvenni a rájuk jellemző ellapult, illetve megnyúlt morfológiát sem. A fertőzött HaCaT kultúrában több helyen a citoplazmából kitüremkedő sejtmagot láthatunk.

A kontroll tenyészetek konfluenciájában fokozatos növekedést, míg a fertőzött sejtek esetében lassú csökkenést láthatunk, ez utóbbi a sejtek csökkent vagy teljesen megszűnt osztódási képességének és a kismértékű sejtpusztulásnak köszönhető.

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

4.3.2 A sejtek felválása, aggregátumok megjelenése, biofilm képződés

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

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

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

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

4.4 Aspergillus fumigatus patogenitási dinamikájának vizsgálata hosszútávú videomikroszkópos rendszerrel

Miután az Aspergillus fumigatus spórákat Amphotericin-B-vel (AMB) és vorikonazole-lal (VRC) kezeltük, megfigyeltük a spóramozgást time-lapse mikroszkóppal. Az első tényező, amit figyeltünk a Brown mozgás megszünése volt, ami a letapadást kezdetét jelezte. Ezt követte a hifázás megkezdése, és az első hifaelágazás megjelenésének ideje. Ezek a paramétek a gomba virulencia faktorának változását mutatták gátlószerek jelenlétében

4.4.1 Brown mozgás megszűnése

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

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

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

4.4.2 Hifázás kezdetének vizsgálata

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

Amikor a konídiát 0.25 µg/ml-es koncentrációjú AMB-vel kezeltük, a konídium nem csírázott. Amikor a konídiumokat VCR-vel kezeltük, 0.25 µg/ml-es koncentrációban nem gátolta csak késleltette a csírázást.

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

4.5.1 Csoportos spóravizsgálatok

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

5.5.1.1 Brown mozgás megszűnésének vizsgálata

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

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

A Brown mozgások megszűnésének különbségei alapján a letapadási faktor heterogenitásának leírása

Az elemzés értelmezésében tehát tehát minél kevésbé térnek el az izolátumok az átlagtól, annál egységesebb a letapadásuk. A letapadási heterogenitás szempontjából legegységesebb izolátumok: a kontrol törzs (1VAD), a tBOOH tulajdonságokkal rendelkező mutáns törzs (1MUT), illetve a 45 éves nő (3VAD) kanüljéből vett klinikai izolátum. Ezzel szemben a legtágabb időintervallumban a következő izolátumok tapadtak le: 10 éves lány szájüregéből vett klinikai izolátumból létrehozott tBOOH toleráns mutáns (2MUT) illetve 42 éves nő vizeletéből vett klinikai izolátum (6VAD.) A spóravizsgálatokból levonható a következtetés, mely szerint a vizsgált klinikai izolátumok és kontroll törzs esetén a letapadási képesség nem mutat összefüggést a spórák letapadási hajlamának populáción belüli heterogenitásával

4.5.1.2 Hifázás elindulásának vizsgálata

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

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

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

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

4.5.1.3 Első elágazás megjelenésének vizsgálata

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

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

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

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

4.5.2 Egyéni spóravizsgálatok

Az egyéni spóravizsgálatokon végeztünk korrelációszámítást és szignifikancia analízist is, hogy lássuk, van-e a 3 vizsgált paraméter között valamilyen összefüggés.

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

Ugyanezzel a módszerrel elvégeztük a korrelációszámítást, az egyes izolátumok között is. Az eredményeket diagrammon ábrázoltuk. A 2 MUT izolátum a magas hifázási idő miatt szórt adatot mutatott, ezért. nem került bele a korrelációszámításba. A vizsgálatból kidreül, hogy mind a 3 vizsgált paraméter pozitív korrelációt mutat az izolátumok között.

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

letapadási faktor, letapadási dinamika, fertőzési faktor, fertőzési dinamika, hifaelágazási faktor, hifaelágazási dinamika

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

Az izolátumok csoportos korrelációanalízise kimutatta a pozitív korrelációt a vizsgált paraméterek között. Mivel az irodalom a hifázást, mint a patogenitás egyik alapvető faktorát írja le, vizsgálatunk bizonyíték arra, hogy a Brown mozgás megszünésének és a hifaelágazás kezdetének ideje is megfelelő dinamikus paraméter a patogenitás jellemzéséhez.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

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

Ebben a tanulmányban egy új rendszert mutattunk be a spóra és a hifa morfológiai, mennyiségi elemzésére. Az eljárás feleslegessé teszi, hogy viszonylag drága kereskedelmi képelemző szoftvereket kelljen megvásárolni, helyette a nyilvánosan elérhető ImageJ platform hasznosítását javasoljuk, amelynek használhatóságát bizonyítja az értekezés.

A létrehozott modell pontosítása, finomítása folyamatban van, de a bemutatott, eddig kapott vizsgálati adatok alapján a módszer használhatósága bizonyítást nyert.

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

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

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

6. KONKLÚZIÓ

Tekintettel arra, hogy az antibiotikum fejlesztésben és az ipari gomba fermentációs folyamatokban nagy jelentősége van a morfológia és a patogenitás/produktivitás között fellelhető kapcsolatnak, szükség van automata képanalítikus technikák kifejlesztésére, hogy pontos és gyors meghatározás legyen elérhető ezen alapvetően bioprocess jellegek mérésére. Bár az utóbbi években óriási előrelépés történt ezen a területen, a legtöbb technika specifikus az adott kultúrákra nézve. A szilárd fázisú kultúrák elemzésére kifejlesztett technikák általában a .gomba kolóniák makro-morfológiai formájára összpontosítottak, globális tulajdonságok számszerűsítésére/ meghatározására, mint a fraktál dimenzió és a terület lefedettsége.

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

1. INRODUCTION

In order to get a deeper understanding of the pathogenicity of filamentous fungi it is necessary to examine the mycelial morphological changes of invasive fungal species. It is, on the one hand, important from an industrial point of view, as certain types of mycelial processes may affect the productivity of industrial fermentation, while on the other hand it is also important from a medical point of view, because the number of patients with invasive fungal diseases is on the rise, and some fungi can even cause lethal infections in immunocompromised patients. However, the determination of qualitative and quantitative dynamic parameters of morphological changes still represents a major challenge due to the limitations of our tools. A deeper understanding of the dynamics of spore adherence may help us increase the productivity of fermentation systems and fight against invasive fungal diseases.

Static and dynamic image analysis techniques can also be used for studying fungal populations in which the significance of individual spores grows during the growth phase, and their adherence and/or germination dynamics can be observed.

With an appropriate temporal resolution, microbiological parameters defined with the help of long-term video microscopy can be studied real time and over a longer period. Such parameters include spore growth, adherence, division, appearance of biofilm, confluence, and motility. Optimally, these parameters can be monitored throughout the entire observation, which allows us to study their interrelations as well. The specially adapted dynamic image analysis of data collected through processing images captured by the video microscopy system may allow us to model a specific division or reproduction phase more accurately.

In the course of image analysis we can study individual processes based on qualitative and quantitative aspects as well. Video microscopy is a long-term (up to weeks) monitoring system that, when combined with carefully chosen digital image analysis and data processing, results in an experimental setup, the main advantage of which is that it allows us to study and model the dynamics of changes in time, providing us with a real or actual picture of temporal changes.

1. OBJECTIVES

By combining the image analysis techniques already in use and Time-Lapse Imaging System (TLS) we sought to design a methodology that would allow us to study microbiological samples based on temporal parameters. With the combined use of these systems we can observe the life processes of filamentous fungi in a non-invasive, simple, multifaceted, reproducible way, maintaining their temporal dynamics. Our model system is based the following microscopic examinations:

Static, snap-shot analyses:

Before the examination of dynamic morphology, first we determine the morphological parameters pertaining to pathogenicity and the analytical algorithms based on snap-shot data (it is more like a static image).

Scanning Electron Microscopy

We carry out the image analysis of static images taken by a scanning electron microscope of the genetically modified *Aspergillus nidulans* strains. Conidiospores offset at the end of haploid mycelium that results from the spores of *Ascomicota* help the vegetative reproduction of the species. Through the morphological examination of the spores we map the changes detected visually in the conidiophore, and look for relations between morphological changes and genetic modifications.

Optical Microscopy

The next step in static image analysis is the examination of histological sections taken with an optical microscope. The sections were taken from mice treated for *Aspergillus fumigatus*. We describe the hyphal morphologies pertaining to the spread dynamics of the species using a quantitative digital image analysis of hyphae sizes and temporary forms based on aspergilloma in the different organs.

Dynamic Image Analysis

Based on the static histological and morphological examinations dynamic image analysis protocols are developed for studying the early detection of *Mycoplasma* infection.

Development of Image Analysis Methods

1. For the development of image analysis protocols, we selected a file that had already been studied using a static image analysis method. In this phase we studied the adherence and change in growth pattern of a filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*, using a dynamic image analysis method. Our objective was to observe the effect of antifungal agents based on the adherence and growth dynamics of *Aspergillus fumigatus*.

2. In addition to filamentous fungi, we use yeast fungi as well for developing our image analysis methods. We have also changed from static spore examinations to dynamic examinations in the comparison of clinical *Candida albicans* isolates. In our examinations

we measure the time when the cessation of Brown's movement takes place as an indicator of adhesion to the surface, as well as the appearance of the first hypha and the beginning of the branching of the first hypha. The analyses also cover the comparison of parameters pertaining to the growth dynamics of spores of a filamentous fungus (*A. fumigatus*) and that of yeast (*C. albicans*) isolates. We presume that the spore adherence dynamics of *C. albcans* and *A. fumigatus* can both be studied using the dynamic adhesion examination method, which is based on the cessation of Brown' movement.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Development of a Static Image Analysis Method on Aspergillus nidulans

3.1.1 Preparation of a general sample of Aspergillus nidulans for SEM

- The samples were put into a glutaraldehyde solution of 4% concentration for a night in PBS
- Then they were transferred to a polylyzin cover glass
- Dehydrated in ethanol
- Finally, they were fixed with gold palladium for the examination

3.1.2 Brief description of the strains:

- Control tNJ 11: Control strain of TNJ 12 (delta-chiB)

- Control tNJ 36: A generally used control strain

- **Control tNJ12:** Deletion of cell wall degrading chitinase (chiB) that is induced by carbon starvation; the presence of protein allows the use of cell wall as nutrition

- tNJ 34.8: A mutant with damaged genes chiB and engA; Its genotype is similar to that of the previous ones

- tNJ 76.7: Deletion of the pepJ extracellular protease gene; During autolysis, its presence allows the utilisation of protein that got into the growth medium

- **tNJ 77.16:** Deletion of the prtA extracellular protease gene; During autolysis, its presence allows the utilisation of protein that got into the growth medium

- **tNJ 78.4:** Deletion of the prtA and pepJ extracellular protease genes; During autolysis, its presence allows the utilisation of protein that got into the growth medium

3.1.3 Static image analysis

Images captured using a Scanning Electron Microscope (SEM) provide information on fungal spores, including their visible morphological features, However, if we want quantitative data, we have to use computer software which allows us to carry out qualitative and quantitative measurements on the images. In the course of image analysis, the images taken by the SEM were analysed using the ImageJ computer software.

3.2 Fine tuning of the image analysis method using tissue sections from mice infected with *Aspergillus fumigatus*

3.2.1 Aspergillus fumigatus isolate

As *A. fumigatus* causes aspergyllosis mainly in the lungs, we chose the Af293-(FGSCA1100, IHEM18963) clinical isolate, which came from human lung tissue, and cultured it at 37°C in nitrate minimal medium (NMM).

3.2.2 Breeding conditions concerning animals used as subjects of experiments

All groups of mice (10) were put in PI plastic cages (425/135/120 mm), in line with Directive 2010/63/EU. The animals were fed with pelleted mouse food (Purina, LabDiet, St. Louis, MO, USA) and water, *ad libitum*. An automatic lighting system.(12 hours of dark followed by 12 hours of lights) and room temperature (22-25°C) were maintained.

3.2.3 Infection of the experimental animals

We studied the pathogenicity of the *A. fumigatus* strain in three separate experiments. We used 8-10 week-old female and male BALB/c mice for the experiments. The groups were given *i.p.* (intraperitoneal) injected cyclophosphamide (CP) (250mg/kg), which resulted in a low number of neutrophil cells (neutropenia), and brought about leukopenia by reducing the number of neutrophils and lymphocytes by giving them a specific hydrocortisone (HC) injected subcutaneously (SC). Mice narcotised with Nembutal (100mg/kg) received 3.5×10^6 pcs of conidium in 50 µl doses once upon the infection, intranasal. Under the above circumstances, the inoculum reached the lungs through normal breathing.

- We sorted the experimental animals into three subgroups:
- a) Not infected, received no immunosuppressant
- b) Received immunosuppressant, not infected
- c) Received no immunosuppressant, infected

The animals were killed by cervical dislocation 6, 12, 14, 24, 30, 48, 72 and 96 hours after infection. T Each subgroup included 10 mice. After infection the animals were checked twice a day, and the number of survivors was recorded. We removed the lungs, kidneys, liver and brain for histological examination.

3.2.4 Static Image Analysis

We used sized images $(10\mu m/div)$ and the ImageJ open source software of NIH for calibration. In order to avoid uneven illumination, we used Fast Fourier Transformation and band filtering. We used increased contrast.

Then we extended the selection to all pixels until the differences between pixel values were reachable. To this end, we clicked on a point in an image that had not reached the value limit based on the relative grey and saturated shades. We carried out particle analysis to count and measure forms on the binary image. Objects smaller than 2 μ m² were ignored. The pores observed on the objects were considered part of the objects, as they may have been the consequences of uneven dyeing. Standard difference for the calculation of the distribution of data was calculated from the mean value and the t test.

3.3 Dynamic image analysis of the Mycoplasma in vitro infection

In order to monitor the *Mycoplasma* infection, we infected three different cell cultures with a view to examining the dynamics of biofilm production of *Mycoplasma* in different media.

3.3.1 Cell cultures

HaCaT cells. Originate from human epithelial cells that spontaneously transformed *in vitro* during the long incubation.
OCM-1 cells. The malignant OCM-1 (human choroidea melanoma-1) cell line came from the department of ophthalmology of the local clinic (84). It originated from a sample obtained via biopsy from the OCM1 cell line choroid melanoma (85).

- Epithelioma (SCC) cells (86)

3.3.2 Cell growth

We induced contamination with calf serum in a concentration of 5% infected with mycoplasma. We obtained calf from the local butchery. We sterilised the calf serum by filtering. To remove mycoplasma we used a $0.1 \mu m$ filter suitable for sterilising. The $0.2 \mu m$ bacteria filters used in practice let mycoplasma with a diameter smaller than this through. The number of living host cells was determined using trypan blue dye in a Bürker chamber. Due to their small size, *Mycoplasma* cells remained invisible under the optical microscope.

3.3.3 Time-lapse scanning microscopy (TLS)

We carried out our investigation using a microscopy system designed by our working group as described above. The system allows real time examination of the effect of cytotoxic material at cellular level, throughout the whole cell cycle. Microscopic observation of the cultures kept in a standard growth environment may take place through an interval of up to 168 hours, with temporal resolution of 6 seconds. The sequence of images obtained can be turned into a video, suitable for the observation of cytotoxicity directly, at cellular and population level. The processing of images captured over the examination period using statistical image analysis methods provides data with high temporal resolution for the dynamic investigation of toxic processes. We studied the *Mycoplasma* infection based on three main parameters:

- Real-time appearance of mycoplasma
- Time length of infection
- Disintegration of the infected mammal cells

3.3.4 Dynamic analysis

For image analysis we used the Fiji image analysis software. In order to determine the size of cell lawn, we separated the monolayer from the background of the surfaces observed. Then we determined the segmented area, i.e. the adhesion to the growth surface, in percentage relative to the field of vision. We used a similar method for determining the area of the biofilm of *Mycoplasma* infection. Only the biofilm of the *Mycoplasma* infection was visible, individual *Mycoplasma* cells remained invisible in the time-lapse image analysis due to the physically limiting effect of the wave length used for illumination. In order to analyse the motility of mammal cells, first we removed the background from the images, so only the structures that we wanted to analyse remained. The difference between consecutive images provided information on cells on the move. We also used the motility values obtained this way for defining the time of division, i.e. when cells detached from the growth surface. This way we were able to determine the time when individual cells detached from the surface. We applied digital image analysis for 5 randomly chosen and representative regions in the cell cultures.

3.4 Development of a dynamic image analysis method for the investigation of the dynamics of the pathogenicity of Aspergillus fumigatus

We used the AF293 strain of *Aspergillus fumigatus*, which we grew as described above. We had already tested our high-resolution video microscopy technique combined with digital image analysis in previous experiments, where we affected germination, hyphae growth and adherence with antibiotics and genetic mutations. On an opportunistic pathogen, *A. fumigatus*, we studied the effect of systemic antifungal medicines on the speed of adherence of spores, the time of appearance of the first hypha, and the time of the first branching on a hypha. For the investigations we selected antifungal agents with known mechanism of action, like Amphotericin-B or vorikonazol.

3.4.1 Digital image processing

The LTS systems transfer the numbered image sequences to a barebone PC with Windows 7 operating system (Biological Image Processing Station, BIPS).

3.4.1.1 Image-enhancing sequences

After loading the images (Figure 1a), the analysis starts with filtering images (Figure 1b) in order to compensate for the disturbingly low frequency in the Fourier space, and uneven illumination that may lead to shadows and inconsistent background. This makes the

segmentation process mere complicated, for there may be grey levels on the image that occurs on the object and on the background as well. Consequently, it would be difficult to define a threshold (Figure 1c) that separates one from the other. The application of a threshold in a grey image like this results in many artefacts at the frequency studied.

We can compensate for changes in the level of grey in the background by considering the image as a 2D signal, and apply a high-pass filter / semipermeable filtering on it, which can be performed using the Bandpass Filter function of the ImageJ software. In this way we remove image noise with Gauss filtering in the Fourier Space. The radius of the filter is set at 40 μ m pixel equivalent (40 pixels for hyphae and 200 pixels for spores), which is a big relative parameter compared to the width of typical hyphae (cca. 2-4 μ m). Then we remove all high-frequency speckle noise by median filtering. We split the image to three 8-bit, greyscale images that represent the 3 primary colours (red, green and blue). The grey-level threshold that the ImageJ calculates using the isodata algorithm results in a binary image (Figure 1d.). The next phase of image analysis depends on whether spores or hyphae are the primary subjects of the investigation (Figure 1e). Viable spores and hyphae will appear rarely on the same image, because not hyphae analysis and removes them.



Figure1: The algorithm used to describe the morphology of fungi

3.4.1.2 Analysis of spores

In the case of spores (Figure 1f) we used the "Watershed" function for separating objects touching each other. First, the system performs Euclidean distance mapping (EDM) and identifies the ultimate erosion points (UEP). Then it elongates UEPs to the greatest possible extent (EDM peaks or local maximum points) – even to the edge of the particle, or to the region of another (growing) UEP. The procedure described is the most suitable for convex objects with smooth surfaces that only slightly overlap each other.

The ImageJ uses a "Particle Analyser" for quantitative image analysis (Figure 7. h). Analyse Particles can be used in 3 different ways: on images with threshold for detecting components, sorting by size and morphology, quantitative analysis of a segmented image. Based on data about area (A) and concentricity (B) the latter is defined as follows: $B = 4.\pi$.APP2 where Ap is the projected area of the object in question and P is the area measured.

In the case of a circle $Ap = \pi r^2$ and $P = 2\pi r$, so B = 1.

The larger P is compared to Ap, the less circular the object, which means that the value of B decreases. The spores of many fungi that are relevant from an industrial point of view, such as Aspergillus, have relatively spherical spores. Other shapes are called ellipsoid or geoid. Objects with projected areas larger than the set minimum value (Ap, min) and more circular than the threshold (Cs, min) can be considered spores; All other objects are artefacts and should be ignored in the analysis.

3.4.1.3 Analysis of hyphae

When hyphae are the subject of the investigation (Figure 1g), we perform a binary closing during the analysis in order to remove small deficiencies of the objects. Then the "Particle Analyser" selects the objects with projected areas larger than Ap, min and circularity smaller than a second threshold (Figure 1h). During the analysis the system ignores all objects that do not meet these criteria. Then we erode the binary images of hyphal elements to their base structure ("skeletonisation") (Figure 1j). This is a rapid parallel algorithm to make the digital sample thinner, in which a search function indicates the 256 possible 3×3 neighbouring combinations for all foreground pixels. The algorithm calculates the number of indexes for all objects, and based on the search table decides if the pixel can be ignored. In the course of image analysis skeletonisation may detect artefact points or branches from time to time. Artefact points (places where a pixel is bigger than the width of pixels) may lead to an incorrect classification of branch points, which in turn may result in the overestimation of the length of artefact branches and the number of hyphal apexes (Figure 1h). They can be removed by slitting (Figure 1i). This procedure also removes the remaining small deficiencies from the image.

3.4.1.4 Digital analysis

Cessation of Brown's movement, motility of spores not adhered, growth of hyphae

In order to assess the motility of spores we expressed the differences in pixels by deducting the areas of consecutive moving images. These numerical values provide information about the movements of spores as compared with their previous positions. We also used motility values to determine the time when spores adhered to the bottom of the growth vessel. This method allows us to determine the time of the cessation of Brown's movement. We applied digital image analysis on five, randomly chosen, representative regions for each spore in 3 separate experiments both in the control and in the treated cultures. We displayed the values in diagrams.

Analysis of changes in the region of the hyphae

We used a similar method for investigating hyphael growth. In the investigation of the region of a hypha the drastic growth of the area indicated the start of growth. In order to prevent hyphae running into one another, we used a user-controlled method to separate hyphae in time and space. We basically studied spores in a 10x10 pixel square, and determined the region of the hyphae in a uniform extension in time and space. This way we were able to detect hyphae that had not adhered properly to the surface, as well as floating particles and hyphal parts in the area studied, which could have biased the results. This method allowed us to study spores that were moving in the same focus plane.

3.5 Fine- tuning of a dynamic image analysis method on Candida albicans isolates

Using the systems and image analysis methods described above we investigated how the growth and adherence dynamics of *Candida albicans* clinical isolates can be detected. Again, we were focused on the 3 key aspects that growth and adherence dynamics was based on: the cessation of Brown's movement, the time when the first hypha started to grow, and the appearance of the first branching.

Clinical isolates used in the experiment and the associated codes:

1VAD - ATCC 14053 - control strain. Other strains were cultured from this strain (American Type Culture Collection)

1MUT - AF06 – has tBOOH features, mutant strain treated with 6mmol L^{-1} tBOOH

2VAD - 8387 - clinical isolate taken from the mouth of a 10-year-old girl

2MUT - 8387T - tBOOH-tolerant mutant created from a clinical isolate taken from the mouth of a 10-year-old girl

3VAD - 10934 - clinical isolate taken from the cannula of a 45-year-old female

3MUT - 10934T - tBOOH-tolerant mutant created from the clinical isolate taken from the cannula of a 45-year-old female

4VAD – 19890 - clinical isolate taken from the ichor of a 59-year-old female

4MUT - 19890T - tBOOH-tolerant mutant created from a clinical isolate taken from the ichor of a 59-year-old female

5VAD – 20072 - clinical isolate taken from the abdominal drain of a 34-year-old male **5MUT** - 20072T - tBOOH-tolerant mutant created from a clinical isolate taken from the abdominal drain of a 34-year-old male

6VAD – 4774 - clinical isolate taken from the urine of a 42-year-old female

6MUT - 4774T - tBOOH-tolerant mutant created from the clinical isolate taken from the urine of a 42-year-old female

For the investigation of the difference between the adherence and infection strategies of mutant and clinical strains we set our system in a CO_2 incubator under nearly physiological conditions as a base for comparison.

We investigated individual and community spores by strains. The above criteria provide the best base for detecting the adherence and hyphae dynamics of a spore or spore group, which may affect the virulence factor. Then we compared the values to find out how our results correlate with each other. This was necessary in order to determine interrelations among the factors investigated.

4. FINDINGS

4.1 Comparative investigation of the spore morphologies of genetically modified *Aspergillus nidulans* strains

4.1.2 Combined spore examination of strains

The presentation of the diameter data of the 7 strains in a single diagram reveals that the diameters of spores belonging to the individual strains form emerging straight lines. (Figure 2)



Figure 2: Combined diagram of diameters

4.1.3 Result of the examination of differences in size

Genetic modifications may affect certain phases of the shaping morphology of spore cells, and contribute to the appearance of individual features. The difference in size, i.e. the difference between the diameter of the largest and the smallest spores allows us to prove the above statement with numbers



Figure 9: The growth of the difference in size of spores in strains

We saw the largest increase in size with spores of the tNJ control strain (0.24 μ m), but spore size changes occurred in other strains as well. However, in the tNJ 76.7 pep J strain the difference in diameters was 0.00 μ m, meaning that the deletion of the pep J gene causes no change in terms of spore morphology.

On the images taken with a scanning electron microscope of the genetically modified *Aspergillus nidulans* fungal strains we measured only the diameter and thickness of spores

located in the focal area of the microscope using the ImageJ software, so we only obtained accurate data on spores in the same focal plane. The tables and line diagrams that summed up the results clearly show that the diameter of spores grows linearly. The difference between the diameter of the largest and the smallest spores can be as much as $0.24\mu m$.

We can draw the conclusion that genetic changes may trigger processes in the lives of strains that can significantly influence morphologic heterogeneity, including the size of spores.

4.2 Investigation of the dynamics of pathogenicity of Aspergillus fumigatus in a mice model

In order to determine the dynamics of pathogenicity through animal experiments first we studied the effect of two immunosuppressive treatments with different entry points on the dynamics of infection, using mice. Compared to the control group, 40% of the mice treated with hydrocortisone (HC) died 3 days after getting infected, while 70% 6 days after getting infected. The mortality rate was higher among mice treated with cyclophosphamide (CP): 50% of the group died 3 days, while 80% of them died 6 days after getting infected. Further, the mice treated with immunosuppressant CP lost 20-25% of their weight within 3-4 days after getting infected. The infection itself, i.e. without CP treatment, did not cause weight loss.

4.2.1 Histological investigation and damage to the lungs

We also used Gömöri-Grocott silver impregnation (GMS) to display the development of hyphae in the lungs. No conidium or hypha could be seen in the lung tissue sections obtained from immunocompetent mice (Figure 4a). The tissue sections of CP immunosuppressed mice showed GMS conjugate as early as 6 hours after getting infected (Figure 4 b), and hyphae appeared after 14 hours (Figure 4 c). Hyphae continuously grew 30 hours (Figure 4 d), 48 hours (Figure 4 e) and 96 hours after the start of the infection (Figure 4 f).



Figure 4: Sections of lung tissue with Gömöri-Grocott silver impregnation (GMS). a; control lung tissue section; b: infected lung tissue section 6 h; c: 14 h; d: 30 h; e: 48 h; f: 96 h; after start of the infection.

96 hours after HC (Figure 5 a) and CP (5 b) immunosuppression the comparison of growth of hyphae induced by the immunosuppressant clearly showed that the immunosuppressive effect of CP in the lungs were significantly stronger than that of HC.



Figure 5: Comparison of the immunosuppressive effect of HC (a) and CP (b) with the hyphal extension in the lung tissue.

4.2.2 Investigation of hyphal growth in the brain

The brains of a few mice showed hyphal growth after GMS. In the immunocompetent, infected mice neither conidium nor hyphae could be observed (Figure 6 a). In the samples of mice treated with CP conidia and long hyphae could be observed 96 hours after the start of the infection, but 50% of conidia showed no hyphal growth (Figure 6 b)



Figure 6: Dyeing brain tissues with GMS

a: Control brain tissue

b: Dyeing of the brain-stem 96 hours after start of the infection

The white arrows show that conidia do not indicate hyphal growth. The black arrows show hyphal growth.

4.2.3 Length of Pulmonal hyphae

We did not examine either hyphal growth or plaque formation in infected, immunocompetent mice, because there was no plaque formation. The comparison of hyphal growth in the presence of immunosuppressants revealed that 4 days after HC treatment about 40% of the hyphae were shorter than 5 μ m. Hyphae were longer in mice treated with CP, compared to those treated with HC. For this reason, we used CP in further experiments, instead of HC. The maximum length of hyphae was more than 40 μ m in mice treated with CP, while it was only 26 μ m in those treated with HC. The distribution of length showed gradual increase after CP treatment.

12 hours after getting infected resting conidia started to germinate, but 40% of the hyphae were shorter than 5μ m (7μ m in average, max. 15μ m). We observed modest growth 24 hours after the start of the infection, with an average hyphal length of 9,6 μ m. Distribution shifted to the right, and most conidia germinated. After 30 hours the average length was 10.8μ m, with an even distribution shifted to the right. 48 hours later the average length was 11.2μ m, and we also observed morphological differences. 72 hours after the start of the infection 10% of the hyphae reached the average length of 15-30 μ m, less than 2% even grew to 145 μ m. After 96 hours the maximum length was 165 μ m.

4.2.4 Pulmonary aspergillosis

Besides the length of hyphae, we also compared the diameter of plaques and the density of hyphae in immunosuppressed animals. The average pulmonary plaque diameters were significantly smaller in mice treated with HC than in those treated with CP. Hyphal density in the lungs was typically higher than in mice treated with CP. Hyphal density in the lungs was close to three times higher after CP treatment than after HC treatment.

We found that in the presence of HC hyphae were shorter and hyphal density was lower than in the presence of CP. The diameter of infected plaques and average pulmonary plaques in the lungs of animals treated with CP was greater than after HC treatment. In mice treated with HC neutrophils limited fungal growth in the parenchyma of the lungs. As a result, the germination of conidia and the growth of hyphae decreased. The number of circulating neutrophils grew in parallel with the cortisol level of the plasma.

In the histological sections of the lungs we observed hyphal invasion in the parenchyma of the lungs and the bursting of hyphae in the blood vessel. The first hyphae appeared in the lungs 12 hours after the start of the infection. Hyphae grew in parallel with the wall of the endothelium. After 96 hours aspergilloma appeared in the parenchima of the lungs, which squeezed the alveoli and filled them up with fluid. During aspergillosis the lungs proved to be the most susceptible to A. fumigatus. However, sometimes we could observe cerebral aspergillosis, too.

4.3 Early detection of mycoplasma infection with the dynamic image analysis method

4.3.1 Morphology and dynamics of cell cultures infected with Mycoplasma

In the first 15-20 hours after the start of the infection the presence of the bacteria in the culture is indicated by a modification of cell morphology, as well as decreased motility and cell division. Unlike in the control culture, infected cells do not adhere to one another, do not form colonies, and are unable to take their typical plain and elongated morphology. We observed cell nuclei protruding from cytoplasm at multiple locations in the infected culture. In the confluence of control cultures we observed gradual growth, while in the case of infected cells we saw a slow decrease, which was due to the diminished or non-existing ability of cells to divide.

Movements in the infected cell culture typically differ from those of the control culture. Owing to a decreased ability of the cells for adhesion, after starting the culture, for 1 or 2 hours cells are unable to adhere to the surface of the growth vessel. During this time a high level of motility can be observed compared to the control culture, due to the high number of floating cells. After adherence, the migration of infected cells significantly lags behind the control culture. The growth in the 17-18th hour in the diagram indicates loss of adhesion, i.e. infected cells leave the growth surface.

4.3.2 Termination of adherence, appearance of aggregates, biofilm formation

Further signs of the infection, accompanied by death of the cells, appeared 15-25 hours after the start of the infection, depending on the type of the cell. The first step in this process was that the cells stopped to adhere to the bottom of the growth vessel, at the same time biofilm formation started, which is typical of *Mycoplasma* infection. About 10 hours after the cells stopped adhering to the surface, large amounts of *Mycoplasma* cell aggregates appeared in the vessel. The cells leaving the surface and the appearance of aggregates occurred at about the same time in the whole field of vision. The different parts of the culture were in synchrony with each other in terms of phases of infection.

In the course of examining the different cell types we observed that the appearance of the phases of *Mycoplasma* infection was different by cell lines. In the case of the Human Limbus cell line the adherence to the growth surface did not cease, which is likely a result of the strong adherence characteristics of the limbus cells.

Data showed that the time between the termination of adherence and the appearance of aggregates was about the same with every cell type, 20-23 hours.

After the appearance of aggregates (i.e. 35-40 hours after the start of the infection) the biofilm gradually breaks up, and forms a network-like structure. This is also reflected in the shrinking area of the homogenous biofilm layer in the field of vision,. The resulting morphology may be a unique, distinctive feature of the *Mycoplasma* infection, which distinguishes it from other infections.

4.4 Investigation of the dynamics of pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* using a long-term video microscopy system

After we treated the *Aspergillus fumigatus* spores with Amphotericin-B (AMB) and vorikonazole (VRC), we observed the movements of spores with a time-lapse microscope. The first factor studied was the cessation of Brown's movement, which indicated the beginning of adherence. It was followed by the appearance of hyphae and the time of the first branching. These parameters showed the changes in the fungal virulence factor in the presence of inhibitors.

4.4.1 The cessation of Brown's movement

The cessation of Brown's movement indicates the beginning of adherence. The average time cessation of Brown's movement took was less in the case of spores treated with AMB (12 min) or VRC (11 min) than in the control culture (28 min). However, the maximum value of

difference was similar in the infected and control cultures. Due to the AMB and VRC treatments the cessation of Brown's movement went down faster, and the adherence of spores to the surface began sooner.

Adherence in the case of control spores took about 27 minutes, while the same data for spores treated with AMB was cca. 12 minutes, and the average time for conidia treated with VRC was about 11 minutes. The results indicate that the studied antimycotica stimulate the process of adherence. The difference in deviation was negligible in the material studied.

Following treatments we studied the time of adherence as a percentage of the value observed in the control culture. We found that the values measured after the AMB and the VRC treatment were similar.

4.4.2 Investigation of the appearance of hyphae

Following the investigation of the cessation of Brown's movement, we observed the beginning of germination. As AMB inhibited the germination of conidia, we studied the growth of hyphae in the control culture and the one with spores treated with VRC. The average time of the appearance of hyphae was 181 and 374 minutes in the control group and the one with VRC treatment, respectively. This indicates that VRC delays germination, but the fungus is able to form its first hypha. The appearance of the first hyphae is an important virulence factor in pathogenic fungi. These experiments indicate that the antifungal agents studied (AMB, VRC) stimulate the adherence of conidia, delay the appearance of hyphae, and block the growth of hyphae.

When we treated conidia with AMB in a concentration of $0.25\mu g/ml$ concentration, conidia did not germinate. When we treated conidia with VCR, the concentration of $0.25\mu g/ml$ only delayed, but did not inhibit germination.

4.5 Comparison of the dynamics of adherence and infection of *Candida albicans* isolates using dynamic image analysis techniques

4.5.1 Investigation of groups of spores

We extended the investigation of the adherence, outgrowth, and hyphal attributes of spores of the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* to the clinical isolates of the yeast fungus *C. albicans.*

5.5.1.1 Observation of the cessation of Brown's movement

Based on the average time until the cessation of Brown's movement we can determine the adherence factor in the strains studied.

The average time until the cessation of Brown's movement shows how fast adherence of the spores from individual isolates takes place. We found that there was an inverse relationship between the time of the cessation of Brown's movement and the adherence factor. The

shorter the average time of the cessation of Brown's movement, the greater the adherence factor. In the course of the investigation strain 6MUT did not produce a consistent result – spores did not adhere to the surface at all. After studying the dynamics of the adherence factor we can conclude that isolates with the best adherence characteristics were the isolate (4VAD) taken from the ichor of the 59 year-old female and the tBOOH-tolerant mutant (3MUT) produced from the clinical isolate taken from the cannula of the 45-year-old female. The less virulent isolates were the tBOOH-tolerant mutant produced from the clinical isolate taken from the clinical isolate taken from the form the clinical isolate taken from the clinical isolate taken from the urine of the 42-year-old female (6VAD).

Based on the results of the analysis we can conclude that the less isolates deviate from the average, the more uniform their adherence. The most uniform isolates in terms of the heterogeneity of adherence are the control strain (1VAD), the mutant strain (1MUT) with tBOOH characteristics, and the clinical isolate taken from the cannula of the 45-year-old female (3VAD). In contrast, the isolates that adhered to the surface in the broadest interval were the tBOOH-tolerant mutant (2MUT) produced from the clinical isolate taken from the mouth of the 10-year-old girl and the clinical isolate taken from the urine of the 42-year-old female (6VAD.) Based on the investigation of spores we can conclude that in the case of the clinical isolates studied and the control strain there is no connection between the ability of the spores to adhere and the heterogeneity of the tendency within the population to adhere to the surface.

4.5.1.2 Investigation of the appearance of hyphae

The time when hyphae first appear is one of the basic factors of virulence (88). Mutant 6MUT could not be studied, because not only did adherence not start, but hyphae did not appear in this strain either. Again, this investigation revealed an inverse relationship, meaning that the sooner hyphae appeared in a strain on average, the greater its virulence factor was.

Description of the virulence factor in decreasing order based on the appearance of the first hypha:

Out of the isolates studied, based on how soon the first hypha appeared the most virulent strains were the mutant strain with tBOOH-characteristics (1MUT) and the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old male (5VAD). In contrast, the most infectious isolates were the tBOOH-tolerant mutant (2MUT) produced from the clinical isolate taken from the mouth of the 10-year-old girl and the clinical isolate taken from the urine of the 42-year-old female (6VAD).

The dispersion of the time until the appearance of the first hypha can be determined on the basis of the heterogeneity investigation of the strains studied. The smaller the dispersion value of the given isolate, the higher its heterogeneity was in terms of the appearance of the first hypha.

Based on the above results we can conclude that the appearance of the first hypha was the most heterogeneous in the following isolates: the mutant strain with tBOOH-characteristics (1MUT), and the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old male (5VAD). In contrast, the appearance of the first hypha occurred in the broadest interval in the following isolates: the tBOOH-tolerant mutant (2MUT) produced from the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old mutant (5MUT) produced from the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old mutant (5MUT) produced from the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old mutant (5MUT) produced from the clinical isolate taken from the abdominal drain of the 34-year-old male.

4.5.1.3 Investigation of the first branching

The average time until the first branching appears is another important factor of virulence. Mutant 6MUT could not be examined. Again, in this investigation we found an inverse relationship, meaning that the earlier the first branching appeared, the higher its potential was to infect.

The investigation revealed that, based on the time until the appearance of the first branching, the most virulent isolates were as follows: the tBOOH-tolerant mutant (4MUT) produced from the clinical isolate taken from the ichor of the 59-year-old female and the clinical isolate taken from the cannula of the 45-year-old female (3VAD). In contrast, the least virulent isolates were the tBOOH-tolerant mutant (2MUT) produced from the clinical isolate taken from the nouth of the 10-year-old girl and the tBOOH-tolerant mutant (5MUT) produced from the clinical isolate taken from the clinical isolate taken from the solution of the 34-year-old male.

The average dispersion of time until the appearance of the first branching reveals how hyphae in the clinical isolates studied are able to maintain their ability to grow. The shorter the dispersion of time is in the isolate studied, the more heterogeneous it is, which means the dynamics of growing hyphae is more effective.

Based on the average dispersion in the appearance of the first branching the following list can be compiled in terms of the dynamics of the growth of hyphae in decreasing order:

The investigation revealed that, based on the dispersion in the appearance of the first branching, the isolates with the most heterogeneous dynamics in terms of hyphae growth were as follows: the tBOO-tolerant mutant (3MUT) produced from the clinical isolate taken from the cannula of the 45-year-old female and the clinical isolate taken from the cannula of the 45-year-old female (3VAD). In contrast, the isolates with the most heterogeneous ability to grow hyphae were as follows: the clinical isolate taken from the ichor of the 59-year-old female (4VAD) and the clinical isolate taken from the mouth of the 10-year-old girl (2VAD).

4.5.2 Investigation of individual spores

In the framework of the investigation of individual spores we also performed correlation calculation and significance analysis in order to see if there was any relationship among the parameters.

According to the results, with most isolates the time of cessation of Brown's movement and the beginning of hyphal growth show a positive correlation. It means that we can rule out artefacts from the early phases of the investigation and the differences in sample processes if we take the time of the cessation of Brown's movement, i.e. the start of adherence as T0. This method can also be used for spotting potential modifications that may affect adherence and the synchronicity of the appearance of hyphae. In such cases there is no correlation between the two above-mentioned parameters. (4MUT)

Using the method we performed correlation calculation, even between the individual isolates. The results were presented in a diagram. Due to the long time until the appearance of hyphae, Isolate 2 MUT showed dispersed data, therefore it was not included in the correlation calculation. The investigation revealed that all the 3 parameters studied showed a positive correlation between the isolates.

As for the combined investigation of spores we can say that the method applied allows us to describe and compare the following parameters of the isolates studied:

Adherence factor, dynamics of adherence, infection factor, dynamics of infection, branching factor, dynamics of branching.

As for the investigation of individual spores we can say that the method applied allows us to describe and compare the correlation and significance of the dynamic parameters of the isolates studied. We also worked out a methodical analysis that, in addition to the investigation of differences between isolates, is also suitable for the examination of population-level changes in the isolates.

The group-level correlation analysis revealed a positive correlation between the parameters studied. Since the literature identifies the time until the appearance of the first hypha as one of the basic factors of pathogenicity, our investigation proves that the cessation of Brown's movement and the time until the first branching are also useful parameters for describing pathogenicity.

5. SUMMARY

Routine detection strategies relying on morphological data are still needed in microbiological investigations both in basic and applied research. Computer-aided image analysis is a potent tool in this regard. Detailed analysis of a small number of hyphal elements may contribute to the understanding of the apical processes both in submerged and solid phase culture systems.

In this publication we presented a new system for the analysis of the morphological and quantitative analysis of spores and hyphae. The method makes it unnecessary to purchase relatively expensive image analysis software – we recommend the use of the publicly available ImageJ platform, the usability of which is proved by this publication.

The fine tuning of our model is in progress. However, according to the examination data collected so far, its usability is proven.

The use of experimental species with different characteristics proves that this image analysis method is suitable for all kinds of static and dynamic microscopic investigations in studies willing to learn about the early-stage development of fungi. Similarly to all image analysis systems, the results of the analytical algorithms described here depend on the quality of the images, and do not like higher-level artefacts, which may occur when there is a huge amount of sediment in the solutions used in growth vessels. For the image analysis system differentiating between "young" hyphae (recently germinated spores) and bundles of spores is a problem due to their morphological similarities, in terms of the projected area and circularity (cca.in the 0.4-0.8 circularity range). For this reason, young hyphae and bundles of spores are usually separated in the analysis.

In order to ensure that the transition from spores to hyphae can be fully described we further developed our system. As a result, now we can differentiate between these objects.

The processing time of our image analysis system is cca. 1s per image (1640×1480 pixel), which allows the rapid quantification of the morphology of fungi. The analysis of a large number of images and later its quantification. e.g. speed of spore swelling, hyphal growth speed and branching rate, can be performed within a few minutes.

6. CONCLUSION

Considering that the relationship between morphology and pathogenicity/productivity is highly important for the development of antibiotics and industrial fungal fermentation processes, there is a need for automatic image analysis techniques so that we have a rapid and accurate way to measure these basically bioprocess features. Even though in recent years great steps have been made in the field, most of the techniques have been developed for specific cultures. Techniques developed for the analysis of solid-state cultures usually focus on the macro-morphological forms of fungal colonies, as well as on the quantification of global characteristics like fractal dimension and the coverage of areas.

The method presented here allows high-resolution analysis of the early-stage growth of fungi from the time of reproduction. We hope that the use of this technique will lead to a better understanding of the kinetics of fungal growth and its relationship to macro-morphological forms, as well as its productivity in industrial fermentation.



Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK//2019.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tálas László Neptun kód: VH8756 Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola MTMT azonosító: 10062252

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

- Máthéné Szigeti, Z., Tálas, L., Palicz, Z., Szentesi, P., Hargitai, Z., Csernoch, L., Balla, J., Pócsi, I., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: Murine model to follow hyphal development in invasive pulmonary aspergillosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 102* (6), 2817-2825, 2018. ISSN: 0175-7598. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-8800-4 IF: 3.34 (2017)
- Tálas, L., Bánfalvi, G., Fidrus, E., Máthéné Szigeti, Z., Szemán-Nagy, G.: Mycoplasma infection followed by time-lapse microscopy. *Med. Hypotheses. 108*, 154-158, 2017. ISSN: 0306-9877. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2017.09.004 IF: 1.12



További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

- Pfliegler, V. P., Tálas, L., Báthori, F., Tartally, A., Pócsi, I., Szemán-Nagy, G.: Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Rickia wasmannii Cavara (Ascomycota: Laboulbeniales) Infecting Myrmica scabrinodis Nylander (Formicidae) Ants. *Sociobiology.* 63 (2), 851-854, 2016. ISSN: 0361-6525. DOI: http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v63i2.1049 IF: 0.699
- Turáni, M., Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., Király, G., Tálas, L., Tánczos, B., Dezső, B., Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth. *Toxicol. Vitro. 29* (2), 370-379, 2015. ISSN: 0887-2333. IF: 3.338

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,497

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

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

Debrecen, 2019.02.14.