

**A *CANDIDA* GOMBÁK SZÁJÜREGI LAPHÁMSEJTES KARCINÓMA  
PROGRESSZIÓJÁRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS  
VADOVICS MÁTÉ**

**TÉMAVEZETŐ:  
PROF. DR. GÁCSER ATTILA  
EGYETEMI TANÁR**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2022**

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>8</b>
3.1	<i>Szájüregi laphámsejtes karcinóma (OSCC).....</i>	<i>8</i>
3.1.1	Az OSCC előfordulása, klinikai megjelenése .....	8
3.1.2	Az OSCC rizikófaktorai .....	10
3.1.3	Az OSCC kialakulásának molekuláris háttere .....	11
3.1.4	OSCC metabolizmusa.....	13
3.1.5	Az OSCC terápiája és prognózisa .....	16
3.1.6	OSCC egérmodellek .....	17
3.2	<i>Orális mikrobióta.....</i>	<i>18</i>
3.2.1	Az orális mikrobióta kialakulása .....	19
3.2.2	Az orális mikrobióta alkotói .....	19
3.3	<i>Orális candidiasis.....</i>	<i>23</i>
3.3.1	Az orális candidiasis klinikai megjelenése.....	23
3.3.2	Az orális candidiasis diagnózisa .....	26
3.3.3	Az orális candidiasis kezelése .....	26
3.3.4	Az orális candidiasis egérmodellje .....	27
3.4	<i>A mikrobióta és a tumoros megbetegedések kapcsolata.....</i>	<i>29</i>
3.4.1	OSCC és az orális candidiasis kapcsolata .....	30
<b>4</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>33</b>
5.1	<i>Sejtvonalak és fenntartási körülményeik .....</i>	<i>33</i>
5.2	<i>Candida gombák tenyésztése és előkészítése a kísérletekhez.....</i>	<i>33</i>
5.3	<i>Sebzési (wound healing) esszé .....</i>	<i>33</i>
5.4	<i>BrdU ELISA (enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat).....</i>	<i>34</i>
5.5	<i>OSCC sejtek kezelése és feltárása metabolomikai vizsgálatokhoz .....</i>	<i>35</i>
5.6	<i>Metabolitok nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometriás (HPLC-HRMS) analízise .....</i>	<i>36</i>
5.7	<i>Mátrix metalloproteináz esszé .....</i>	<i>37</i>



5.8	<i>Totál RNS izolálás az OSCC sejtek in vitro mintáiból</i>	37
5.9	<i>RNS szekvenálás</i>	37
5.10	<i>Transzkriptóm analízis</i>	38
5.11	<i>Génkapcsolatok vizsgálata az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftver segítségével</i>	38
5.12	<i>cDNS szintézis és qPCR a szekvenálási adatok validálásához</i>	39
5.13	<i>MMP10 és MMP1 fehérjék Western blot analízise</i>	40
5.14	<i>Egér xenograft modell kidolgozása az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához</i>	41
5.14.1	<i>Egerek elhelyezésének, tartásának körülményei</i>	41
5.14.2	<i>Vad típusú egerek immunszuppresszációja</i>	41
5.14.3	<i>Egereken elvégzett beavatkozások</i>	42
5.14.4	<i>Egerek érzéstelenítése</i>	42
5.14.5	<i>HSC-2 szájüregi laphámsejtes karcinóma sejtek egér nyelvbe történő injektálása</i>	43
5.14.6	<i>Orális candidiasis előidézése</i>	43
5.14.7	<i>Orális candidiasis előidőzés sikerességének ellenőrzése</i>	44
5.14.8	<i>Egerek monitorozása és a kíméletes végpont</i>	44
5.14.9	<i>RNS kivonása a xenograft tumor mintákból</i>	44
5.14.10	<i>Hisztopatológiai festés</i>	44
5.15	<i>Statistikai analízis</i>	45
<b>6</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>46</b>
6.1	<i>Hőinaktivált gombák és zimozán OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata</i>	46
6.1.1	<i>A hőinaktivált gombák, valamint a zimozán hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira</i>	46
6.2	<i>Élő gombák OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata</i>	52
6.2.1	<i>Az élő Candida gombák hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira</i>	52
6.2.2	<i>A hőinaktivált és élő Candida gombák OSCC sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata in vitro – értékelés</i>	56
6.2.3	<i>Az élő C. albicans stimulus aktiválja az OSCC invazív folyamataiban szerepet játszó géneket és jelátviteli utakat</i>	58
6.2.4	<i>In vitro transzkriptomikai analízis – értékelés</i>	67

6.3	<i>Az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata in vivo</i>	69
6.3.1	Egy új xenograft egérmodell kidolgozása a <i>C. albicans</i> OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához.....	69
6.3.2	Az orális candidiasis elősegíti az OSCC progresszióját in vivo.....	71
6.3.3	Az orális candidiasis növeli az OSCC progresszióját különböző gének expressziójának befolyásolásával in vivo .....	77
6.3.4	Az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata in vivo	
– értékelés	81	
<b>7</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA .....</b>	<b>108</b>
<b>11</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>109</b>
<b>12</b>	<b>MELLÉKLETEK .....</b>	<b>111</b>

# 1 TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A szájüregi laphámsejtes karcinóma (OSCC) komoly egészségügyi kihívásokat jelent világszerte, amely az összes tumoros megbetegedés 2-4%-át teszi ki. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy OSCC esetén több és többféle élesztőgomba található a betegek szájüregében, mint az egészséges szájban, valamint a tumor felszínén is több gomba él, mint az egészséges felszínen. Legnagyobb mértékben a tumorterápia, valamint a megváltozott tumor-immun mikrokörnyezet megváltozása az oka a gombák túlzott elszaporodásának. Emellett tanulmányok azt is bizonyították, hogy a *Candida* gombák hozzájárulnak a szájüregi tumorok kialakulásához különböző karcinogének termelése által. Ezek alapján elmondható, hogy pozitív korreláció van a *Candida* gombák és az OSCC kialakulása között, azonban a kölcsönhatás pontos mechanizmusa még nem ismert.

Munkánk során ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatását. *In vitro* eredményeink alapján elmondható, hogy hőinaktivált *Candidák*, zimozán és élő *Candida parapsilosis* jelenlétében nem, vagy enyhe változás történik, azonban élő *Candida albicans* hatására jelentősen megnő az OSCC sejtek szekretált mátrix metalloproteináz aktivitása, onkometabolit termelése, valamint az OSCC progressziójában szerepet játszó szignalizációs utak aktiválódnak, és megnövekszik számos ebben a folyamatban érintett gén expressziója is.

Munkánk során sikeresen létrehoztunk egy új *in vivo* xenograft egérmodellt, amely alkalmas az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára. *In vivo* eredményeink alapján elmondható, hogy az orális candidiasis növeli az OSCC progressziót a *C. albicans* indukálta gyulladás (infiltráló immunsejtek) révén. Továbbá azonosítottunk orális candidiasis hatására aktiválódó metasztázisban szerepet játszó géneket, valamint olyan markerek (E-cadherin, vimentin, p63) expressziójának növekedését vagy csökkenését figyeltük meg, amelyeknek szerepe van az epiteliális-mezenchimális tranzícióban (EMT), ezáltal a tumorprogresszióban.

Mindent összegezve elmondható, hogy az opportunista humánpatogén *C. albicans* részt vesz az OSCC progresszió komplex folyamatában, emiatt szükséges tovább tanulmányozni ezt a jelenséget, és új terápiás célpontokat keresni.

## 2 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACO	Akonitát
ASNSD1	Aszparagin-szintetázt tartalmazó domén 1
ASP	Aszpartát
ATP	Adenozin-trifoszfát
BrdU	5-bróm-2-dezoxiuridin
CD4+	Helper T-sejt
CFU	Kolónia formáló egység
CIT	Citrát
DEG	Differenciálisan expresszált gén
DLST	Dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz
ELISA	Enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EMT	Epiteliális-mezenchimális tranzíció
ERY	Eritróz-4-foszfát
FBS	Fetális borjú szérum
FUM	Fumarát
GA-3P	Glicerinaldehid-3-foszfát
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
G/F-6P	Glükóz/fruktóz-6-foszfát
GLUT	Glutamát
GLY	Glicin
GOT1	Glutamát-oxálacetát-transzamináz 1
HBSS	Hanks kiegyensúlyozott sóoldat (Hank's Balanced Salt Solution)
H&E	Hematoxin-eozin
HI	Hőinaktivált
HIF1 $\alpha$	Hipoxia indukálta faktor 1 $\alpha$
HIV	Humán immundeficiencia vírus
HPLC-HRMS	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometria
HPV	Humán papilloma vírus
IPA	Génkapcsolatok vizsgálata (Ingenuity Pathway Analysis)
ISOC	Izocitrát

KEGG	Kiotói gének és genomok enciklopédiája
KET	$\alpha$ -ketoglutarát
MAL	Malát
MET	Metionin
MMP	Mátrix metalloproteináz
MOI	Fertőzendő sejtek és a fertőző ágens aránya (OSCC sejt:gomba sejt, Multiplicity of Infection)
NUDE	Timozin hiányos egér (T-sejt hiányos)
OPC	Száj-garatüregi candidiasis
OSCC	Szájüregi laphámsejtes karcinóma
OXA	Oxálacetát
PAS	Perjódsav-Schiff-reakció
PAMP	Patogén-asszociált molekuláris mintázat
PRR	Mintázatfelismerő receptor
PBS	Foszfát-pufferelt sóoldat
PhOS	Foszfoenolpiruvát
PRO	Prolin
PYR	Piruvát
ROS	Reaktív oxigén származékok
RPKM	Lefedettségi érték
scSEQ	Egy-sejt szekvenálás
SEM	Pásztázó elektronmikroszkóp
SNAIL	SNAIL család transzkripció represszor 1
SUC	Szukcinát
SCID	Súlyos kombinált immunhiány
SUCLA2	Szukcinil-KoA ligáz, $\beta$ -alegység
TCA	Trikarbonsav
Th17	T helper 17 sejt
URA	Upstream szabályozó analízis
YPD	Élesztő-pepton-dextróz tápoldat
3PG	3-foszfoglicerát

### 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 Szájüregi laphámsejtes karcinóma (OSCC)

##### 3.1.1 Az OSCC előfordulása, klinikai megjelenése

A fej-nyaki daganatok komoly egészségügyi problémát jelentenek világszerte, 2018-ban a nyolcadik helyen álltak a leggyakrabban előforduló tumorok listáján<sup>1</sup>. Az összes tumoros megbetegedés 2-4%-a érinti a szájüregtet, ezek több mint 90%-a szájüregi laphámsejtes karcinóma<sup>2</sup>. 2004 és 2009 között több mint 300.000 szájüregtet, illetve szájgaratot érintő tumort regisztráltak világszerte. Ugyanebben az időszakban több mint 7.000 ember halt meg ennek a tumor típusnak a következtében<sup>3</sup>. Szájüregi tumoros megbetegedések közé nemcsak a szájüregtet érintő neoplasztikus elváltozásokat soroljuk, hanem ide tartoznak a garat és a nyálmirigyek régiójában megjelenő neoplasztikus elváltozások is<sup>4</sup>. Az elmúlt évtizedekben, a jelentős terápiás fejlesztések ellenére, az OSCC morbiditási és mortalitási aránya nem változott szignifikánsan. A morbiditási és mortalitási adatok férfiaknál 6,6/100.000 és 3,1/100.000, míg a nőknél 2,9/100.000 és 1,4/100.000<sup>5</sup>. A betegek esetében az ötéves túlélési arány 40 és 50% között mozog. Az OSCC diagnózisát általában már csak előrehaladott állapotban állítják fel annak ellenére, hogy könnyű a szájüreghez hozzáférni és vizsgálni azt. Egy kutatás szerint a kialakult szájüregi elváltozásokat a betegek gyakran kisebb, veszélytelen elváltozásoknak vélik, nem tulajdonítanak neki megfelelő figyelmet. Emiatt a betegek sokszor nem törődnek a tünetekkel, nem fordulnak időben megfelelő szakemberhez. Van, hogy saját maguk próbálják kezelni a problémát, például megváltoztatják étkezési szokásaikat, valamint először barátaiknak, családtagjaiknak említik a tünetek észlelését, ezzel késleltetve a korai diagnózis lehetőségét<sup>6</sup>.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2008-as ülésén megszüntették a „potenciálisan rosszindulatú elváltozások” és a „potenciálisan rosszindulatú állapot” kifejezéseket, helyette a „potenciálisan rosszindulatú rendellenességek” kifejezést használják, másnéven praecancerosus állapot vagy praecancerosus lézió. Ezek olyan megváltozott szövetterületek, amelyben a karcinóma gyakrabban alakul ki, mint az ugyanazon lokalizációjú nyálkahártyán. Ezek közé tartozik a leukoplakia (szájüreg nyálkahártyáján megjelenő fehér folt), erythroplakia (szájüreg nyálkahártyáján megjelenő vörös folt), cheilitis chronica actinica (napsugárzás okozta idült ajaknyálkahártya-gyulladás), cheilitis abrasiva praecancerosa (cheilitis chronica actinica

esetén jelentősen erodált területek), keratoacanthoma (napfénynek kitett felületen kialakuló bőrdaganat). A praemalignus elváltozásokból kezelés nélkül nagy valószínűséggel malignus daganat alakul ki<sup>7</sup>.

A szájüregi laphámsejtes karcinóma leggyakoribb tünete a fájdalom, azonban csak akkor jelentkezik, ha a lézió elér egy adott méretet. Ebben az esetben a betegek csak a fájdalom kialakulásakor fordulnak orvoshoz, ezért gyakran a karcinóma korai állapotában észrevétlen marad<sup>8</sup>. Az OSCC előrehaladottabb állapotában, nagyobb lézió esetén a tünetek a diszkomfort érzéstől a komoly fájdalomig terjedhetnek. További tünet lehet a vérzés, mozgó fogak, légzésproblémák, beszédnehézségek, nyelési nehézségek, trismus (állkapocs korlátolt mozgathatósága), valamint a paraesthesia<sup>9</sup> (érzékszervek érzékelési zavara). Az OSCC szinte bárhol előfordulhat a szájban, azonban van néhány terület, ahol gyakrabban kialakul, leggyakrabban (az esetek 50%-ában) a nyelven vagy a szájfenéken. Egyéb előfordulási területe lehet a bukkális mukóza, a zápfog mögötti terület, fogíny, lágyszájpad, valamint ritkábban a kemény szájpad és a nyelv hátsó része<sup>9</sup>.

Az OSCC klinikai diagnózisa esetén mindig szükséges a szövettani vizsgálat, mivel a klinikai karakterisztikák önmagukban nem elég megbízhatóak. Korai stádiumban gyakran előfordul a nem megfelelő diagnózis felállítása, azonban előrehaladottabb stádiumban egyértelműek az OSCC jelei<sup>10,11</sup>. A léziók mérete néhány millimétertől néhány centiméterig (a legelőrehaladottabb állapotban) terjedhet. Egy retrospektív tanulmány szerint egy átlagos előrehaladott állapotban lévő lézió mérete 2,6 cm<sup>12</sup>. A kezdeti léziók esetében kis méretükből adódóan általában nem jelentkeznek tünetek<sup>13</sup>. Mint minden tumor esetében, az OSCC-nél is rendkívül fontos a korai diagnózis. A három hétnél tovább fennálló lézió esetében gyanakodni kell az OSCC-re. A korai rosszindulatú lézió megjelenési formája általában egy erythroplakia<sup>13</sup>, amely vörös vagy vörös-fehér részekből álló kissé érdes, jól körülhatárolható terület (1. A ábra). Néha kellemetlen érzést okozhat, de a legtöbb esetben nem jár fájdalommal. A rosszindulatú léziók legjellemzőbb tulajdonságai a fekélyesedés, nodularitás, illetve megtapadás az alsóbb szöveti rétegben (1. B ábra).

A



B



**1. ábra:** (A) Erythroplakia a nyelv laterális határán. (B) Szájüregi laphámsejtes karcinóma a nyelv alveoláris gerincén (Jose Bagan és mtsi. 2010)<sup>14</sup>.

### 3.1.2 Az OSCC rizikófaktorai

Ahogy a legtöbb betegség esetén, az OSCC kialakulásában is genetikai és környezeti tényezők játszanak szerepet. Ezek a tényezők a dohányzás, alkoholfogyasztás, táplálkozási szokások, onkogén vírusok, családi és genetikai hajlam, immunszuppresszált állapot, szájhigiénia, valamint a száj mikroflórája.

A legfontosabb külső rizikófaktor a dohányzás és az alkoholfogyasztás. A szájüregi daganatok és a dohányzás közötti kapcsolatot epidemiológiai vizsgálatok támasztják alá<sup>15</sup>. A dohányfüst több mint ötezer kémiai anyagot tartalmaz, amelyből 98 bizonyítottan karcinogén<sup>16</sup>. A dohányfüstben lévő legjelentősebb karcinogén anyagok az aromás szénhidrogén benzpirének és a nitrózaminok. Állatkísérletekkel bizonyították, hogy ezek a karcinogének szájtumort okoznak. Ezek az addíciós vegyületek a DNS replikációjában kritikus szerepet játszó génekben is mutációt okoznak<sup>17</sup>. A potenciális gének genetikai polimorfizmusa kulcsszerepet játszhat abban, hogy a dohányfüst hatására OSCC alakuljon ki<sup>18</sup>. Az alkoholnak önmagában nem bizonyították a karcinogén szerepét OSCC esetében, azonban epidemiológiai vizsgálatok igazolják az alkohol és a dohányzás szinergikus hatását. Az alkohol növeli a nyálkahártya permeabilitását, amely a dohányfüstben lévő karcinogén anyagok könnyebb sejtbe jutását eredményezi<sup>19</sup>. Az alkohol és a dohányzás együttes hatása tizenötszörösére növeli az OSCC kialakulásának esélyét<sup>20</sup>. Délkelet-Ázsiában, különösen Indiában gyakori szokás a bételdió rágása, amelyet gyakran dohánylevéllel kevernek. A közelmúltban számos kutatást végeztek a bételdióban és a dohánylevélben jelen lévő karcinogének kimutatására. Bizonyították, hogy a bételdió



egyes összetevői növelik a sejtek proliferációs aktivitását. Ezenfelül tartalmaznak reaktív oxigén származékokat (ROS), metiláló ágenseket, illetve reaktív metabolikus intermediereket, amelyek különböző DNS károsodásokat okoznak, ezáltal hozzájárulnak az OSCC kialakulásához<sup>21</sup>.

Az OSCC kialakulásának másik tényezője az étrend. Több epidemiológiai tanulmány is alátámasztja, hogy megfelelő étrenddel csökkenteni lehet az OSCC kialakulásának kockázatát. A zöldség és gyümölcs alapú táplálkozás segíti a karcinogén anyagok eliminálását a bennük lévő vitaminok, antioxidánsok, rostok révén<sup>22</sup>.

Az egyik legfontosabb rizikófaktor a vírusfertőzések, amelyek nagymértékben növelik az OSCC kialakulási esélyeit. Az OSCC esetén a legjelentősebb onkogén vírus a Humán papilloma vírus (HPV) (ezen belül is a HPV16). Több mint 100 HPV-t azonosítottak, amelyek onkogenikus potenciállal rendelkeznek. Ellentmondásos eredményeket mutatnak azok a kutatások, amelyek a HPV OSCC kialakulásában betöltött szerepét vizsgálták. Számos kutatócsoport szerint a HPV hosszabb ideig játszik szerepet a karcinogenezis kezdeti szakaszában, mások szerint csak egy rövid ideig („hit and run” elmélet) járulnak hozzá a tumor kialakulásához. A HPV-vel kapcsolatos hipotézis szerint a virális E6 fehérje kötődik a p53 fehérjéhez, amely a p53 degradációját okozza, illetve az E7 vírusfehérje retinoblasztóma fehérjéhez kötődve gátolja annak aktivitását. Ezeknek a kulcsfontosságú onkoszuppresszív molekuláknak a deregulációja kontrollálatlan sejtosztódáshoz és az apoptózis hiányához, ezáltal OSCC-hez vezethet. A szakirodalom jelenlegi állása szerint önmagában a száj mukózájának HPV fertőzése nem elég a malignus transzformációhoz, szükséges hozzá valamilyen egyéb karcinogén anyag jelenléte is<sup>23–27</sup>.

### ***3.1.3 Az OSCC kialakulásának molekuláris háttere***

A szájüregi laphámsejtes karcinóma sejtjei a keratinocitákból alakulnak ki. Mint minden tumor esetében az OSCC-t is a DNS mutációja okozza, amely történhet spontán módon, azonban külső tényezők is elősegíthetik, mint például kémiai, fizikai vagy mikrobiális hatások. A DNS megváltozásának eredményeképpen egy egészséges keratinocitából premalignus vagy malignus keratinocita alakulhat ki, amelyet a kontrollálatlan sejtosztódás jellemez. Ezek autonóm sejtekké válnak, amelyek a hámszövet bazális membránján keresztül képesek eljutni a nyirokcsomókba, a csontokba, agyba, májba és más helyekre, ahol áttétet képeznek<sup>28</sup>. Számos tanulmány

foglalkozott az OSCC kialakulásának öröklődési faktoraival. A betegség kialakulásának relatív veszélye az OSCC-vel diagnosztizált páciensek közvetlen rokonai esetében 1,1-3,8 esélyhányados között mozog<sup>29</sup>. Több gént azonosítottak, amelyeket az OSCC kialakulásában hajlamosító tényezőként tartanak számon. Legnagyobb mértékben azon gének polimorfizmusát hozzák összefüggésbe az OSCC-vel, amelyeknek a xenobiotikumok lebontásában van szerepe. Ilyen például a citokróm P450 1A1 és a glutation-S-transzferáz génje<sup>30,31</sup>.

Az OSCC kialakulásában nemcsak öröklött genetikai faktorok vesznek részt, hanem külső környezeti hatások is növelhetik a tumor képződésének esélyét<sup>32</sup>. A karcinogéneknek való hosszútávú kitétel egy-egy adott gént, de akár nagyobb kromoszómáriszerveket, kromoszómákat is károsíthat. A DNS károsodása így tumorsuppresszorok és onkogének mutációját eredményezheti, amelyek a sejtek túlélését és proliferációját serkenthetik. Az ilyen mutációk bizonyos gének demetilációját vagy hipermetilációját okozhatják<sup>33,34</sup>. Az onkogének a következő csoportokba sorolhatók: (1) növekedési faktorok és növekedési faktor receptorok (hst-1, int-2, EGFR/erbB-2, c-erbB-2/Her-2, sis), (2) transzkripciós faktorok (myc, fos, jun, c-myc), (3) intracelluláris szignál transzducerek (ras, raf, stat-3), (4) apoptózis inhibitorok (bcl-2, bax), (5) sejtciklus szabályzók (cyclin D1)<sup>35</sup>. Ezek az események hozzájárulhatnak, hogy egy egészséges keratinocita sejt autonóm legyen, korlátlanul osztódjon, és kialakuljanak az invazív tulajdonságok, amelyek metasztázishoz vezethetnek.

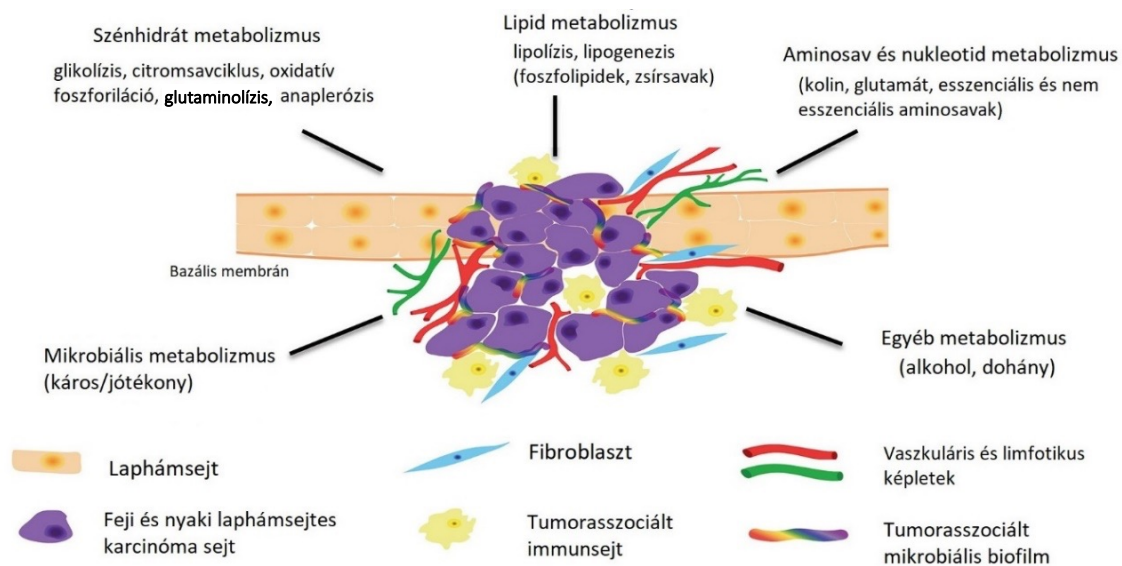
A szájtumorok kialakulására alkotott elmélet szerint a száj epitéliuma karcinogén faktoroknak van kitéve, ezért az egész területen nagyobb az esélye, hogy malignus léziók alakuljanak ki a tumorsuppresszorokban és onkogénekben bekövetkező genetikai változások felhalmozódása miatt. Ezt az elméletet „*field cancerization*” (területi tumorosodás) elméletnek nevezik<sup>36</sup>. Az elmélet alapján lehetséges, hogy a kialakuló szájüregi karcinóma eredete heterogén, azaz nem egy, hanem több sejt tumorosodásából ered<sup>37</sup>. Ezzel szemben több tanulmány is van, amely szerint heterogén tumorok kiindulási állapotukban homogén eredetűek, amely egy tumor őssejtől indul ki, azonban a genetikai instabilitás miatt differenciálódnak és a tumor heterogénné válik<sup>38</sup>. Ez az elmélet szerint egy őssejt, amely az epitéliumban helyezkedik el, genetikai változásokon megy keresztül és utódsejteket képez, amelyek mind hordozzák a kialakult genetikai módosulást. Ez a kialakult sejttömeg akár néhány centiméteres is lehet, amely a száj mukózájában helyezkedik el és gyakran észrevétlen

marad a diagnosztika előtt. Bizonyos esetekben eltérő morfológiai jellemzőkkel bírhat, például erythroplakia vagy leukoplakia formájában jelenik meg<sup>38</sup>.

### **3.1.4 OSCC metabolizmusa**

Hanahan és Weinberg<sup>39</sup> hat tulajdonságot írt le, amely a tumorsejtekre jellemző: (1) külső növekedési szignáloktól való függetlenség, (2) a növekedésgátló jelekkel szembeni érzéketlenség, (3) korlátlan replikatív potenciál, (4) angiogenezis fenntartása, (5) szöveti invázió, (6) metasztázis. Tíz évvel később kiegészítették munkájukat és még két tulajdonságot állapítottak meg, amely jellemzi a tumorsejteket: (1) az immunrendszer megkerülése, (2) sejtek metabolizmusának újraprogramozása<sup>40</sup>. A már elfogadott tumorjellegzetességeket nem egyenként kell vizsgálni, hiszen az ezeket kialakító metabolikus útvonalak mind összefüggnek. Ez egyfajta holisztikus nézet, miszerint a redukcionista elmélet (a tumorok a génekben végbemenő szomatikus mutációk következményei) és az organicista elmélet (a tumor egy rendszer/szövet szintű rendellenesség következménye) nem mondanak ellent egymásnak, hanem éppen kiegészítik egymást<sup>41</sup>.

A tumor nemcsak a tumorsejtek halmaza, hanem egy komplex szövet, amelyet különböző, egymással heterogén interakciókban résztvevő sejtek alkotnak. Ezen kívül a tumorasszociált sztrómát alkotó sejtek és nem sejtes elemek is aktív résztvevői a tumorgenezisnek. A tumor-mikrokörnyezet heterogenitása feji és nyaki daganatok esetén is megfigyelhető, ahol a malignus feji és nyaki laphámsejtes karcinóma sejtek mellett fibroblasztok és immunsejtek is jelen vannak. Az OSCC megváltozott metabolizmusához pedig a rezidens mikrobióta, az alkohol és dohányfüstben lévő anyagok metabolizmusa is hozzájárul<sup>40</sup> (2. ábra).

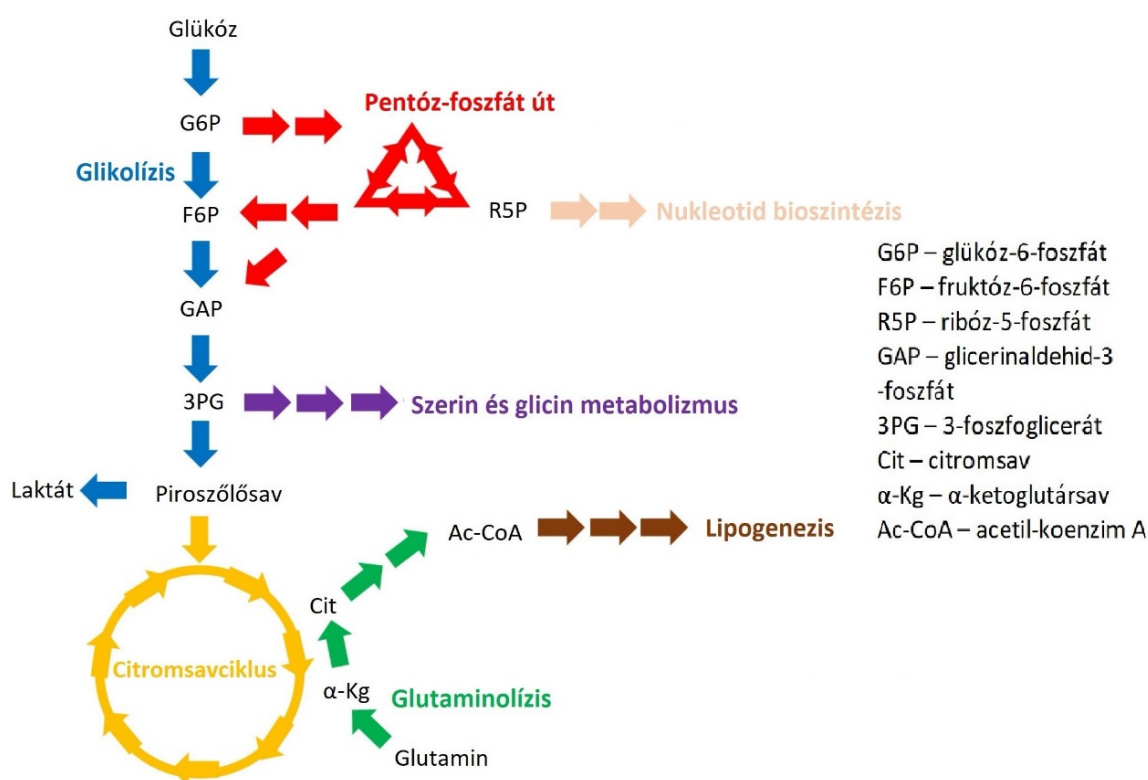


**2. ábra:** A fej-nyaki daganatok mikrokörnyezete és metabolizmusa  
(Shin és mtsi. 2016 alapján módosítva)<sup>42</sup>.

Mivel az oxigén és tápanyag ellátottság folyamatosan fluktuál, ezért a környezetben a sejtek mindig az adott körülmények között a leghatékonyabb metabolikus útvonalakat aktiválják. Azt, hogy mindig az éppen szükséges enzimmézőlet expresszálódjon, poszttranszlációs, genetikai és epigenetikai módosításokkal érik el. A folyamatosan változó körülményekhez való alkalmazkodás következtében a tumor és annak környezete térben és időben rendkívül heterogén és dinamikus változik. A tumorsejtek genetikai instabilitásának köszönhetően sokféle metabolikus fenotípus megnyilvánulhat, így szinte mindig akad olyan tumorsejt szubpopuláció, amely a kedvezőtlen környezetben is túlél, osztódik, sőt a különböző tumorterápiákkal szemben is ellenálló<sup>43</sup>. A megváltozott metabolikus folyamatok kategorizálhatók aszerint, hogy milyen mértékben és módon járulnak hozzá a tumorigenézishoz. Eszerint lehetnek transzformálók, megengedők és semlegesek. A transzformáló metabolikus aktivitások háttérben általában valamilyen enzim mutációk állnak, ezek közül a leginkább tanulmányozott az izocitrát-dehidrogenáz 1 és 2, fumarát-hidratáz és a szukcinát-dehidrogenáz enzimkomplex tagjai. A megengedő folyamatok nem a sejtek transzformációját, hanem a tumorprogressziót segítik, ezek a folyamatok a bioenergetikában, redox egyensúly fenntartásában és a makromolekulák előállításában vesznek részt. A tumorprogresszió szempontjából nehéz egy metabolikus aktivitást semlegesnek nyilvánítani, hiszen a változó körülmények ezeket a folyamatokat

bizonyos helyzetekben szükségessé, máskor helyettesíthetővé teszik<sup>44</sup>. A tumorsejteknek nagy mennyiségű glükózra van szükségük az ATP (Adenozin-trifoszfát), illetve különböző prekursorok előállításához. Ezenkívül aminosavakat, amelyek szén- és nitrogénforrásként szolgálnak a makromolekulák szintéziséhez, valamint ATP-forrást igényelnek. Zsírsavakra főként a membránok felépítéséhez van szükségük. Ha a tumor vérellátása korlátozottá válik, a sejteknek alternatív útvonalakat kell találniuk, és autofágiával, makropinocitózissal, extracelluláris lipidek felvételével, valamint a metabolikus útvonalaik újraprogramozásával kell biztosítaniuk a szükséges intermediereket. Az intenzív, felgyorsult metabolizmus megemelkedett, a már károsító szintet elérő ROS termeléséhez vezet. Ebben az esetben a sejteknek antioxidánsokra és redukáló ágensekre, például NADPH-ra van szüksége. Ennek érdekében jellemzően a pentóz-foszfát út és a folát-ciklus fokozódik<sup>45</sup>.

Ezek az útvonalak hálózatot alkotnak és közös intermediereik révén hatnak egymásra (3. ábra).



**3. ábra:** A tumorsejtek leggyakrabban megváltozott metabolikus útvonalai

(Dong és mtsi. 2017 alapján módosítva)<sup>46</sup>.

A legelőször tanulmányozott tumorsejtekben bekövetkező metabolikus útvonal változás a Warburg-effektus volt, miszerint a tumorsejtek oxigéndús környezetben is az anaerob glikolízist részesítik előnyben az oxidatív foszforilációval szemben. A glikolizáció során képződő piruvát nem jut be a citoplazmából a mitokondriumba, hanem laktáttá alakul. Mivel ennek a folyamatnak a során kevesebb ATP keletkezik, a tumorsejteknek nagy mennyiségű glükózra van szükségük<sup>47</sup>. Az intenzív glükózfelvételt OSCC-ben is kimutatták. A tumorsejtek a glükózt prekursorként használják a bioszintetikus folyamatokhoz, valamint a pentóz-foszfátokat biztosító pentóz-foszfát úthoz. A glutaminolízisnek fontos szerepe lehet a laktát felhalmozódásában, mivel ez biztosítja az ATP termeléshez szükséges redukáló ágenseket. Ennek a folyamatnak az aktiválódását OSCC sejtekben is bizonyították<sup>48</sup>. A premalignus és OSCC szövetek több aminosav (alanin, glutamát, glutamin, glicin, lizin, prolin, szerin, treonin) esetén csökkent koncentrációt mutatnak az egészséges kontroll szövetekhez képest. Az aminosavak intenzív felhasználása a premalignus és tumoros sejtekben az energiametabolizmus és a bioszintetikus folyamatok fokozott működésére utal, amely szükséges a gyors proliferáció fenntartásához<sup>49</sup>.

Egy, a nyelvből származó laphámsejtes karcinóma sejtvonalat egészséges fibroblasztokkal, valamint a tumoros sejtekből származó elsődleges és másodlagos metasztatikus sejtvonalakkal összehasonlító tanulmányból az derült ki, hogy az aminosav metabolizmus és a sejtciklus szabályozás megváltozása a kevésbé invazív fenotípusokra jellemző. A lipid metabolizmus megváltozása pedig az invazívabb, metasztatikus változásokkal hozható összefüggésbe<sup>50</sup>.

### ***3.1.5 Az OSCC terápiája és prognózisa***

OSCC esetén leggyakrabban alkalmazott terápia a műtéti úton történő eltávolítás, sugárterápia, kemoterápia, illetve ezek kombinációja<sup>51</sup>. Annak ellenére, hogy a terápiás módszerek nagymértékben fejlődtek, évtizedek óta az 5 éves túlélési arány 50%<sup>52</sup>. Az első és második stádiumban leggyakrabban műtéti eltávolítást, sugárterápiát vagy a kettő kombinációját alkalmazzák, amely általában tartós gyógyulást eredményez. A műtét, sugárterápia vagy kemoterápia kombinációját általában az OSCC harmadik és negyedik stádiumában alkalmazzák<sup>2</sup>. Általánosan elfogadott tény, hogy az OSCC prognózisa a korai szakaszban a legjobb, különösen azokban az esetekben, ahol a tumor még nem képzett áttétet. Sajnos a legtöbb OSCC-t a

késői szakaszokban diagnosztizálják<sup>53</sup>. Az előrehaladott stádiumban lévő OSCC túlélési aránya nem haladja meg a 12%-ot, a legtöbb páciens az első 30 hónapban meghal a betegség következményeitől<sup>54,55</sup>. Amennyiben az OSCC metasztázist képez, az az esetek 80%-ában a nyaki nyirokcsomókban jelentkezik. Ebben az esetben általában nyaki lymphadenectomiát, vagyis a nyirokcsomók kimetszését végzik<sup>56</sup>. A kemoterápiát illetően a leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szer a ciszplatin<sup>57</sup>.

A hagyományos terápiás eljárások mellett alkalmaznak célzott molekuláris terápiákat is, mint például a monoklonális antitest terápia és a génterápia. Ezeknek a legnagyobb előnye, hogy nincs vagy csak nagyon enyhe mellékhatásaik vannak az egészséges sejteket tekintve. A célzott molekuláris terápiákat esetenként hagyományos terápiákkal kombinálva alkalmazzák. A célzott molekuláris terápia fő targetjei a (1) növekedési faktor receptor (EGFR), (2) ciklooxygenáz-2 (COX-2), (3) peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (4) progeszteron receptor. Ezek a molekulák szerepet játszanak az OSCC proliferációjában és differenciálódásában<sup>58</sup>.

### **3.1.6 OSCC egérmodellek**

Az egérmodellek rendkívül fontos szerepet játszanak az OSCC kialakulásának és progressziójának vizsgálatában. Jelenleg kémiai mutagénekkel indukált, genetikailag módosított és transzplantált (xenograft) egérmodellek állnak rendelkezésre. Mindegyik modellnek van előnye és hátránya, de mindegyik modell legnagyobb hátránya, hogy egérben indukált a tumor kialakulása, így különbséget mutat az emberi OSCC-hez képest<sup>59</sup>. Kémiai mutagenézis során a 4-nitrokinolin-1-oxid (4NQO) molekulát használják a leggyakrabban. Jelenléte oxidatív stresszt, valamint szubsztitúciókat eredményez, amely az adenzin guaninra cserélését eredményezi. Ezek a folyamatok hasonlóak a dohányzás által okozott genetikai és epigenetikai változásokhoz, ezért a 4NQO által indukált OSCC egérmodell lehetőséget ad a dohányzás által kialakult szájüregi laphámsejtes karcinóma tanulmányozására<sup>59</sup>. A kémiai mutagénekkel előállított OSCC egérmodellek mellett léteznek genetikailag módosított egérmodellek is. Ebben az esetben genetikai módosításokat végeznek onkogének aktivációja vagy tumorsuppresszorok inaktivációja érdekében. Megfelelő promóterek segítségével, amelyek az egér szájüregében találhatóak szájüregi laphámsejtes karcinóma idézhető elő<sup>59</sup>. A harmadik lehetőség a OSCC egérmodell létrehozására a xenograftok előállítása. A folyamat során humán OSCC sejteket injektálnak ektopikusan vagy ortotopikusan

immunszuppresszált egerekbe<sup>60</sup>. Az ektopikus xenograft modell esetén humán tumorsejteket fecskendeznek szubkután az állat testének egy pontjába (nem a szájüregbe). Ortotopikus xenograft modell esetén pedig a szájüregbe injektálják tumorsejteket, leggyakrabban az állatok nyelvébe. A xenograft modell további két csoportra osztható az alapján, hogy egy humán sejtvonal sejtjeit, vagy egy páciens tumormintájából származó sejteket juttatnak az állatba<sup>61</sup>. Egy kísérleti modellben humán HSC-2 tumoros sejtvonal sejtjeit injektáltak balb/c NUDE (T-sejt hiányos) egerek nyelvébe, amely során az egerekben 9 nap alatt látható tumor nőtt, a tizenkettedik napra pedig a tumor szignifikáns súlyvesztést eredményezett<sup>62</sup>.

### **3.2 Orális mikrobióta**

Joshua Lederberg használta először a mikrobiom kifejezést, amely az emberi testen élő mikrobák közösségét jelenti. Ez a közösség mutualisztikus, kommenzalista és patogén mikroorganizmusokból áll<sup>63</sup>. Az emberi testen élő mikroorganizmusok száma nagyságrendileg összevethető az emberi testet alkotó sejtek számával<sup>64</sup>. Az orális mikrobiom/mikrobióta vagy mikroflóra kifejezés az emberi szájüregben található mikroorganizmusokra utal<sup>65</sup>. Az orális mikrobiom kifejezést néha az emberi szájüregben élő mikroorganizmusokra vonatkoztatják, azonban legtöbb esetben a szájban élő összes mikroorganizmus kollektív genomjára vonatkozik. Az emberi szervezetben a tápcsatorna mikrobiótája után az orális mikrobióta a második legnagyobb mikrobiális közösség. Az emberi mikrobióta áll egy központi és egy variábilis részből. A központi az, amelynek összetétele minden embernél ugyanaz, a variábilis pedig egyénenként változik az életmód és a fiziológiai különbségek miatt. A szájüregben kétféle felület van, amelyet a mikroorganizmusok képesek kolonizálni: a fogak kemény és puha szövetei, illetve a száj mukózája<sup>66</sup>. A szájüreg felszínét mikroorganizmusok által alkotott biofilm vonja be<sup>67</sup>. A szájüreg különböző területei – fogak, nyelv, fogíny, szájpád lágy és kemény része – tápanyagban gazdag, szaporodáshoz optimális körülményeket biztosítanak a mikroorganizmusok számára<sup>68</sup>. A szájüreg átlagos hőmérséklete 37 °C, amely konstans, így stabil körülményeket biztosít a mikroorganizmusok számára. A nyál pH-ja 6,5-7 között mozog, amelynek értéke szintén stabil és a legtöbb mikroorganizmus számára optimális érték. A nyál továbbá hozzásegíti a mikrobákat a tápanyagok felvételéhez<sup>69</sup>.



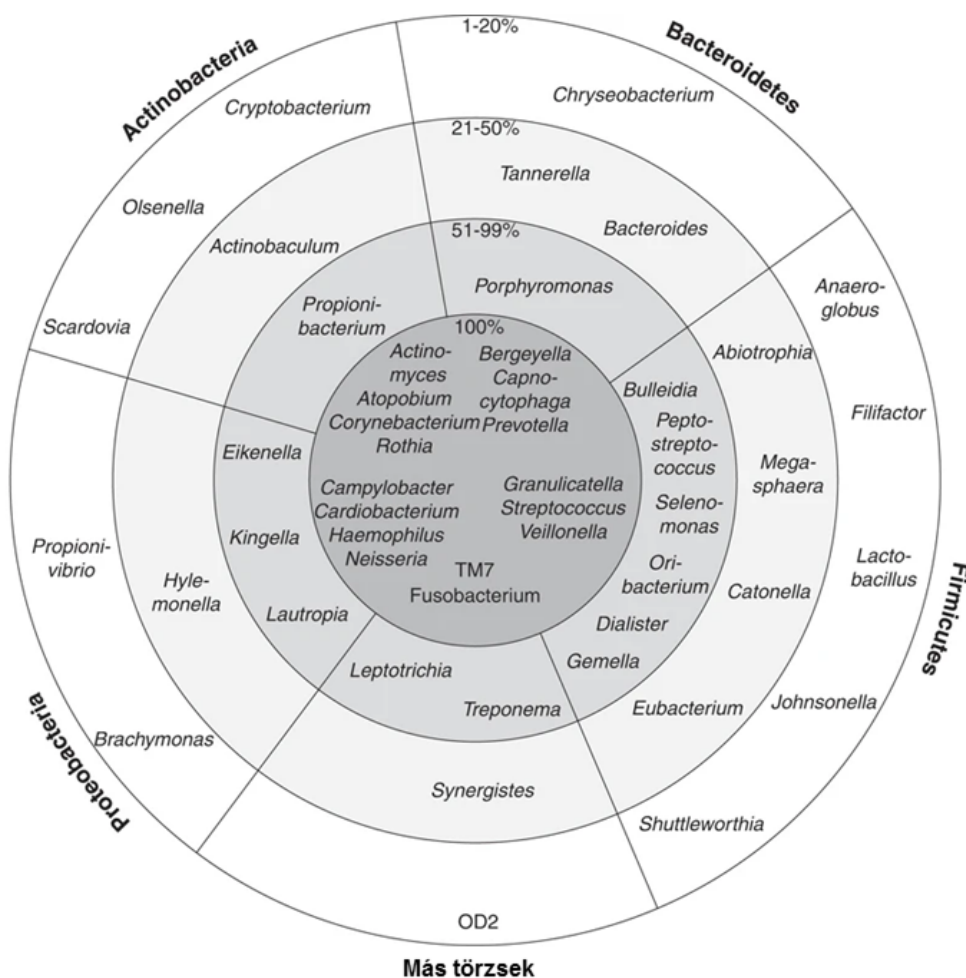
### 3.2.1 Az orális mikrobióta kialakulása

Az anyaméh, amelyben a magzat fejlődik alapvetően steril<sup>70</sup>, azonban a legújabb tanulmányok arról számolnak be, hogy a várandós nők 70%-ánál az orális mikrobióta kolonizálja az intrauterin környezetet, különösképpen a magzatvizet<sup>71</sup>. Születéskor a csecsemő találkozik az anya méhének és hüvelyének mikroflórájával, később pedig a levegőben található mikroorganizmusokkal. Annak ellenére, hogy ezen folyamat során egy csecsemő nagy mennyiségű mikrobával találkozik, a szájüreg még steril. A szájüreg kolonizálása az első táplálástól kezdve indul meg, innen kezdődik a szájüregi rezidens mikroflóra kialakulásának folyamata<sup>72</sup>. Nem sokkal a születés után megkezdődik a szájüreg mikroorganizmusok általi kolonizálása. Pionír fajok azok, amelyek legelőször kolonizálják a csecsemő szájüregét, ilyen például a *Streptococcus salivarius*. Az első évben főleg aerob mikroorganizmusok jelennek meg, elsősorban *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, illetve *Veillonella* fajok. Amint a fogak elkezdenek kinőni, a mikrobiális kolonizációhoz egyre több felület keletkezik. A mikrobák a fog különböző részein plakkokat képezhetnek. A kor előrehaladtával, a fogak elvesztése után, a száj mikroflórája a fogak kinövése előtti állapotához lesz hasonló<sup>73</sup>.

### 3.2.2 Az orális mikrobióta alkotói

Az emberi szájüregben sokféle mikroorganizmus megtalálható. Bizonyított, hogy mivel a mikroorganizmusok folyamatosan ki vannak téve a környezeti hatásoknak, a környezet befolyásolja az orális mikrobióta összetételét<sup>74</sup>. A szájüreg egy jellegzetes ökológiai niche, amely nagymértékben különbözik az emberi test többi felületeitől, így egyedülálló környezetet biztosít a mikrobiális kolonizáció számára. A szájüregen belül is különböző ökológiai nicheket különböztetünk meg: fogíny, nyelv, kemény és lágy szájpad, torok, nyál, fogak<sup>68,75</sup>. A normál humán orális mikrobiótát baktériumok, gombák, vírusok, archeák és protozoák alkotják. A szakirodalomban számos tanulmány fellelhető, amely jellemzi a bakteriális mikroflórát, azonban a mikrobiótáról (humán mikroflóra gombák alkotta része) igen keveset tudunk<sup>66</sup>. Megközelítőleg 700 prokarióta faj található a szájüregben, amelyek 12 törzsbe és 185 nemzetségbe sorolhatók. Ezen fajok 54%-a hivatalos fajnévvel rendelkezik, 14%-a névvel nem rendelkezik, azonban tenyésztethető, 32%-a pedig nem tenyésztethető<sup>67</sup>. Az orális mikroflóra bakteriális részét képező 12 törzs a *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*,

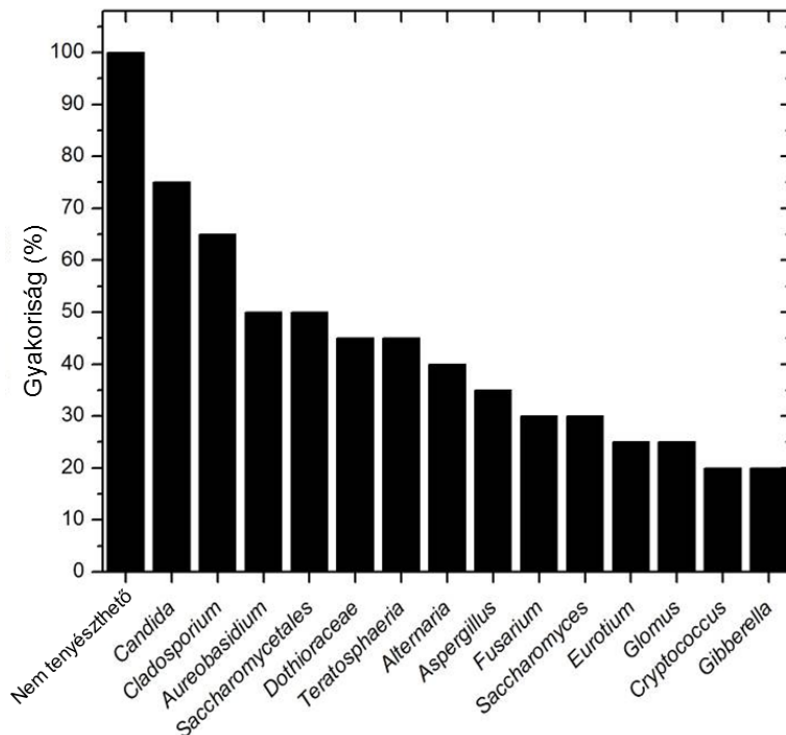
*Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *SRI*, *Synergistetes*, *Saccharibacteria* (TM7) és a *Gracilibacteria* (GN02)<sup>76</sup>. Nemzetség szintjén az orális mikroba közösség konzervált. A hasonlóságok ellenére azonban emberenként, illetve a szájüregben belül a különböző területeken eltér a mikrobióta fajszerű összetétele. A nyelven számos papilla található, amely az anaerob mikroorganizmusoknak biztosít felületet. A szájüreg legkevésbé diverz területe a bukkális mukóza<sup>77</sup>.



**4. ábra:** A szájüregben előforduló bakteriális közösség sematikus ábrázolása 10 egészséges szájüregből vett minta alapján. A belső körben azok a baktérium nemzetségek vannak feltüntetve, amelyek mind a 10 szájüregben (100%) előfordultak. Belülről a második körben található nemzetségek 6-9 (51-99%) szájüregben voltak jelen. A harmadik körben található nemzetségek 3-5 (21-50%) szájüregben voltak megtalálhatóak. A legkülső kör mutatja azokat a baktérium nemzetségeket, amelyek 1-2 ember (1-20%) szájüregében voltak megtalálhatóak (Bik és mtsi. 2010 alapján módosítva)<sup>78</sup>.

Az egészséges szájüregben nemcsak baktériumok, hanem protozoák, vírusok és gombák is jelen vannak<sup>79</sup>. Úgy vélik, hogy a szájban élő protozoák szaprofiták, amelyek közül legnagyobb számban az *Entamoeba gingivalis* és a *Trichomonas tenax* van jelen. Egy 2016-os tanulmány szerint a nyálban és a fogakon található plakkokban a *Siphoviridae*, *Myoviridae* és *Podoviridae* családhoz tartozó bakteriofágok is megtalálhatóak<sup>80</sup>. A szájban élő baktériumok elveszítették a bakteriofágokkal szembeni védekező képességüket annak érdekében, hogy megtelepedhessenek a szájüreg felszínein, ami miatt a fágok jelenléte és összetétele meglehetősen stabil<sup>81</sup>. A test más területein (belek, bőr) lévő bakteriofágok összetételéhez képest a szájüregben lévő bakteriofágok összetétele sokkal jobban függ az egyéntől és a nemtől<sup>82</sup>. Továbbá a bakteriofágok hatást gyakorolhatnak az általuk megfertőzött baktériumok patogenitására, így a száj mikrobiótája által kiváltott betegségek esetében a bakteriofágok szerepe nem elhanyagolható. A bakteriofágok mellett a humán sejteket fertőző vírusok is jelen lehetnek a szájüregben. A nyálmirigyeket érintő leggyakoribb virális eredetű betegség a mumpsz és a veszettség<sup>83</sup>. Ezeken felül gyakori a *Herpes simplex* vírus általi fertőzés, amely különböző életkorban különböző klinikai tüneteket okozhat<sup>84</sup>, illetve gyakran jelen van az OSCC rizikófaktorai témakörben említett HPV<sup>85,86</sup>.

Az orális mikrobióta további alkotói a gombák. Habár számuk a baktériumokéhoz képest alacsonyabb, méretükből fakadóan hatásuk jelentős<sup>87</sup>. Ghannoum és munkatársai végezték eddig a legátfogóbb vizsgálatot, hogy azonosítsák a szájüregben élő gombákat, azaz a mikrobiom alkotóit<sup>88</sup>. A tanulmány rávilágított arra, hogy a mikrobiom egyénenként nagyban eltér. Az egészséges szájüregben található mikrobiomot 74 tenyészthető és 11 nem tenyészthető gomba nemzetség alkotja. A központi mikrobiomhoz tartoznak a *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Cryptococcus* fajok. Legnagyobb mértékben *Candida* fajok vannak jelen, a kutatásban résztvevők 75%-ából volt izolálható valamelyik *Candida* faj.



**5. ábra:** A 15 leggyakoribb szájüregben megtalálható gomba nemzetség. A tanulmány vizsgálta 20 egészséges egyén szájüregében jelen lévő gombák mennyiségét. A gyakoriság (%) arra utal, hogy a vizsgált személyek hány százalékának a szájüregében voltak megtalálhatóak az adott gomba nemzetség képviselői (Ghannoum és mtsi. 2010 alapján módosítva)<sup>88</sup>.

Egy másik tanulmány szerint is, amely 40 egészséges fiatal felnőtt szájüregét vizsgálta, a *Candida* fajok az orális mikrobióta legfőbb alkotói (68%). Továbbá nagy számban voltak jelen *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus* és *Cladosporium* fajok. Habár kisebb mértékben, de szintén jelen voltak *Trichoderma*, *Scedosporium*, *Alternaria* és *Rhizopus* fajok. A szerző megjegyzi, hogy a legtöbb izolált fonalas gomba a környezetben is megtalálható<sup>89</sup>. Egy harmadik tanulmány<sup>90</sup> pedig arról számolt be, hogy 1799 szájüreget vizsgálva 415 esetben izoláltak gombát. Legnagyobb mértékben (az esetek 71,8%-ában) az izolált fajok között volt a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, illetve a *C. tropicalis*. Kisebb számban volt jelen a *Kodamaea (Pichia) ohmeri*, egyéb *Candida* fajok, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Pichia*, *Rhodotorula* fajok, valamint a *Saccharomyces cerevisiae*. A tanulmány továbbá megállapította, hogy a kor, egészségi állapot, születési hely, illetve az élőhely befolyásolja a szájban megtalálható gombák jelenlétét, diverzitását.

### 3.3 Orális candidiasis

Az orális mikrobióta tagjai közül leggyakrabban a *Candida* fajok okozzák a szájnnyálkahártya fertőzését, jellemzően immunhiányos betegek esetében. Legtöbb esetben a CD4+ (Helper T sejt) ezen belül is a Th17 (T helper 17) immunsejtek nem megfelelő működése eredményezi a *Candidák* szájban történő nagymértékű elszaporodását, emellett az antibiotikumok használata miatt megváltozik a szájüreg bakteriális mikrobiótájának mennyisége és összetétele, amely szintén hozzájárulhat a *Candida* fajok túlszaporodásához. Azonban a candidiasis kialakulásához általában szükséges a helyi vagy szisztémás immunszuppresszió, valamint az antibiotikumok használatának együttes hatása<sup>91</sup>. HIV (Humán immundeficiencia vírus) fertőzött betegek esetében a már említett Th17 és CD4+ sejtek funkciójának elvesztése változást okoz az orális mikrobióta összetételében, amely során az opportunistá patogén gombák teret nyerhetnek, azonban kimutatták, hogy a HIV és a *Candidák* között direkt kapcsolat is megvalósulhat<sup>92</sup>. Az orális candidiasis kialakulásának egyéb rizikófaktorai a dohányzás és a diszbiózis. A dohányzás több mechanizmuson keresztül is képes növelni a *Candidák* szaporodását és patogenitását<sup>93</sup>. Diszbiózis során a megváltozott mikrobiális összetétel miatt teret nyernek az oppurtunista patogén *Candida* fajok. Ezek mellett a nyál áramlási sebessége, bizonyos nyálban lévő fehérjék és specifikus helyi immunválaszok hozzájárulnak a *C. albicans* szembeni veleszületett immuntoleranciához. A virulens *C. albicans* ellentétben a kommenzalista *Candida* fajok olyan szabályzó immunválaszt váltanak ki, amelyek egy folyamatos tolerogén állapotot tartanak fenn a kommenzalistákkal szemben<sup>94</sup>.

A HIV fertőzés mellett számos más olyan immunhiányos állapot van, amely következtében kialakulhat orális candidiasis. Ilyenek például a leukémia, tumoros megbetegedések, kemoterápia, sugárterápia, rossz szájhigiénia, alultápláltság, helyi vagy szisztémás kortikoszteroidok alkalmazása, más immunmoduláló gyógyszerek, antibiotikumok, illetve egyéb szájbetegségek<sup>94-99</sup>.

#### 3.3.1 Az orális candidiasis klinikai megjelenése

Az orális candidiasis kialakulása esetében általában a gomba élesztő forma helyett hifa formában kezd el növekedni, így lehetőség adódik a nyálkahártyába történő behatolásra<sup>94,95,97,98</sup>. Az esetek 70-80%-ában a *C. albicans* az orális candidiasis okozója, azonban kisebb számban más fajok is képesek kiváltani a betegséget, mint például a *C.*

*glabrata* vagy a *C. tropicalis*<sup>98</sup>. Az orális candidiasisnak két klinikai megjelenési formáját ismerjük. Az egyik a fehér candidiasis, amely fehér gombatelepek megjelenését jelenti a szájüregben, a másik az eritémás (vörös) candidiasis, amely a leggyakoribb megjelenési forma, hosszú fennállás után a nyelv felszíne sima, piros lesz<sup>95,96,98</sup>.

A fehér candidiasisnak két fajtája ismert. A leggyakrabban előforduló a pseudomembranosus candidiasis, amely általában összefüggő fehér plakkokat képez a kemény és lágy szájpadon, nyelven (6. ábra), bukkális mukózán, a szájgaraton, illetve ezen régiók kombinációján. Ennek a típusnak az egyik megkülönböztető jele, hogy a fehér plakkok letörölhetőek<sup>97,98</sup>. A pseudomembranosus candidiasisnak létezik akut és krónikus formája is. A betegek általában tünetmentesek, azonban az érintett területeken felléphet savanyú ízérzékelés, égő érzés vagy vérzés<sup>95,97</sup>.



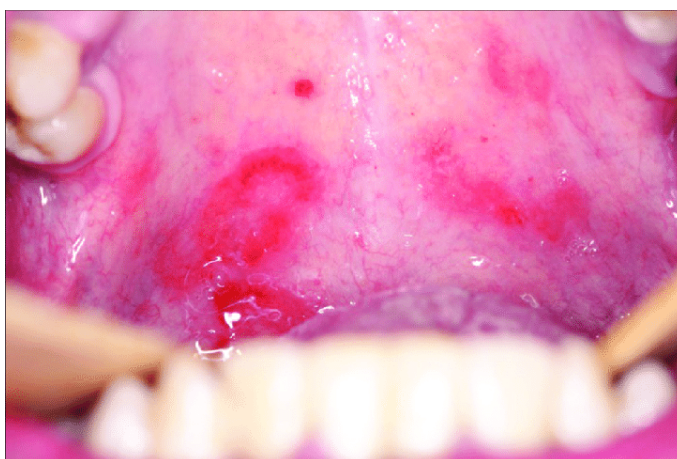
**6. ábra:** Akut pseudomembranosus candidiasis a nyelven<sup>100</sup>.

A fehér orális candidiasis másik típusa a hiperplasztikus forma, amely jól körülhatárolt, kissé kimagasló fehér plakkokból áll, valamint leggyakrabban a szájüregi nyálkahártyákon és az ajkakon jelenik meg (7. ábra). Hiperplasztikus candidiasis esetén nem lehet könnyedén letörölni a fehér plakkokat, mint a pseudomembranosus candidiasis esetében, valamint a fehér plakkok néha leukoplákiára jellemző tulajdonságokkal bírnak, amelyekből később malignus tumoros elváltozások alakulhatnak ki<sup>95,97</sup>.



**7. ábra:** Hiperplasztikus candidiasis<sup>95</sup>.

Az eritémás orális candidiasisnak számos megjelenési formája ismert<sup>95</sup>. Egyik fajtája az akut atrófiás candidiasis, leggyakrabban a HIV fertőzött betegeknél jelenik meg, amely eritémás foltként jelentkezik a szájüregben (8. ábra). Egyéb szájterületek is érintettek lehetnek, és előfordulhat a nyelv papilláinak sorvadása is. A leggyakoribb tünetek közé tartozik az égő érzés a szájban (különösen fűszeres ételek fogyasztásakor), valamint fájdalomérzet a nyelven vagy ajkakon<sup>95,97</sup>. Rizikófaktoroként írták le a vas vagy a B12-vitamin hiányát, amely szélesspektrumú antibiotikum terápia után gyakran előfordul<sup>95</sup>.



**8. ábra:** Szájpadláson lévő akut eritémás atrófiás candidiasis<sup>101</sup>.

Következő típusa a krónikus atrófiás candidiasis elsősorban a rosszul felhelyezett műfogsor következtében alakul ki, mivel a nyál nem tud megfelelően

áramolni bizonyos területeken<sup>95,102</sup>. Az elváltozások elsősorban a fogsorral érintkező területeken jelentkeznek, és általában vörösek, valamint duzzanat figyelhető meg. Az eritémás orális candidiasisnak ezen fajtája általában tünetmentes, néhány esetben égő érzés figyelhető meg a szájban. A harmadik típus az angular cheilitis, amely szintén a protézissel hozható összefüggésbe, illetve azoknál a személyeknél figyelhető meg, akik gyakran megnyalják vagy harapdálják ajkaikat<sup>95,97,98</sup>. Jellemzően a száj két oldalán jelenik meg, amely fájdalommal, illetve vörös, hasadt sebekkel jár<sup>95,97,98</sup>. Az eritémás orális candidiasis negyedik fajtája a linear gingival erythema, amely esetében a *Candida* gombák elszaporodása mellett bakteriális fertőzés is kialakul. Ebben az esetben egy vékony vörös csík jelenik meg egy vagy több fogínyszélen<sup>95</sup>. Az ötödik megjelenési forma a median rhomboid glossitis, amely igen ritkán fordul elő, általában tünetmentes. Megjelenését tekintve sima felszínű, rombusz alakú plakkok a nyelv hátsó részének közepén. Kialakulását a dohányzással és a kortikoszteroidokkal hozzák összefüggésbe<sup>95,97,98</sup>.

### **3.3.2 Az orális candidiasis diagnózisa**

A fent említett orális candidiasis típusokat kórelőzmény és megjelenés alapján diagnosztizálják. Bizonyos esetekben a diagnózist gomba festési, tenyésztési eljárásokkal vagy biopsziával validálják<sup>95,97,98</sup>. A differenciáldiagnózis felállításához széles körű információszerzés szükséges, hogy ne történjen félrediaosztizálás. A fehér léziókat meg kell különböztetni például a fehér ételmaradványoktól, egyéb szájüregi gombafertőzések, helyi sérülésektől, égési sérülésektől, leukoplákiától, illetve a szifilistől<sup>95,97</sup>. A krónikus hiperplastikus candidiasis esetén sorozatos biopszia szükséges ahhoz, hogy kizárható legyen a leukoplákia<sup>98</sup>.

### **3.3.3 Az orális candidiasis kezelése**

Az orális candidiasis kezelésére limitált számú gombaellenes szer áll a rendelkezésünkre. Három fő csoportba oszthatók azok, amelyeket a klinikumban alkalmaznak: poliének, azolok és az echinokandinok<sup>103,104</sup>. A gombafertőzések elleni küzdelmet, a kevés rendelkezésünkre álló antifungális szer mellett egyéb tényezők is nehezítik. Ilyen például a szelektivitás vagy a specifitás hiánya, magas toxicitás, illetve a rezisztencia kialakulásának fokozott valószínűsége. Leggyakrabban az amfotericin B-t használják a klinikumban, azonban a szelektivitás hiánya miatt toxikus az emberi



szervezetre nézve, mivel a gomba és az ember is eukarióta, biológiai folyamataikban sok hasonlóságot mutatnak<sup>104,105</sup>. Az azoloknak, mint például a flukonazol, nincs toxikus hatása az emberre nézve, azonban a túlzott használata miatt rezisztencia alakulhat ki<sup>105</sup>. A legújabb antifungális szerek az echinokandinok (pl. caspofungin), amelyek célpontja egy gombasejtfal komponens ( $\beta$ -1,3-D-glükán) szintézise. Mivel az emlős sejtek nem rendelkeznek sejtfallal, így az echinokandinok gombaspecifikusak<sup>103,104,106</sup>.

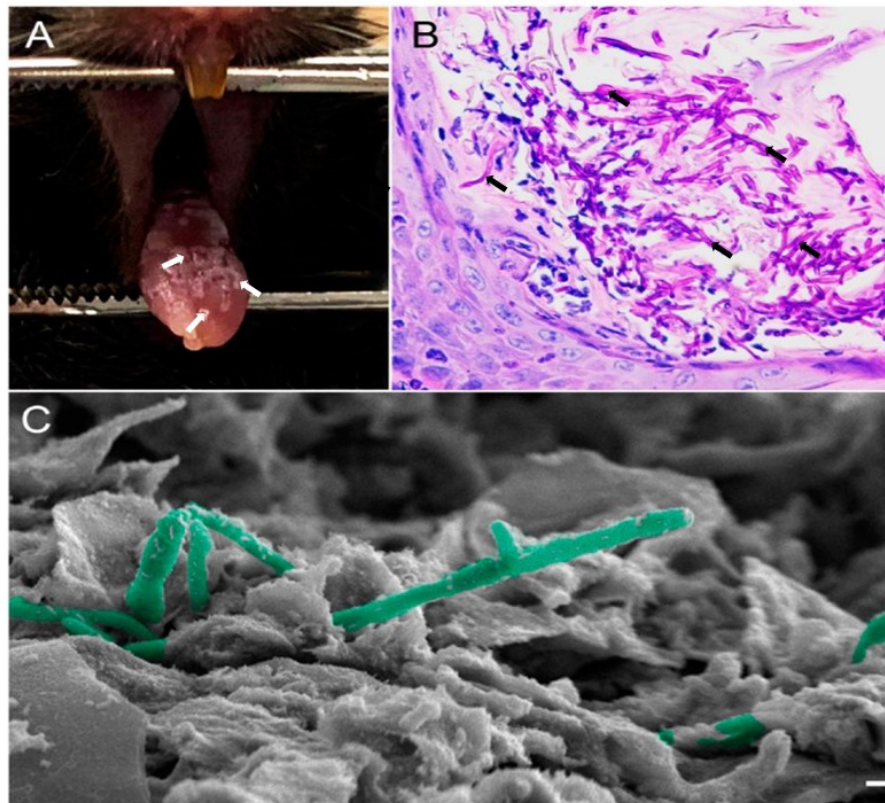
Orális candidiasis esetén a leggyakrabban alkalmazott lokális antifungális szer a nisztatin és a mikonazol. Mindkét szer nagyon hatékony, azonban a fertőzés eliminálásához hosszabb időre van szükség. A mikonazol kényelmesebb alkalmazhatóságot biztosít a betegek számára, azonban kölcsönhatásba léphet más gyógyszerekkel, ezért azt is figyelembe kell venni, hogy adott esetben milyen más kezelést kap a beteg. A nisztatinon és mikonazon kívül használnak lokális antifungális szerként amfotericin B-t és klotrimazolt is, azonban ezek nem minden országban érhetőek el. Amennyiben a fentebb említett lokális szerek egyike sem hatásos, szisztémás kezelést, például orális flukonazol terápiát szoktak alkalmazni. Egyéb szisztémás kezeléseket, mint az orális vagy intravénás itrakonazol, vorikonazol vagy posakonazol kezelés, ritkábban szoktak alkalmazni orális candidiasis esetén<sup>107</sup>.

#### 3.3.4 Az orális candidiasis egérmodellje

Az állatmodellek kulcsfontosságú szerepet játszanak a *Candida* gombák virulenciájának és a gazdaszervezet *Candida* fertőzésekre való érzékenységeinek megértésében. Ezenfelül az állatmodellek fontos információkkal szolgálnak új terápiás lehetőségek kidolgozásához<sup>108–110</sup>. Számos klinikailag releváns állatmodell áll rendelkezésre a szisztémás vagy mukozális *Candida* fertőzések tanulmányozására. Mivel a rágcsáló modellek nagy hasonlóságot mutatnak az emberrel a *Candida* fertőzés folyamatában, valamint a gazdaszervezet immunválaszában, ezért ezeket a modelleket tartják a legalkalmasabbnak<sup>111–116</sup>.

Az oropharyngealis candidiasis (OPC) egérmodelljének létrehozása viszonylag egyszerűen kivitelezhető és jól validált módszer, ezért az OPC vizsgálatának sztenderd állatmodelljévé vált. Ebben az állatmodellben immunszuppresszálják az egereket kortizon-acetát szubkután történő injekálásával, hogy fogékonyak legyenek a *Candida* fertőzésre. Ezt követően *Candida* sejteket tartalmazó szuszpenzióba áztatott vattát

helyeznek az állatok nyelve alá, így a mukózában megtapadt *Candida* sejtek képesek szaporodni és növekedni, ezáltal OPC-t idézve elő<sup>117</sup>. Ez a protokoll az emberekben kialakuló pseudomembranous candidiasis jelenlétét imitálja (9. A ábra). Az egérmodell esetében klinikailag értelmezhető jelek figyelhetők meg, mint a fehér léziók megjelenése orális candidiasis esetén, valamint szövettani és mikroszkópos felvételeken is vizsgálható a jelenség (9. B, C ábra). Ezenfelül a fertőzés mértéke kvantifikálható a fertőzött szerv homogenizálásával és szilárd táptalajra történő szélesztésével<sup>118,119</sup>.



**9. ábra:** Az orális candidiasis egérmodellje. (A) A nyilak az orális candidiasis következtében megjelenő, nyelven található fehér léziókat mutatják. (B) Egér nyelvének szövetszeti képe Perjódsvav-Schiff -reakció (PAS) festést követően. A nyilak a gomba hifákat mutatják. (C) Egér nyelvének pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) képe. A *C. albicans* hifa (utólag zöldre színezett) az epitéliumba penetrál. Méretjelző sáv: 20  $\mu\text{m}$ . (Vila és mtsi. 2020 alapján módosítva)<sup>119</sup>.

### 3.4 A mikrobióta és a tumoros megbetegedések kapcsolata

A humán mikrobióta kulcsszerepet játszik az egészség megőrzésében azáltal, hogy számos fiziológiai funkcióra hatással van, mint például az ember fejlődése, immunitása, táplálkozása. Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedben sokan vizsgálták a mikrobióta szerepét, valamint a betegségekkel való kapcsolatát, a pontos mechanizmusok még részleteiben nem ismertek. A gazda és a mikrobióta mutualisztikus együttélését az a kulcsfontosságú dolog teszi lehetővé, hogy egy jól fenntartott, több rétegből álló anatómiai korlát van a gazda és a mikrobák között. Ennek a korlátnak vagy védőgátnak a megszűnése elősegíti a gyulladások, illetve a betegségek kialakulását, beleértve a rákot is. Ez a korlát többkomponensű. Lehet egy ép hámréteg vagy egy érzékelő rendszer, amely detektálja és eliminálja a behatoló mikrobákat. Egyes esetekben további elemek is hozzájárulhatnak a védelem biztosításához, mint például az alacsony pH a bőrön és a gyomorban. Ezenfelül specifikus sejttípusok (kehely sejtek a belekben, keratinociták a bőrben) monitorozzák és tartják kordában a mikrobák számát és helyét különböző antibakteriális fehérjék termelése és kiválasztása révén<sup>120,121</sup>. A mikrobióta összetételének és mennyiségének szignifikáns és káros megváltozását diszbiózisnak nevezzük. A diszbiózist már több betegséggel összefüggésbe hozták, mint például a foggyökérhártya-gyulladás, irritábilis bél szindróma (IBD) vagy a krónikus vaginózis<sup>122</sup>.

A baktériumok karcinogenezisben betöltött szerepét ismerjük a legrészletesebben. Például a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) által karcinogénnek minősített *Helicobacter pylori* fertőzés következtében gasztritisz, gyomorfekély, atrófia és végül gyomorrák alakulhat ki<sup>123</sup>. Habár a *H. pylori*-t egy karcinogén patogénként tartják számon, az általa előidézett gyomorrák kialakulásában a teljes, komplex mikrobiótának is szerepe van. A *H. pylori* által okozott gyomor atrófia és alacsony sósav koncentráció lehetővé teszi más baktériumok túlzott elszaporodását, amelyek karcinogénekké alakítják a táplálékkal a szervezetbe jutó nitrátokat. Némileg ellentmond a *H. pylori* gyomorrák indukáló hatásának az a megfigyelés, miszerint a nyelőcső adenokarcinóma kialakulásának kockázatát csökkenti<sup>124,125</sup>. Ez azonban rávilágít arra, hogy a bakteriális mikrobiótának szervspecifikus hatása van a karcinogenezis során. Egy másik példa is alátámasztja, hogy egy adott patogén baktérium képes hozzájárulni a rosszindulatú daganatok kialakulásához. Az epehólyagrák esetében a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi és a

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi általi fertőzés összefüggésbe hozható a karcinogenezissel<sup>126,127</sup>.

Vizsgálatok kimutatták, hogy a száj mikrobiótájának megváltozása számos krónikus betegséggel hozható összefüggésbe. Ezek közül a foggyökérhártya-gyulladás az a betegség, ahol nagy eltérést mutat az egészséges és a beteg állapot közötti mikrobiális összetétel<sup>128</sup>. Több tanulmány is bizonyította, hogy a szájban kialakuló fertőző betegségek az egész szervezetre hatással vannak, ilyen hatások lehetnek például a várandósság során létrejövő komplikációk<sup>129</sup>, szív- és érrendszeri megbetegedések<sup>130</sup>, szisztémás gyulladás<sup>131</sup>, valamint diabétesz<sup>132</sup>.

### **3.4.1 OSCC és az orális candidiasis kapcsolata**

A baktériumok és vírusok karcinogenezisben betöltött szerepe egy intenzíven vizsgált terület. Ezzel szemben a gombák szerepéről még igen keveset tudunk, mivel egyedszámuk alacsonyabb a baktériumokéhoz képest, valamint nem rendelkezünk megfelelő referencia genomokkal. A rendelkezésünkre álló tudás alapján azonban elmondható, hogy a mikrobiom is hozzájárulhat a karcinogenezishez<sup>133</sup>.

Az egészséges szájüregben a *Candida* gombák, azon belül is a *C. albicans* van jelen a legnagyobb mértékben<sup>134–136</sup>, amelyek képesek proliferálni és bejutni a mukózába az epiteliális barrierek diszfunkcióját vagy sérülését követően. A *C. albicans* a hidrolitikus enzimek termelése, valamint a hifaképzése révén képes bejutni a szöveti rétegekbe. Ezek a tulajdonságok alapvetően előnyt jelentenek a *C. albicans* számára a többi gombával szemben, azonban végső soron a gazda immunrendszere határozza meg, hogy adott esetben a gomba eltávolítása, kolonizációja vagy betegség kialakulása valósul meg<sup>137</sup>. Számos tanulmány összefüggésbe hozta már a szájban létrejövő mikrobióta diszbiózist és az OSCC-t. Az OSCC-vel diagnosztizált páciensek szájüregében több, illetve többféle élesztőgomba található, mint az egészséges szájüregben. Ezenfelül több élesztőgomba található a tumor felszínén, mint a szájüreg egészséges felszínein<sup>138–141</sup>. Ezek, illetve más tanulmányok arra engednek következtetni, hogy feltehetően a *Candida* fajoknak direkt szerepe lehet az OSCC kialakulásában. A direkt kapcsolatot megerősíti egy esettanulmány, amelyben egy páciensnél orális candidiasis alakult ki. Ezt követően lokális antifungális kezelést kapott, aminek hatására a fehér léziók nagy része gyógyulni kezdett, azonban néhány helyen ezek a léziók nem szűntek meg. Később a léziók helyén szájüregi laphámsejtes

karcinóma alakult ki<sup>142</sup>. Egyéb tanulmányok is igazolták, hogy az epitélium *Candida* általi inváziója esetén az epitélsejtek egy része rendellenes fejlődésen mehet keresztül, ami később rosszindulatú elváltozásokat eredményezhet. Ezek alapján több bizonyíték is van arra, hogy a *Candida* gombák hozzájárulhatnak a szájüreg tumoros elváltozásának folyamataihoz<sup>143–147</sup>.

A már jelen lévő OSCC esetén a leggyakrabban alkalmazott terápia a kemoradio-terápia, amelynek hatására nő a kolonizáló élesztőgombák száma, így nagyobb az esély az orális candidiasis kialakulására<sup>148,149</sup>. Egy tanulmány szerint, az OSCC esetén alkalmazott kemoradio-terápia következtében az esetek 75,3%-ában orális candidiasis alakul ki<sup>150</sup>. Több más tanulmány is beszámolt a tumorterápiát követő megemelkedett *Candida* gomba kolonizációról<sup>146,151–155</sup>. A megemelkedett *Candida* kolonizáció hátterében a tumorterápia következtében megváltozott immunológiai folyamatok állnak, amely lehetőséget nyújt az orális candidiasis kialakulására<sup>156–159</sup>.

## 4 CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalomban fellelhető adatok egyértelműen bizonyítják az OSCC és az orális candidiasis kapcsolatát. Vannak bizonyítékok arra, hogy a túlzottan elszaporodó gombáknak, illetve az orális candidiasisnak szerepe lehet az OSCC kialakulásában. Ezzel párhuzamban a már kialakult OSCC esetén a tumorterápia következtében gyakran orális candidiasis alakul ki. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *Candida* gombák befolyásolhatják az OSCC progresszióját, azonban ezt a jelenséget még senki sem vizsgálta. Munkánk során ezért a következő célokat tűztük ki:

1. Hőinaktivált *Candida* gombák, valamint a zimosán (gombasejtfal komponens, általános gomba stimulus) OSCC sejtek inváziós és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*.
2. Élő *Candida* gombák OSCC sejtek inváziós és proliferációs aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*.
3. A *Candida* gombák hatásának molekuláris szintű vizsgálata transzkriptomikai vizsgálatok segítségével.
4. *In vivo* xenograft modell kidolgozása a *Candida* gombák OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához.
5. *Candida* gombák OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo* xenograft modellben.

## 5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1 Sejtvonalak és fenntartási körülményeik

A kísérletekhez két humán eredetű szájüregi laphámsejtes karcinóma sejtvonalat használtunk, az egyik a HSC-2 (JCRB0622), a másik a HO-1-N-1 (JCRB0831). A HSC-2 sejtvonalat EMEM (Lonza) médiumban [kiegészítve: 10% fetális borjú szérum (FBS) (EuroClone), 4 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin és 100 U/ml sztreptomicin (Lonza)], míg a HO-1-N-1 sejteket DMEM-F12 1:1 arányú keverékében (Lonza) [kiegészítve: 10% FBS (EuroClone), 4 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin és 100 U/ml sztreptomicin (Lonza)] növesztettük. Mindkét sejtvonalat 37 °C-os inkubátorban, 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció és 95%-os páratartalom körülmények között tartottuk fent.

### 5.2 *Candida* gombák tenyésztése és előkészítése a kísérletekhez

A kísérletekhez két *Candida* fajt használtunk: *C. albicans* SC5314 (SZMC 1523), valamint *C. parapsilosis* CLIB 214 (SZMC 1560). A kísérletek elvégzéséhez egy kicsinyi gombát oltottunk 5 ml folyékony YPD tápoldatba (1% glükóz, 1% pepton, 0,5% élesztőkivonat, 100 U/ml penicillin és 100 U/ml sztreptomicinnel kiegészítve), majd 12 órán át növesztettük rázó inkubátorban 30 °C-on. Ezt követően 50 µl szuszpenziót oltottunk át 5 ml folyékony YPD tápoldatba, majd ismét 12 órán át növesztettük rázó inkubátorban 30 °C-on. Az áltoltás és növesztés folyamatát mégegyszer megismételtük. A kísérletek elvégzése előtt centrifugáltuk a gomba szuszpenziót (5 perc, 3000 g), majd a felülúszó eltávolítása után mostuk 5 ml steril, szobahőmérsékletű 1xPBS-ben (foszfát-pufferelt sóoldat). A mosási lépést még kétszer ismételtük, majd 5 ml 1xPBS oldatban felszuszpendáltuk a gombasejteket, illetve meghatároztuk a gombasejtek koncentrációját Bürker-kamra segítségével.

### 5.3 Sebzési (wound healing) esszé

A HSC-2 és HO-1-N-1 sejtek migrációs aktivitását sebzési (wound healing) esszével vizsgáltuk. Ehhez cellánként  $3 \times 10^5$  db HSC-2 / HO-1-N-1 sejtet osztottunk 6-lyukú lemezekbe. Miután a sejtek egy sejtrétegben konfluensre nőttek a tenyésztőlemez alját, egy P100-as pipettahegy segítségével sebzést húztunk a konfluens sejtrétegbe függőleges és vízszintes irányban, egy keresztet formálva. Általános gomba

stimulusként zimozánt (10 µg/ml koncentrációban) használtunk, amely a *S. cerevisiae*-ből izolált sejtfaalkomponens. *Candida* kezelések esetén hőinaktivált (HI) *C. albicans* vagy *C. parapsilosis*, valamint élő *C. albicans* és *C. parapsilosis* gombasejteket alkalmaztunk. Hőinaktiválás során a gombákat 1xPBS-ben szuszpendálva, 2 órán keresztül 65 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a szuszpenziót centrifugáltuk (5 perc, 3000 g) és a pelletet 1xPBS-ben felsuszpendáltuk. Ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük. HI gombák esetében a tumorsejt:*Candida* (MOI, fertőzendő sejtek és a fertőző ágens aránya) arány 1:10 volt. A kezelést követően a 0. és 24. órában fényképeket készítettünk a kereszt fölött, a kereszt középpontjában és a kereszt alatt, így biztosítva azt, hogy az összes időpontban a mintákról megközelítőleg ugyanabban a pozícióban készüljön felvétel. ImageJ szoftverrel lemértük a sebzés területeit, és az adott kezelési időtartam leteltekor mért területeket a 0. időpontban lement sebzés területére normalizáltuk az alábbi képlet alapján:  $(\text{terület}_{0h} - \text{terület}_{24h}) \times 100 / \text{terület}_{0h}$ .

Élő *C. parapsilosis* sejtekkel történő kezelés esetében a folyamatos gombaproliferáció, valamint *C. albicans* esetében a gyors hifaképződés miatt nem lehetséges a kezelés után 24 óra elteltével készült fényképek elemzése. Emiatt a migráció vizsgálata érdekében time-lapse videót (CytoSMART, Lux2) készítettünk. Ehhez a kísérlethez egy 500 µm vastagságú inszertet helyeztünk egy 24-lyukú lemez aljára, majd kiosztottunk  $1 \times 10^5$  tumorsejtet egy cellába, ezt követően hagytuk, hogy a sejtek a cella alját (az inszertet kivéve) konfluensre nőjék. A következő napon eltávolítottuk az inszertet, majd élő *Candida* (*C. albicans* MOI 400:1; *C. parapsilosis* MOI 1:4) sejtekkel történő kezelés során time-lapse videót készítettünk.

#### 5.4 BrdU ELISA (enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat)

A tumorsejtek proliferációs aktivitását gomba kezelést követően 5-bróm-2-dezoxiuridin (BrdU) nukleozid analóg (amely sejtosztódáskor képes integrálódni a genomba) segítségével határoztuk meg. A kísérlethez kolorimetriás BrdU cell proliferation ELISA kitet (Sigma-Aldrich) használtunk. 96-lyukú lemezekbe 5.000 HSC-2 / HO-1-N-1 sejtet osztottunk cellánként. A sejtosztást követő napon 24 órás zimozán (10 µg/ml), HI-*C. albicans* (MOI 1:10), HI-*C. parapsilosis* (MOI 1:10), élő *C. albicans* (MOI 400:1), valamint *C. parapsilosis* (MOI 1:4) kezelést végeztünk. 24 óra elteltével elvégeztük a BrdU esszét a gyártó utasításai alapján. A kísérletet 1% FBS (EuroClone), 4 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich); 100 U/ml penicillin és 100 U/ml sztreptomycin (Lonza) tartalmú médiumban végeztük.



## 5.5 OSCC sejtek kezelése és feltárása metabolomikai vizsgálatokhoz

A metabolomikai vizsgálatokhoz cellánként  $1,5 \times 10^5$  HSC-2 és HO-1-N-1 OSCC sejtet osztottunk ki 6-lyukú lemezekbe. A sejtosztást követő napon 24 órás zimoján (10  $\mu\text{g/ml}$ ) és HI-*C. albicans* (MOI 1:10), valamint HI-*C. parapsilosis* (MOI 1:10) kezelést végeztünk. Amikor a sejtek központi metabolizmusának tagjait szeretnénk mérni fontos a médium eltávolítása, hogy az innen származó metabolitok ne kerüljenek az extraktumba. Ennek esélyét jelentősen csökkenthetjük egy mosási lépés beiktatásával<sup>160</sup>. A PBS általánosan használt mosási eljárásokhoz, ebben az esetben azonban inkább a fiziológiás sóoldat használata ajánlott, ugyanis a PBS foszfátcsoportot tartalmazó vegyületek elbomlásához, így metabolitvesztéshez vezet. Letapadó sejtek szuszpenzióba viteléhez használt tripszinezési eljárás szintén metabolitvesztést okoz, ezért biztonságosabb a sejtkaparó használata<sup>161</sup>. A médium eltávolítását követően a tumorsejteket 37 °C-os fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl, HPLC tisztaságú desztillált víz) mostuk kétszer, majd 500  $\mu\text{l}$  -20 °C-on előhűtött feltáró oldatot (metanol és HPLC tisztaságú desztillált víz 4:6 v/v arányú elegye) mértünk az egyes cellákba. Ezt követően sejtkaparóval felkapartuk a tumorsejteket (250 mm hossz, 20 mm lapátszélesség). Ezután a felkapart sejtsuszpenziót mikrocentrifuga csövekbe helyeztük, majd jeges vízben ultrahangos kezelést (5 perc, 23kHz) végeztünk. A szonikált mintákat 15 másodpercig kevertük kémcsőrázó segítségével, majd centrifugáltuk (10 perc, 4 °C, 13.800 g). A felülúszót -80 °C-on tároltuk további felhasználásig.

Az élő gombasejtekkel történő kezelés esetében más protokollt kellett alkalmaznunk. Mivel a *C. parapsilosis* valódi hifát nem képez<sup>162</sup> és a médiumban élesztő formában, szabadon van jelen, a médiumot eltávolítva, majd a tumorsejteket átmosva a gombát is el tudtuk távolítani a tumorsejtekről. A *C. albicans* ezzel szemben valódi hifát<sup>163</sup> és letapadó telepeket képez a tumorsejt rétegen, amit nem tudunk anélkül eltávolítani, hogy jelentős tumorsejt veszteséget okoznánk. Ezért olyan sejtfeltérési protokoll kidolgozására volt szükség, amivel a gombasejtek feltárása nélkül voltunk képesek kivonni a tumorsejtek metabolitjait mechanikai behatás nélkül. A kidolgozott protokoll alapján cellánként  $1,5 \times 10^5$  OSCC sejtet osztottunk 6-lyukú lemezekbe. Négy óra elteltével a tumorsejtek teljesen letapadtak a lemez aljára, ezért a sejtosztás után 4 órával 24 órás élő *C. albicans* (MOI 400:1) és *C. parapsilosis* (MOI 1:4) kezelést végeztünk. A kezelés letelte után a médium eltávolítását követően gyorsan mostuk a sejteket kétszer 1 ml 37 °C-os, HPLC tisztaságú desztillált vízzel, majd 500  $\mu\text{l}$  -20 °C-

on előhűtött, HPLC tisztaságú desztillált vizet mértünk rá. A sejteket 15 percig inkubáltuk jégen, ezt követően pedig a vizet leszívtuk a sejtekről, centrifugáltuk a mintát 10 percig, 13.800 g-n, 4 °C-on, majd a felülúszót -80 °C-on tároltuk további felhasználásig. A jéghideg desztillált vízben ozmotikus sokkot szenvednek el a tumorsejtek, a beáramló víz miatt a sejtmembrán degradálódik, szétesik a sejt. Ezzel szemben a *Candida* gombák sejtfaluknak köszönhetően rezisztensek az ozmotikus sokkra, így az élő gombákból nem szabadul fel metabolit, amely befolyásolná a mérési eredményeket<sup>164</sup>.

## **5.6 Metabolitok nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometriás (HPLC-HRMS) analízise**

A vizsgált metabolitok mennyiségét HPLC-HRMS készülék segítségével határoztuk meg. A készülék egy Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) típusú HPLC-ből és egy Q Exactive Plus (Thermo Scientific) tömegspektrométerből állt. A mérések során az alkalmazott eluensek az alábbiak voltak: (A) víz+0,1% ecetsav, (B) metanol+0,1% ecetsav. Az áramlási sebesség 0,2 ml/perc volt, míg az alkalmazott gradiens az alábbi volt: (B) 0 perc – 20%, 2 perc – 20%, 4 perc – 30%, 6 perc – 95%, 9 perc – 95%, 9,5 perc – 20% és 15 perc 20%. A mérésekhez Synergi Polar-RP (Phenomenex) 250 mm hosszúságú és 3 mm szélességű, 4 µm szemcseátmérőjű kromatográfiás oszlopot alkalmaztunk. Az oszloptermosztát hőmérséklete 30 °C, míg az injektálások térfogata 5 µl volt. Az automata mintaadagoló hőmérséklete 4 °C volt. A HRMS fűtött elektroporlasztásos ionforrással (HESI) rendelkezett. A mérések során párhuzamos reakció pásztázás (PRM) üzemmódot alkalmaztunk. A mérések során a spray feszültség 4 kV volt pozitív, -3 kV negatív ionizációs módban. A porlasztó gáz áramlási sebessége 30, a kísérő gáz áramlási sebessége 15 készülékre jellemző egység volt. A kísérő gáz hőmérséklete 250 °C, míg az iontovábbító kapilláris hőmérséklete 250 °C volt. A kvadрупól izolációs ablaka 0,4  $m/z$  volt, míg a felbontás 35.000 ( $m/z=200$ ). A vizsgált prekursorok tömegét, a fragmens ionok tömegét, az adott átmenetre jellemző polaritást, az adott komponens retenciós idejét, fragmentációs energiáját, illetve az adott komponensre jellemző kimutatási alsó határt (LLOQ) az 1. melléklet tartalmazza. A vizsgált komponensek mennyiségi meghatározásához hétszintű kalibrációs oldatsorozatot készítettünk extrakciós oldószerben 5-5000 ng/ml koncentráció tartományban. A kalibrációs oldatok 250 ng/ml koncentrációban

tartalmaztak belső sztenderdet, amely minden esetben tienil-alanin volt. Végül a kapott koncentráció értékeket a kontroll mintákhoz hasonlítottuk.

## 5.7 Mátrix metalloproteináz esszé

A mátrix metalloproteinázok (MMP) aktivitásának méréséhez MMP activity Assay Kitet (Abcam) használtunk a gyártó utasításait követve. A kísérlethez  $3 \times 10^5$  OSCC sejtet osztottunk ki T25-ös sejtenyésztő edénybe. A sejtosztást követő napon 24 órás zimoján ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), HI-*C. albicans* (MOI 1:10), HI-*C. parapsilosis* (MOI 1:10, élő *C. albicans* (MOI 400:1), valamint *C. parapsilosis* (MOI 1:4) kezelést végeztünk 4 ml szérumentes médiumban. A kezelést követően a médiumot centrifugáltuk (5 perc, 3000 g), majd ezt követően a 4 ml felülúszót kb.  $200 \mu\text{l}$  térfogatra töményítettük centrifugálással (25 perc, 7.500 g) 3 kDa pórusátmérőjű szűrős centrifugacső segítségével (Amicon Ultra-4). A mintákat a töményítést követően molekuláris tisztaságú desztillált vízzel (Lonza) kiegészítettük, hogy térfogatuk azonos legyen. Ezután mértük az MMP-k aktivitását fluoreszcens mikrolemez olvasó segítségével ( $\text{Ex/Em} = 490/525 \text{ nm}$ ).

## 5.8 Totál RNS izolálás az OSCC sejtek *in vitro* mintáiból

A transzkriptomikai és qPCR vizsgálatokhoz totál RNS-t izoláltunk a tumorsejtekből különböző gombakezeléseket követően. Ehhez cellánként  $1 \times 10^5$  HSC-2 és HO-1-N-1 sejtet osztottunk ki 24-lyukú lemezekbe. A sejtosztás után 12 órával 12 órás zimoján ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), HI-*C. albicans* (MOI 1:10), HI-*C. parapsilosis* (MOI 1:10), élő *C. albicans* (MOI 25:1), valamint *C. parapsilosis* (MOI 1:4) kezelést végeztünk. A kezelést követően két mosási lépés után (1xPBS) totál RNS kivonást végeztünk a tumorsejtekből RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításait követve. A *C. albicans* letapadó telepeket képez a tumorsejt rétegen, azonban a kitben lévő sejtfeltárási oldat nem képes a gomba sejtfalat lizálni, így nem került a mintába gomba eredetű RNS. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét Bioanalyzer műszerrel (Agilent) vizsgáltuk.

## 5.9 RNS szekvenálás

Az mRNS szekvenálási könyvtár készítését a Novogene Szolgáltató Bt. végezte az Illumina® platformokhoz használt NEBNext® Ultra TM RNA Library Prep Kit (NEB, USA) segítségével a gyártó utasításait használva. Az mRNS minták

tisztításához poly-T oligo-csatolt mágneses gyöngyöket használtak, majd a méret alapján elkülönített cDNS szintézist végeztek Ampure XP rendszer segítségével (Beckman Coulter, Beverly, USA). A szekvenálást NovaSeq S4 platformon végezték.

## 5.10 Transzkriptóm analízis

Az RNS minták szekvenálása mellett a Novogene Szolgáltató Bt. elvégezte a szekvencia fájlok feldolgozását is, azonban az *in vivo* minták esetében saját protokoll alapján újra elemeztük a nyers adatokat. A Novogene protokollja alapján az indító szekvenciákkal nagymértékben szennyezett, nagyarányú téves vagy bizonytalan bázist ( $N > 10\%$ ) tartalmazó és / vagy alacsony minőségben beolvasott szekvenciákat a fastp programcsomag segítségével szűrték ki. A minőségi vágáson átesett olvasatokat ezután az indexelt referencia humán genomhoz (GRCh38) illesztették a bowtie algoritmust használó, HISAT2 csomag segítségével; az illesztéshez a '--dta' (=downstream-transcriptome assembly) és '-phred33' paramétereket adták meg, melyek az RNS szekvenciák illesztéséhez optimalizált assembler használatát, illetve az illesztés minőség szerinti szűrését jelölik ki. Az illesztés alapján az egyes génekre térképeződő fragmentumok mennyiségét az *in vitro* minták esetén az exonhosszhoz és a teljes minta mennyiséghez normalizált RPKM (lefedettségi érték) értékeként adták meg, míg az *in vivo* minták esetén a nyers 'Readcount' értékekkel dolgoztunk. Ehhez az előbbi esetén a 'Featurecounts', míg az utóbbi esetben a 'GenomicAlignments' programcsomagokat használtuk fel. A differenciál génexpresszió analízisét a DeSeq2 programcsomag segítségével végeztük. Az egyes fragmentumok normalizált vagy számszerű mennyisége alapján a differenciálexpressziót logaritmikus Fold Change (LFC) skálán adtuk meg. A vizsgálatokhoz minden extrém alacsony kifejeződésű ('count' vagy 'RPKM'  $< 1$  ppm) gént elvetettünk. A protokoll során nyert génlistában azon géneket rendeltük a differenciálisan expresszált gének (DEG) közé, melyek esetén az LFC abszolút értéke nagyobb volt, mint 1 ( $|LFC| > 1$ ) és a korrigált p-érték  $< 0,05$ . A fals pozitív találatok arányának csökkentése érdekében a legszigorúbb Benjamin & Hochberg módszert alkalmaztuk a statisztikai szignifikancia kiszámításához.

## 5.11 Génkapcsolatok vizsgálata az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) szoftver segítségével

Az IPA szoftver használatát Prof. Dr. Horváth Péter és a Finnországi Molekuláris Orvostudományi Intézet (FIMM) tette lehetővé, akik vendég

felhasználóként biztosítottak hozzáférést a szoftverhez. Az IPA-ban futó ok-okozat elemző algoritmusok háttérében a Qiagen Bioinformatics munkatársai által manuálisan frissített és kezelt Ingenuity Tudástár áll, amely közel 5 millió különböző korábbi kísérleti kontextusból származó, az orvosbiológiai irodalomban közölt, illetve külső felek adatbázisaiból integrált megfigyelések strukturált gyűjteménye<sup>165</sup>. A kutatás során az IPA-ban rendelkezésünkre álló mind a négy algoritmust használtuk: (1) Az Upstream szabályozó analízis (URA) képes azon valószínűsíthető upstream szabályozók azonosítására, amelyek közvetlenül vagy közvetve hatnak a mérés során megfigyelt megváltozott expressziójú génekre; (2) Mechanisztikus hálózatok (MN) az URA-ra építve összekapcsolja a valószínű szabályozókat közös hipotetikus szabályozó hálózatok vagy mechanizmusok részeként; (3) a kauzális hálózati elemzés (CNA) az URA általánosítása, amely a mérés során kapott génhalmazra illeszti az átfedő szabályozó hálózatokat, és az összes ezen hálózatokban szereplő eleme között lévő irányított kapcsolat figyelembevételével megjósolja a változást kiváltó feltételezett forrásokat; és (4) a downstream effekt analízis (DEA), amely szintén az URA módszertanát alkalmazza a megfigyelt változások biológiai funkciókra és betegségekre gyakorolt hatásának vizsgálatához. Az elemzések során használt két legfontosabb szignifikancia paraméter az átfedő p-érték, amely a megfigyelt és megjósolt szabályozott génhalmazok átfedése alapján határozza az adott statisztikai szignifikanciát, és egy aktivációs Z-érték, amely a megfigyelt és megjósolt over / down-regulációs mintázatok egyezésétől függően jósolja meg a szabályozás irányultságát<sup>166</sup>. A kísérletek során a p-érték < 0,05 kitételnek megfelelő szignalizációs útvonalakat, fehérje-fehérje és gén-gén kapcsolatokat és biológiai funkciókat tekintettük szignifikáns találatoknak. A molekulák közötti kapcsolatok esetén további kitételként szabtuk meg, hogy csak korábbi kutatásokban bizonyított kapcsolatokat vettünk számításba.

## **5.12 cDNS szintézis és qPCR a szekvenálási adatok validálásához**

A cDNS szintézishez RevertAid First strand cDNA synthesis kitet (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint. A szintézishez 1 µg totál RNS-t alkalmaztunk. Egy reakció során 0,5 µl oligo(dT)<sub>18</sub> és 0,5 µl random hexamer primert használtunk. Az alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak: 25 °C/5 perc, 42 °C/60 perc és végül 70 °C/5 perc. A qPCR során Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A qPCR-hez 10x-es hígított cDNS mintákat és 300 nM koncentrációjú specifikus primereket

alkalmaztunk. A primer szekvenciákat a 2. melléklet tartalmazza. A méréseket CFX96™ Real-Time System detektorral felszerelt C1000™ Thermal Cycler készülék (Bio-Rad) segítségével végeztük az alábbi program szerint: 1. elődenaturáció (95 °C, 3 perc); 2. denaturáció (95 °C, 10 mp.); 3. annealing-elongáció (60 °C, 30 mp.); 4. olvadási görbe analízis (65 °C-ról 95 °C-ra, 0,5 °C/5 mp.). A program a 2-3. lépéseket 40-szer ismételte. Az eredményeket a 2- $\Delta\Delta C_t$  módszer segítségével értékeltük ki.

### 5.13 MMP10 és MMP1 fehérjék Western blot analízise

A kísérlethez  $8 \times 10^5$  HSC-2 sejtet osztottunk 10 cm-es Petri-csészébe. A következő napon élő *C. albicans*szal (MOI: 400:1, 1600:1) és *C. parapsilosis*szal (MOI: 1:4) kezeltük a tumorsejteket 24 órán keresztül. A tumorsejteket a kezelést követően mostuk 1xPBS-ben, sejtkaparó segítségével felkapartuk, majd centrifugáltuk (900 g, 10 perc). A sejtpelletet 50 mM Tris, 2 mM EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav), 50 mM nátrium-kloridot, 0,5 mM dithiothreitol és proteáz inhibitor koktélt (cOmplete; Roche) tartalmazó lízispufferben felfuszpendáltuk. A sejtek feltárását mechanikai úton végeztük azáltal, hogy ötször folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felolvasztottuk. Ezt követően lecentrifugáltuk a mintát (16.000 g, 10 perc), majd a fehérjéket tartalmazó felülúszót használtuk az analízishez. A minta fehérjekoncentrációját Bradford reagens (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításait követve. Ezután 30  $\mu$ g fehérjét tartalmazó mennyiséget forraltunk 10 percig „loading” pufferben (60 mM Tris [pH 6.8], 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 10% glicerol, 5% b-merkaptoetanol, 0,002% brómfenolkék), majd 10%-os SDS-agaróz gélre vittük a mintát. A fehérje elválasztást (120 V, 90 perc) követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át (200 mA, 90 perc), majd blokkolást végeztünk a membránon 5%-os BSA (borjú szérum albumin, Sigma) és 0,005% Tween-t (TBS-T) tartalmazó Tris pufferelt sóoldatban. Az MMP1 és MMP10 fehérjék detektálásához anti-MMP1 (ab137332, nyúl poliklonális antitest, 1:3000, Abcam) és anti-MMP10 (ab261733, nyúl poliklonális antitest, 1:1000, Abcam) 1%-os BSA-TBS-T-ben oldott antitestekkel inkubáltuk a membránt egy éjszakán keresztül. „Loading” kontrollként GAPDH antitestet (G8795; egér monoklonális antitest, 1:3000, Merck) használtunk. Az inkubációt követő napon háromszor mostuk a membránt TBS-T oldatban, majd torma peroxidázzal (HRP) konjugáltatott kecske anti-nyúl (Dako) másodlagos antitestet (MMP1 - 1:6000, MMP2 - 1:2000) tartalmazó TBS-T oldatban inkubáltuk egy éjszakán át. A GAPDH nyúl anti-

egér másodlagos antitestet (Dako) 1:6000 arányú hígításban alkalmaztuk. A kemilumineszcens jelet ECL (fokozott kemilumineszcencia) reagenssel hoztuk létre (Millipore) a gyártó utasításai alapján, majd a jelet C-Digit blot szkennert (LI-COR) segítségével detektáltuk.

#### **5.14 Egér xenograft modell kidolgozása az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához**

Az *in vivo* kísérletek a Csongrád-Csanád Megyei Kormányhivatal Agrárügyi- és Környezetvédelmi Főosztály Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztálya által engedélyezett kísérleti protokoll alapján valósultak meg. Engedély száma: XXIX./4061/2020.

##### **5.14.1 Egerek elhelyezésének, tartásának körülményei**

Az állatokat IVC (Individually Ventilated Cages – egyedileg szellőztetett ketrec) rendszerű, zárt, sterilizált ketrecekben (325x210x180 mm) tartottuk. A több, mint 680 cm<sup>2</sup> alapterületű ketrecekben 5-6 állat volt elhelyezve, így egyedenként több, mint 110 cm<sup>2</sup> alapterület volt biztosítva. *Ad libitum* biztosítottuk a pH kontrollált, sterilizált (autoklávozott), 100 U/ml penicillin és 100 U/ml sztreptomicin (Lonza) antibiotikummal kiegészített ivóvizet, valamint autoklávozott, standard, granulált, kemény rágcsáló tápot (Akronom VRF1 típusú hőstabil, vitaminnal kiegészített granulált táp), amely biztosítja a foguk megfelelő mértékű koptatását. A ketrecekben környezetgazdagító eszközöket helyeztünk el (állandó jelleggel papírguriga, rágható faeszközök, fészekanyagok, valamint időszakos jelleggel sterilizált rágcsálókerék). Az állatházban 2 UVC germicid lámpát állítottunk fel, így biztosítva a megfelelő levegő minőséget, az állatok vizeletéből származó ammónia mennyiségét pedig elszívó rendszer segítségével igyekeztünk alacsonyan tartani. Az állatházban a hőmérsékletet egy központilag vezérelt automatikus klímarendszer segítségével tartottuk állandó értéken ( $25 \pm 2$  °C), a fény/sötét ciklus beállítása pedig 12 óra volt. Ezenfelül az egyedileg szellőztetett ketrecrendszer központi egységén az egereknek megfelelő  $55 \pm 10\%$  relatív páratartalom volt beállítva.

##### **5.14.2 Vad típusú egerek immunszuppresszállása**

Az immunszuppresszió kiváltásához Solis és Filler (2012) által közölt protokollt<sup>117</sup> módosítottuk. A kortizon-acetát liofilizált formában érkezett, így az

immunszuppresszáls előtti napon készítettük el a szuszpenziót. Mivel a kortizon-acetát nem oldódik vízben, ezért felületaktív Tween 80 segítségével egy homogén szuszpenziót készítettünk. 12 ml hideg (4 °C) 0,9%-os NaCl oldat (fiziológiás sóoldat) és 0,05V/V% Tween 80 keverékében szuszpendáltunk 250 mg kortizon-acetátot, amelyet 5-10 percen keresztül kémcsőrázó segítségével kevertünk. Ezután felhasználásig -80 °C-os hűtőben tároltuk a kiadagolt szuszpenziókat. Nem használtunk bódítást az immunszuppresszáns beadásához, a kezünkkel immobilizáltuk az állatokat, és sterilizált (autoklávozott) 38x22G méretű gyomorszonda segítségével naponta 225 mg/ttkg (ez az állatok testtömegétől függően nagyjából 200 µl) kortizon-acetátot adagoltunk szuszpenzió formájában *per os* 5 napon keresztül. Egy alkalommal (6. nap) az oropharyngealis candidiasis előidézése utáni napon térfogatmentes, 29G méretű tű segítségével intraperitoneálisan szintén 200 µl végtérfogatban adagoltunk az állatoknak a kortizon-acetátot. Ezt követően már nem adtunk be immunszuppresszánt, mivel intraperitoneálisan adagolva hosszabb ideig hat.

#### **5.14.3 Egereken elvégzett beavatkozások**

A kísérlethez 6-8 hetes, vad típusú beltenyésztett (inbred) BALB/C nőstény egereket használtunk. A kísérletek során az egereket több csoportba osztottuk, így az első az abszolút kontroll csoport, az ide tartozó egereken nem végeztünk semmilyen beavatkozást, csak 200 µl 0,05V/V% Tween 80-at tartalmazó fiziológiás sóoldatot („vehicle” kontroll) adagoltunk naponta *per os*. A második csoporton immunszuppressziót alkalmaztunk a fent leírt módon, valamint tumorinjektálást végeztünk (OSCC xenograft). A harmadik csoport egerei immunszuppresszió, tumorinjektáláson és orális candidiasison estek át (OC-OSCC xenograft).

#### **5.14.4 Egerek érzéstelenítése**

A HSC-2 tumorsejtek nyelvbe történő beinjektálásához és az orális candidiasis előidézéséhez szükséges volt az egerek érzéstelenítése, amelyet izoflurán segítségével valósítottunk meg (VetEquip, Isofluotek 1000 mg/g, kezdeti: 4%, fenntartó altatás: 1,5%). A beavatkozás után közvetlenül tiszta oxigén inhalálásával felébresztettük és visszahelyeztük a ketrecükbe, majd egy órán keresztül megfigyelés alatt tartottuk őket.



#### **5.14.5 HSC-2 szájüregi laphámsejtes karcinóma sejtek egér nyelvbe történő injektálása**

A xenograft kialakításához a humán eredetű HSC-2 sejtvonalat használtuk.  $1 \times 10^6$  sejtet injektáltunk szérumentes médiumban az állatok nyelvébe. A szuszpenzió 10% Matrigélt (Corning) tartalmazott, amely a tumorsejtek megtapadását segíti elő az egér nyelvén. A Matrigélt a xenograft kialakítása előtti este jégbe tettük, és áthelyeztük 4 °C-os hűtőbe egészen felhasználásig (másnap), mert az 0 °C-on folyékony halmazállapotú. Az érzéstelenített állat nyelvét csipesz segítségével rögzítettük, majd a nyelvű bal oldalának szubmukózájába 50  $\mu$ l végtérfogatban HSC-2 sejteket injektáltunk 29G térfogatmentes fecskendő segítségével.

#### **5.14.6 Orális candidiasis előidézése**

Az orális candidiasis előidézéséhez Solis és Filler (2012) módosított protokollját<sup>117</sup> használtuk a tumorinjektálást követő 3. napon. Az orális candidiasis előidézéséhez a *C. albicans* SC5314 törzset használtuk. Első lépésként preinokulumot készítettünk 5 ml folyékony YPD-ben, ezt rázó inkubátorban 30 °C-on, 12 órán át növesztettük. Az inkubációs idő letelte után 50  $\mu$ l-t átoltottunk 5 ml friss YPD-be, és visszahelyeztük a rázó inkubátorba újabb 12 órára. Az átoltsást még kétszer megismételtük. Az orális candidiasis napján a felnövesztett gombákat 13.000 g-n 5 percig centrifugáltuk. Ezután a felülúszót leöntöttük, majd a pelletet steril 1xPBS-sel reszuszpendáltuk és centrifugáltuk. Ezt a folyamatot 2x ismételtük. Az utolsó centrifugálási lépés után a sejteket steril HBSS-ben (Hanks kiegyensúlyozott sóoldat – Hank's Balanced Salt Solution) szuszpendáltuk fel, 5 ml végtérfogatban  $1 \times 10^9$  sejt/ml koncentrációjú gombaszuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük 10-15 percre. Ezután steril kalcium-alginát vattapamacsokat helyeztünk a szuszpenzióba körülbelül 5 percig. Miután megbizonyosodtunk az egerek egészségi állapotáról és megmértük a tömegüket, a fent leírt módszerrel érzéstelenítettük őket. Ezután csipesz segítségével a gombaszuszpenzióval átitatott steril vattákat az egerek nyelve alá helyeztük, majd 75 perc elteltével kivettük. A szuszpenzióval átitatott vattát fél óránként cseréltük, ezzel elkerülve a vatta kiszáradását. Az OSCC xenograft csoport (nincs orális candidiasis csak tumorinjektálás) nyelve alá HBSS-sel átitatott vatták kerültek. A 75 perc letelte után kivettük az egerek nyelve alól a vattát, és felébresztettük az állatokat, ezután 1 órán át megfigyelés alatt voltak.

#### **5.14.7 *Orális candidiasis előidézés sikerességének ellenőrzése***

Az állatok eutanáziáját követően 70%-os etanollal sterilizált olló segítségével bemetszést ejtettünk az állat szájának két oldalán, majd ezt követően a nyelvet csipesz segítségével rögzítettük, és a nyelv proximális részénél (nyelvtő) való metszés révén eltávolítottuk az állatból. Ezután a nyelv tömegét lemértük, majd 3 ml PBS-ben szövet homogenizátor segítségével homogenizáltuk. Ezután a tömény homogenizátumból készítettünk egy 10x-es hígítást, és a tömény, valamint a 10x hígítású homogenizátumból 50-50 µl-t kiszélesztettünk YPD-agar lemezekre. Ezután a lemezeket 48 órára 30 °C-os inkubátorba helyeztük, majd a táptalajon megjelenő kolónia formáló egységek (CFU) száma alapján megállapítottuk, hogy mennyi gomba penetrált a nyelv szövetébe.

A sikeres orális candidiasis előidézését hisztopatológiai felvételek készítésével is ellenőriztük, melyhez hematoxin-eozin (H&E) és PAS (perjód-sav-Schiff reakció) festést alkalmaztunk.

#### **5.14.8 *Egerek monitorozása és a kíméletes végpont***

Az egereket naponta monitoroztuk, hogy milyen tüneteket mutatnak a beavatkozások következtében. Ilyen a testtömegvesztés, remegés, csökkent/megnövekedett mozgékonyosság, felborzolt szőrzet. Az egereket a protokoll 8. napján termináltuk, kíméletes végpont alapján, mivel elérték a 25%-os súlyvesztést. Az egerek terminálásához 400 mg/kg klorál-hidrát bódítást, majd ezután a nyak ízületének kiízesítését alkalmaztuk.

#### **5.14.9 *RNS kivonása a xenograft tumor mintákból***

Az állatokból kimetszettük a nyelvet, és 70%-os etanollal fertőtlenített szike segítségével megtisztítottuk a nyelv szövetétől a tumort. A megtisztított tumort homogenizáltuk Bioneer (KA-7030) eszköz segítségével, majd az RNS izolálásához Qiagen RNeasy Plus Mini Kitet használtunk, és a mellékelt gyártói utasításokat követve elvégeztük az RNS izolálást. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét Bioanalyzer műszerrel (Agilent) vizsgáltuk.

#### **5.14.10 *Hisztopatológiai festés***

Az állatokból kimetszettük a nyelvet, majd szobahőmérsékleten 4%-os formalinban fixáltuk. A fixált mintákból szövetmetszeteket készítettünk, majd

hagyományos H&E és PAS festést végeztünk, ezenkívül a vimentin, E-cadherin és a p63 immunhisztokémiai festését is elvégeztük. Az E-cadherin festéshez sztenderd immunhisztokémiai festést alkalmaztunk nyúlban termeltetett monoklonális elsődleges antitest használatával (1:200, EP700Y, Cellmarque). Vimentin festés esetén nyúlban termeltetett monoklonális ellenanyagot (1:300, SP20, Cellmarque), míg a p63 festés esetében egérben termeltetett monoklonális ellenanyagot (1:100, DBR16.1, Hisztopatológia Kft., Pécs, Magyarország) használtunk. Az antigén feltárást Epitope retrieval (ER) 2 oldattal (Leica, pH 9) végeztük. Az elsődleges antitestek inkubációs ideje 20 perc volt. A festést immunhisztokémiai festőautomatával (platform: Bond-Max, Leica), Bond Polymer Refine Detection (Leica) jelölőrendszerrel végeztük. Ezután fényképeket készítettünk a mintákról BX51 OLYMPUS vagy Zeiss Imager Z1 mikroszkóp segítségével.

### **5.15 Statisztikai analízis**

A statisztikai számításokat a GraphPad PRISM 7 szoftverrel végeztük. Mindegyik kísérletet legalább három alkalommal ismételtük. Mindegyik ismétlés kezelés eredményeit a saját kontroll eredményéhez normalizáltuk amikor szükséges volt, majd a normalizált adatokon végeztük a statisztikai analízist. Párosított vagy párosítatlan t-tesztet alkalmaztunk a szignifikancia megállapításához. A statisztikai szignifikancia kiszámításához használt tesztet az adott ábraalírás tartalmazza. Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha  $p < 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

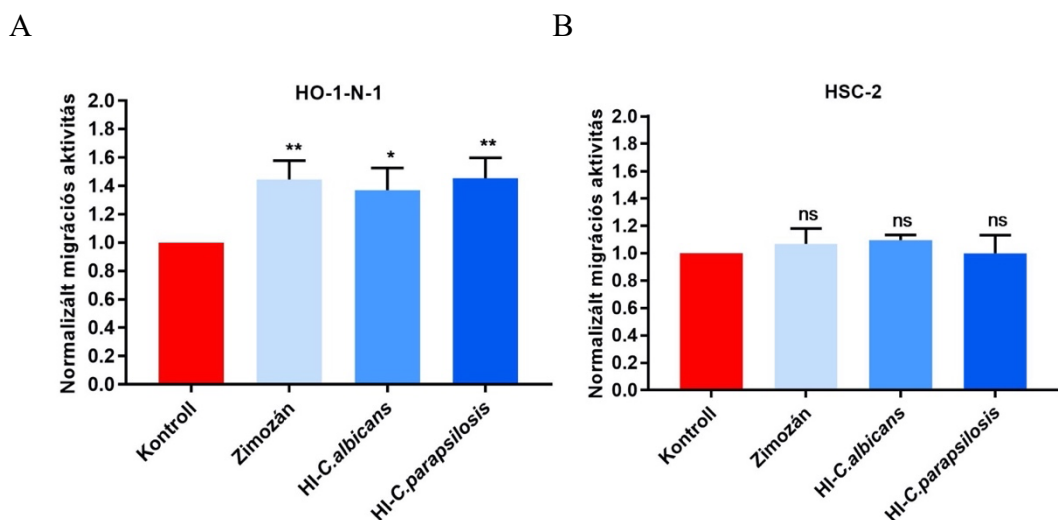
## 6 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 6.1 Hőinaktivált gombák és zimoján OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata

#### 6.1.1 A hőinaktivált gombák, valamint a zimoján hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira

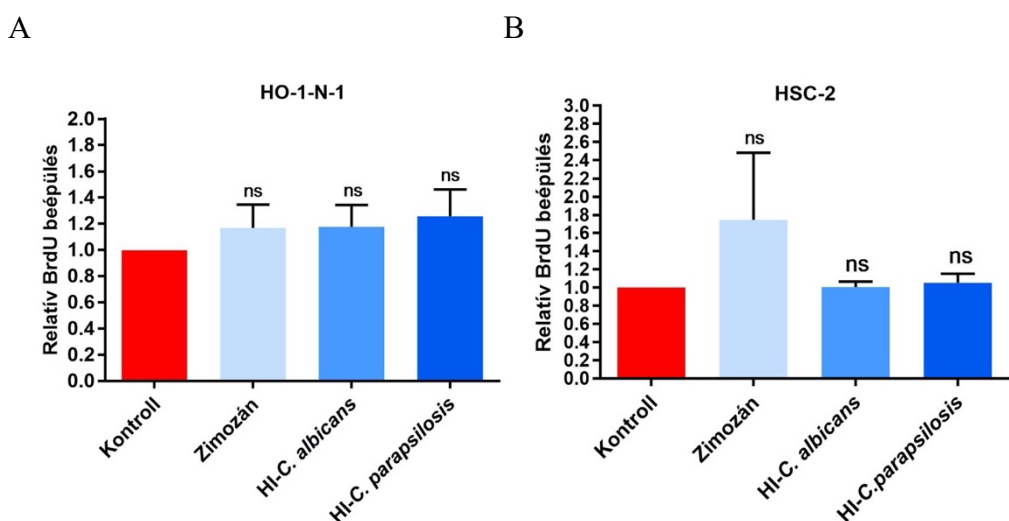
Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, milyen hatást gyakorol a szájüregi laphámsejtes karcinóma progressziójára a megemelkedett gombamennyiség, első lépésben HSC-2 és HO-1-N-1 OSCC sejteket kezeltünk HI-*C. albicans*szal, HI-*C. parapsilosis*szal, illetve zimojával. A zimoját – a *S. cerevisiae* egyik sejtfalkomponense – általános gombastimulusként használtuk. A HI-*Candida* gombák és a zimoján kezelés alkalmas az OSCC sejtek és a gomba sejtfalkomponensei között létrejövő direkt kapcsolat vizsgálatára.

Elsőként sebzési (wound healing) esszével vizsgáltuk az OSCC sejtek migrációs aktivitását a különböző gombastimulusok jelenlétében. A HO-1-N-1 sejtvonal esetében szignifikánsan megemelkedett migrációs aktivitást detektáltunk mindegyik stimulus hatására a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (zimoján:  $1,445 \pm 0,076$ ; HI-*C. albicans*:  $1,369 \pm 0,09$ ; HI-*C. parapsilosis*:  $1,454 \pm 0,083$ ) (10. A ábra). Ezzel ellentétben a HSC-2 sejtvonal esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást egyik gombakezelés hatására sem (10. B ábra).



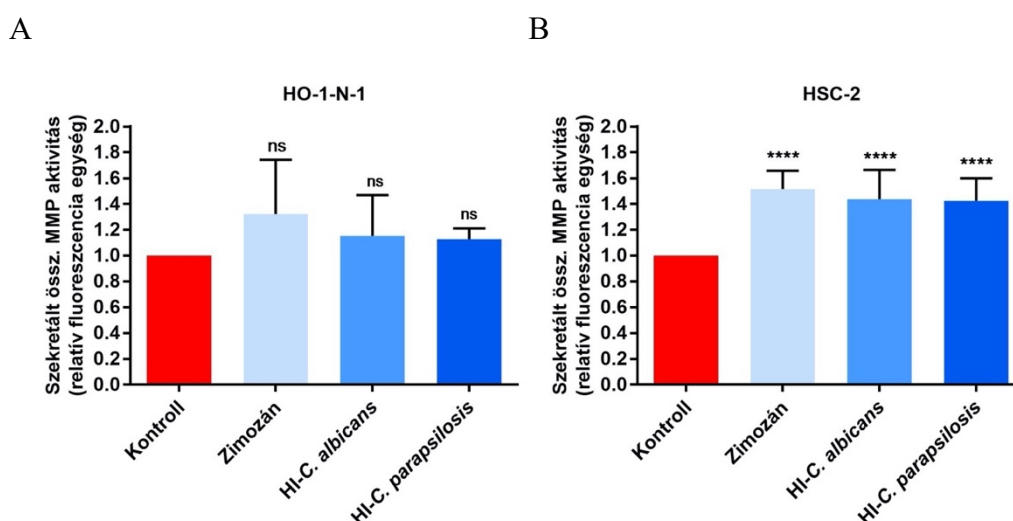
**10. ábra:** Hőinaktivált *Candida* sejtek, valamint zimozán hatása az OSCC sejtek migrációs aktivitására. (A) HO-1-N-1 sejtek kontrollra normalizált migrációs aktivitása. (B) HSC-2 sejtek kontrollra normalizált migrációs aktivitása.  $n=3$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ), ns=nem szignifikáns.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, változik-e az OSCC sejtek proliferációs aktivitása a gombastimulusok jelenlétében BrdU esszé végeztünk. A BrdU esszé alapján elmondható, hogy a HI-*Candidák* valamint a zimozán jelenléte nem befolyásolja a HSC-2 és HO-1-N-1 sejtek proliferációs aktivitását (11. A, B ábra).



**11. ábra:** Hőinaktivált *Candida* sejtek, valamint a zimozán hatása az OSCC sejtek proliferációs aktivitására. (A) HO-1-N-1 sejtek relatív proliferációs aktivitása. (B) HSC-2 sejtek relatív proliferációs aktivitása.  $n=3$ , párosítatlan t-próba, ns=nem szignifikáns.

A tumorsejtek egyik kritikus képessége a különböző környezethez való alkalmazkodásban a tumorszövetet körülvevő extracelluláris mátrix módosítása. Ebben a folyamatban legnagyobb mértékben a különböző proteázok (szerin-, cisztein-, treonin-, aszpartát-, illetve metalloproteinázok) vesznek részt. Így bizonyos mátrix metalloproteinázok (MMP-k) kulcsszerepet játszanak a tumor invazív folyamataiban, illetve a metasztázisban<sup>167</sup>. Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a gombák jelenléte befolyásolja-e az OSCC sejtek szekretált MMP aktivitását, szekretált MMP aktivitási vizsgálatokat végeztünk. A HSC-2 sejtvonal esetében mindegyik alkalmazott kezelés hatására megemelkedett a szekretált MMP-k aktivitása a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (zimoán:  $1,516 \pm 0,041$ ; HI-C. *albicans*:  $1,437 \pm 0,065$ ; HI-C. *parapsilosis*:  $1,426 \pm 0,057$ ) (12. B ábra). A HO-1-N-1 sejtvonal esetében nem volt detektálható szignifikáns változás (12. A ábra).

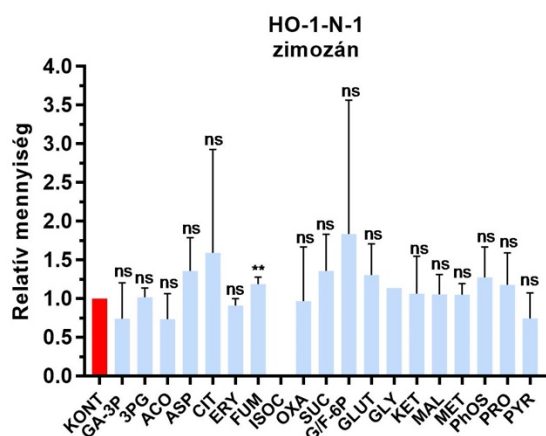


**12. ábra:** Hőinaktivált *Candida* sejtek, valamint zimoán hatása az OSCC sejtek szekretált összes MMP aktivitására. (A) HO-1-N-1 sejtek relatív összes MMP aktivitása. (B) HSC-2 sejtek relatív összes MMP aktivitása.  $n=4$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns.

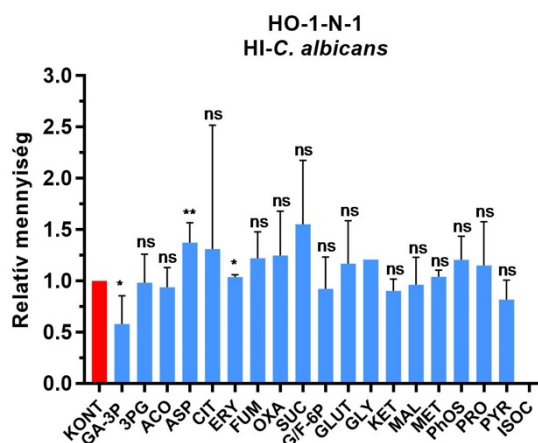
Egyre több tanulmány számol be arról, hogy a tumorsejtek által termelt metabolitoknak szerepe van a metasztatikus folyamatokban azáltal, hogy befolyásolják az epiteliális-mezenchimális tranzíciót (EMT), valamint a keringésben lévő tumorsejtek túlélését<sup>168</sup>. Megvizsgáltuk, hogy a gombák jelenléte hogyan befolyásolja a tumorsejtek szekretált metabolikus aktivitását. A glikolízis és trikarbonsav ciklus (TCA ciklus) intermediereit, valamint különböző aminosavak változásait elemeztük HPLC-HRMS-sel.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a HO-1-N-1 sejtvonala esetében szignifikáns változás történt a fumarát ( $1,189 \pm 0,044$ ) termelésben zimozán kezelés hatására (13. A ábra). HI-*C. albicans* kezelés hatására szignifikánsan változott a glicerinaldehid-3-foszfát ( $0,580 \pm 0,137$ ), aszpartát ( $1,374 \pm 0,096$ ) és az eritróz-4-foszfát ( $1,039 \pm 0,015$ ) mennyisége (13. B ábra). HI-*C. parapsilosis* kezelést követően az oxálacetát ( $1,463 \pm 0,214$ ), szukcinát ( $1,586 \pm 0,199$ ) és a glükóz/fruktóz-6-foszfát ( $1,317 \pm 0,118$ ) mennyisége változott szignifikánsan (13. C ábra).

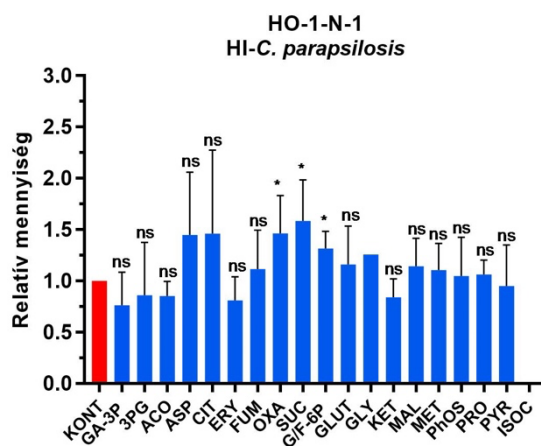
A



B



C



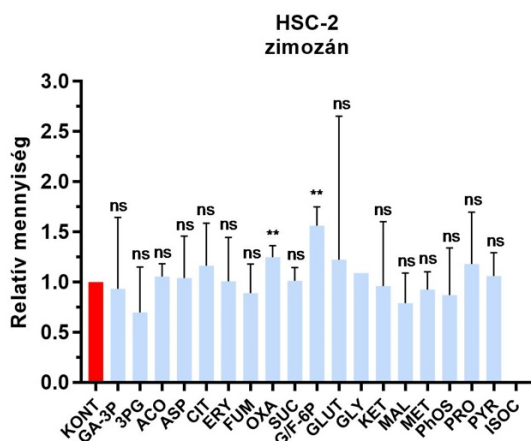
**13. ábra:** Relatív kontrollra normalizált metabolit mennyiség a különböző gombastimulusok jelenlétében. (A) HO-1-N-1 sejtvonala, zimosán kezelés. (B) HO-1-N-1 sejtvonala, *HI-C. albicans* kezelés. (C) HO-1-N-1 sejtvonala, *HI-C. parapsilosis* kezelés.  $n=4$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ), ns=nem szignifikáns. GA-3P - glicerinaldehid-3-foszfát; 3PG - 3-foszfoglicerát; ACO - akonitát; ASP - aszpartát; CIT - citrát; ERY - eritroz-4-foszfát; FUM - fumarát; ISOC - izocitrát; OXA - oxálacetát; SUC - szukcinát; G/F-6-foszfát - glükóz/fruktóz-6-foszfát; GLUT - glutamát; GLY - glicin; KET -  $\alpha$ -ketoglutarát; MAL - malát; MET - metionin; PhOS - foszfoenolpiruvát; PRO - prolin; PYR - piruvát.

A HSC-2 sejtvonala esetében szignifikáns változás történt a glükóz/fruktóz-6-foszfát ( $1,564 \pm 0,132$ ) termelésben zimosán kezelés hatására (14. A ábra). A *HI-C. albicans* kezelés szignifikánsan csökkentette a glicerinaldehid-3-foszfát ( $0,605 \pm 0,142$ )

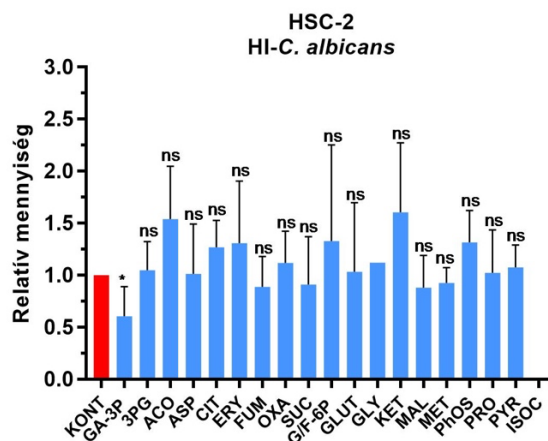


menyiségét (14. B ábra). HI-*C. parapsilosis* kezelés hatására szignifikánsan változott az eritróz-4-foszfát ( $0,844 \pm 0,056$ ), fumarát ( $0,763 \pm 0,065$ ), oxálacetát ( $1,289 \pm 0,117$ ) és metionin ( $0,855 \pm 0,031$ ) mennyisége (14. C ábra).

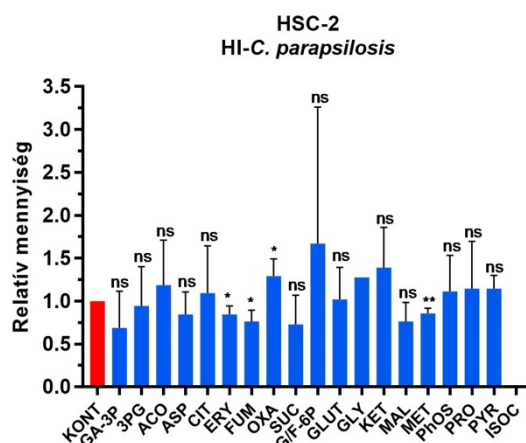
A



B



C



**14. ábra:** Relatív kontrollra normalizált metabolit mennyiség a különböző gombastimulusok jelenlétében. (A) HSC-2 sejtvonal, zimoján kezelés. (B) HSC-2 sejtvonal, HI-*C. albicans* kezelés. (C) HSC-2 sejtvonal, HI-*C. parapsilosis* kezelés.  $n=4$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ), ns=nem szignifikáns. GA-3P - glicerinaldehid-3-foszfát; 3PG - 3-foszfoglicerát; ACO - akonitát; ASP - aszpartát; CIT - citrát; ERY - eritróz-4-foszfát; FUM - fumarát; ISOC - izocitrát; OXA - oxálacetát; SUC - szukcinát; G/F-6P - glükóz/fruktóz-6-foszfát; GLUT - glutamát; GLY - glicin; KET -  $\alpha$ -ketoglutarát; MAL - malát; MET - metionin; PhOS - foszfoenolpiruvát; PRO - prolin; PYR - piruvát.

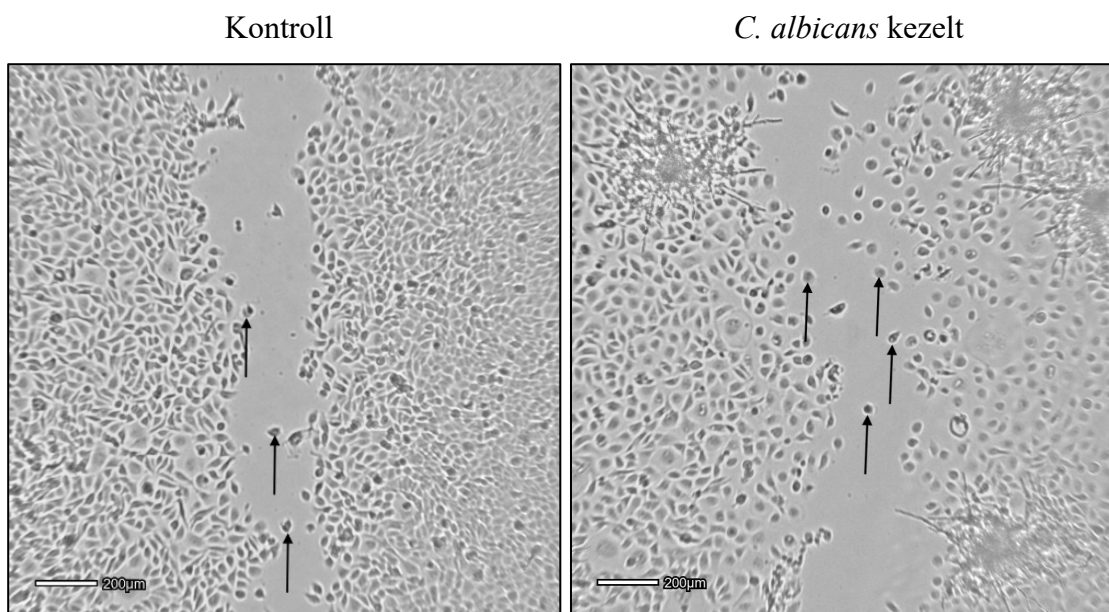
Eredményeink alapján elmondható, hogy a HI-*Candida* sejtek, illetve a zimozán kezelés hatással van az OSCC sejtek migrációs aktivitására, az MMP-k szekréciójára, valamint a metabolitok termelésére. Mindez egy interakciót feltételez a tumorsejtek mintázat felismerő receptorai (PRRek) és a gombák patogén-asszociált molekuláris mintázatai (PAMP) között.

## **6.2 Élő gombák OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata**

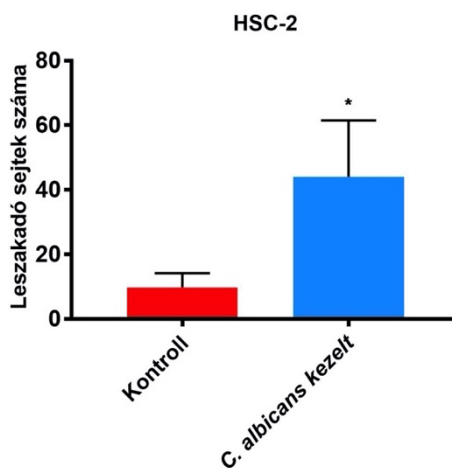
### **6.2.1 Az élő *Candida* gombák hatással vannak az OSCC sejtek metasztázissal összefüggésbe hozható tulajdonságaira**

A hőinaktivált gombasejtek és zimozán kezelés által vizsgálni tudtuk a gombák és az OSCC sejtek invazív tulajdonságai közötti direkt kapcsolatot (PAMP - PRR általi direkt kapcsolat). Mivel tapasztaltunk szignifikáns változásokat, úgy véltük, hogy az indirekt kapcsolatoknak (*Candidák* által szekretált molekulák) is szerepe lehet a tumor invazív folyamatainak megváltoztatásában. Ennek megvalósításához élő *C. albicans* és *C. parapsilosis* gombasejtekkel kezeltünk HSC-2 és HO-1-N-1 tumorsejteket, ezután time-lapse videót (hosszú idő alatt készített fényképek rövid idő alatti lejátszása) készítettünk a tumorsejtek mozgásáról. A HO-1-N-1 sejtvonal esetében *C. albicans* és *C. parapsilosis*, valamint a HSC-2 sejtvonal esetében *C. parapsilosis* kezelés jelenlétében nem volt változás az OSCC sejtek mozgásában. A HSC-2 sejtvonalnál *C. albicans* kezelés hatására leszakadó magányos OSCC sejteket figyeltünk meg a gombatelep körül. A kezeletlen kontroll sejtek esetében kevésbé vagy egyáltalán nem voltak jelen leszakadó sejtek (15. A, B ábra).

A

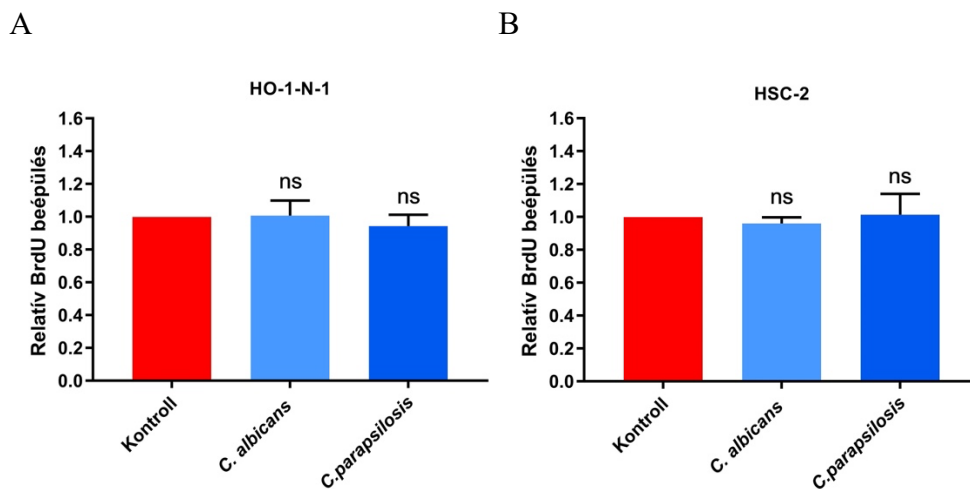


B



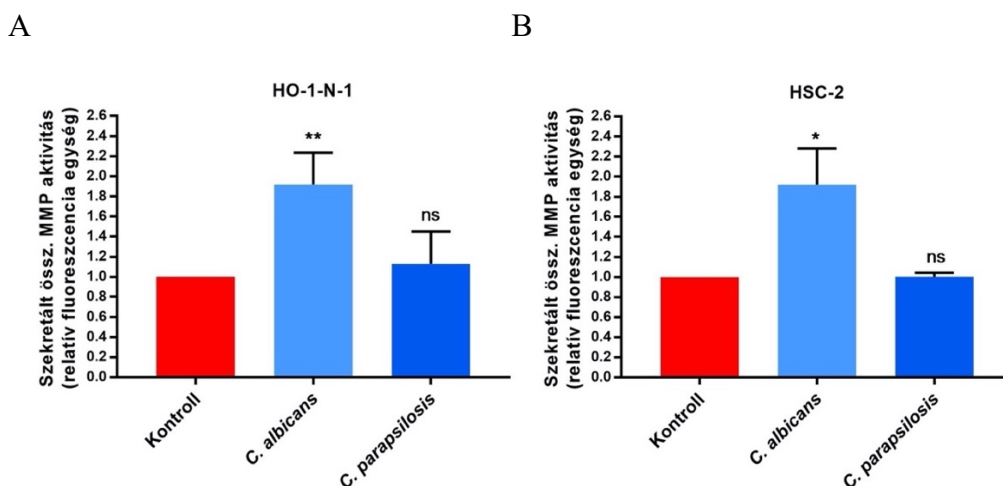
**15. ábra:** (A) A sejtmigrációs time-lapse videóból származó képek. A nyilak a leszakadó, magányosan migráló tumorsejteket mutatják. Méretjelző sáv: 200 µm. (B) Leszakadó OSCC sejtek száma a kontroll és a *C. albicans* kezelt mintákban. n=3; párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  \*  $p \leq 0,05$ ), ns=nem szignifikáns.

Megvizsgáltuk, hogy az élő *Candida* gombasejteknek van-e hatása az OSCC sejtek proliferációs aktivitására. Eredményeink alapján elmondható, hogy a hőinaktivált gombasejtekhez és a zimozán kezeléshez hasonlóan nem történt szignifikáns változás a tumorsejtek proliferációs aktivitásában (16. A, B ábra).



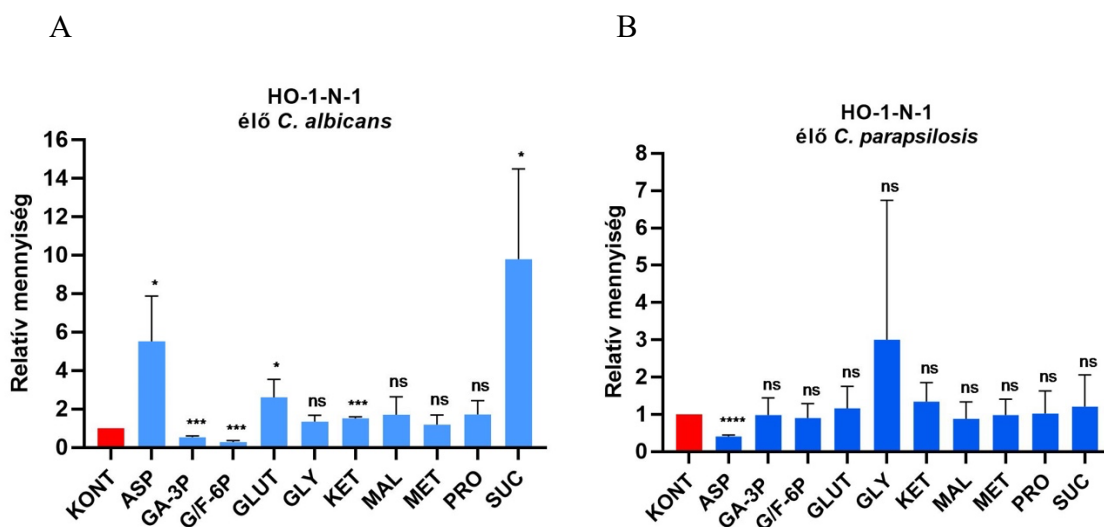
**16. ábra:** Élő *Candida* gombasejtek hatása az OSCC sejtek proliferációs aktivitására. (A) HO-1-N-1 sejtek relatív proliferációs aktivitása. (B) HSC-2 sejtek relatív proliferációs aktivitása. n=3, párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$ ; ns=nem szignifikáns.

Mivel hőinaktivált *C. albicans* és zimozán kezelés hatására megemelkedett a szekretált összes MMP aktivitás a HSC-2 sejtvonal esetében, megvizsgáltuk, hogy élő *Candida* gombák jelenlétében detektálható-e változás. *C. albicans* kezelés hatására mindkét sejtvonal szekretált összes MMP aktivitása megemelkedett (HSC-2:  $1,918 \pm 0,209$ ; HO-1-N-1:  $1,918 \pm 0,183$ ), azonban a *C. parapsilosis* kezelés nem eredményezett szignifikáns változást (17. A, B ábra).



**17. ábra:** Élő *Candida* sejtek hatása az OSCC sejtek szekretált összes MMP aktivitására. (A) HO-1-N-1 sejtek relatív összes MMP aktivitása. (B) HSC-2 sejtek relatív összes MMP aktivitása. n=3, párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ); ns=nem szignifikáns.

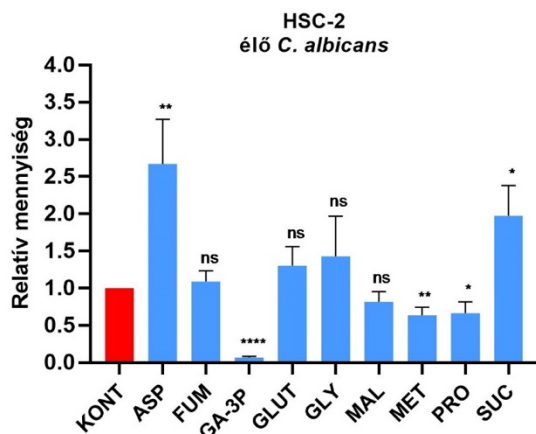
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az élő *Candida* gombáknak van-e hatása az OSCC sejtek metabolikus aktivitására. Az 5.5. fejezetben leírtak alapján kidolgozott sejtfeltáró protokoll nem ronsolta a gombasejtfalat, így a gombákból származó metabolitok nem zavarták a mérést. A HO-1-N-1 sejtvonal esetében élő *C. albicans* kezelés hatására szignifikánsan változott az aszpartát ( $5,526 \pm 1,667$ ), glicerinaldehid-3-foszfát ( $0,543 \pm 0,038$ ), glükóz/fruktóz-6-foszfát ( $0,288 \pm 0,047$ ), glutamin ( $2,616 \pm 0,667$ ),  $\alpha$ -ketoglutarát ( $1,532 \pm 0,051$ ) és a szukcinát ( $9,81 \pm 2,709$ ) termelése (18. A ábra). Ugyanakkor *C. parapsilosis* kezelés hatására csak az aszpartát ( $0,408 \pm 0,024$ ) mennyisége változott (18. B ábra).



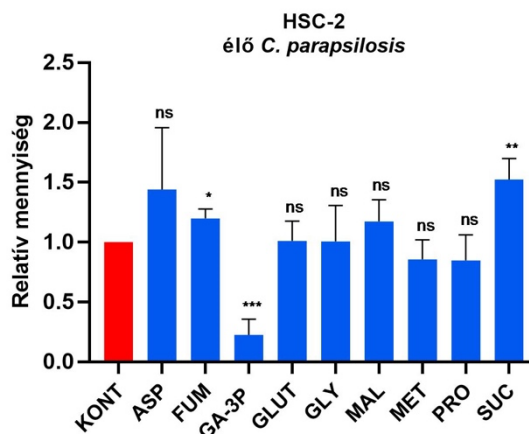
**18. ábra:** Relatív kontrollra normalizált metabolit mennyiség a különböző gombastimulusok jelenlétében. (A) HO-1-N-1 sejtvonal, élő *C. albicans* kezelés. (B) HO-1-N-1 sejtvonal, élő *C. parapsilosis* kezelés.  $n=3$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns. ASP - aszpartát; GA-3P - glicerinaldehid-3-foszfát; G/F-6P - glükóz/fruktóz-6-foszfát; GLUT - glutamát; GLY - glicin; KET -  $\alpha$ -ketoglutarát; MAL - malát; MET - metionin; PRO - prolin; SUC - szukcinát.

A HSC-2 sejtek esetében a *C. albicans* kezelés szignifikáns változást eredményezett az aszpartát ( $2,67 \pm 0,346$ ), glicerinaldehid-3-foszfát ( $0,068 \pm 0,009$ ), metionin ( $0,634 \pm 0,063$ ), prolin ( $0,666 \pm 0,087$ ) és a szukcinát ( $1,975 \pm 0,234$ ) termelésében (19. A ábra). A *C. parapsilosis* kezelés szignifikáns változást eredményezett a fumarát ( $1,199 \pm 0,046$ ), glicerinaldehid-3-foszfát ( $0,225 \pm 0,076$ ) és a szukcinát ( $1,523 \pm 0,101$ ) termelésében (19. B ábra).

A



B



**19. ábra:** Relatív kontrollra normalizált metabolit mennyiség a különböző gombastimulusok jelenlétében. (A) HSC-2 sejtvonal, élő *C. albicans* kezelés. (B) HSC-2 sejtvonal, élő *C. parapsilosis* kezelés.  $n=3$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns. ASP - aszpartát; GA-3P - glicerinaldehid-3-foszfát; G/F-6P - glükóz/fruktóz-6-foszfát; GLUT - glutamát; GLY - glicin; MAL - malát; MET - metionin; PRO - prolin; SUC - szukcinát.

#### 6.2.2 A hőinaktivált és élő *Candida* gombák OSCC sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* – értékelés

Munkánk során vizsgáltuk, hogy a szájüregben túlzottan elszaporodó *Candida* gombák befolyásolják-e a szájüregi laphámsejtes karcinóma progresszióját. Elsőként *in vitro* vizsgáltuk a hőinaktivált, valamint az élő *Candida* gombák és a zimozán hatását. Egy tanulmány korábban már beszámolt arról, hogy a nem-kissejtes tüdőrák esetén a tüdőben elszaporodó Gram-negatív baktériumok növelik a tumorsejtek proliferációs és inváziós aktivitását *in vitro* és *in vivo*<sup>169</sup>. Kísérleti eredményeinkből megállapítható, hogy az OSCC sejtek proliferációs aktivitása sem a HI-*Candida* sejtek és zimozán jelenlétében, sem az élő *Candida* sejtek jelenlétében nem változik. Azonban a HO-1-N-1 sejtek esetén a migrációs aktivitás szignifikánsan megemelkedik HI-*Candida* sejtek és zimozán jelenlétében. Az élő sejtkövetési technika (time-lapse videó) alapján elmondható, hogy a HSC-2 sejtek élő *C. albicans* sejtek jelenlétében a konfluens réteg sebzésének szélén, a gombatelepek közelében, egymástól elszakadva, magányosan vándorolnak az üres terület irányába. Ezt a jelenséget nem, vagy csak kis mértékben figyeltük meg az élő *C. albicans* sejteket nem tartalmazó kontroll minták esetében. Habár ez a jelenség a gombatelepek közelében

látható, de attól távolabb is megfigyelhető. Emiatt egy indirekt kapcsolat feltételezhető a gomba- és a tumorsejtek között, amelyek feltehetően szekretált molekulák és extracelluláris vezikulák által valósul meg<sup>170</sup>. Ez a jelenség valószínűleg szerepet játszik a tumor progressziójában, valamint a tumor inváziójában.

A mátrix metalloproteinázok esszenciális szerepet töltenek be a tumormetasztázis folyamatában az extracelluláris mátrix degradálása által, így elősegítik a magányos rosszindulatú daganatsejtek migrációját<sup>171</sup>. A hőinaktivált gombasejtekkel és a zimozánnal történő kezelést követően enyhe szekretált MMP aktivitást figyeltünk meg a HSC-2 sejtvonal esetében. Az élő *C. albicans* sejtekkel történő kezelés mindkét sejtvonal MMP aktivitását szignifikánsan növelte, amely erősíti azt az elképzelést, miszerint a *C. albicans* sejtek jelenléte és túlzott elszaporodása a szájüregben növeli az OSCC sejtek invázióját az MMP-k aktiválódása révén. Ugyanakkor *C. parapsilosis* esetén nem figyeltünk meg változást.

A tumorsejtekről elmondható, hogy metasztatikus állapotban sajátos a metabolikus profiljuk, ezért megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a tumorsejtek glikolízisét, TCA ciklusát, illetve bizonyos aminosavak termelődését a gombasejtek jelenléte. A metabolomikai vizsgálatok eredményeiből kiderült, hogy a HI-*Candida* sejtek, illetve a zimozán jelenlétében néhány metabolit mennyisége változott, azonban csekély mértékben, valamint a változások között nem látható összefüggés. Ezzel ellentétben, az élő *C. albicans* sejtekkel történő kezelés hatására mindkét sejtvonal sejtjei emelkedett aszpartát és szukcinát és csökkent glicerinaldehid-3-foszfát (GA-3P) termelést mutattak. Érdekes összefüggés, hogy a GA-3P mennyisége a HI-*C. albicans* sejtek jelenlétében is csökkent mindkét sejtvonal esetében. Irodalmi adatok alapján a szukcinát és az aszpartát onkometabolit, azaz szerepük van a tumor invazív folyamataiban. A szukcinát több mechanizmuson keresztül is szerepet játszhat a tumor progressziójában. A szukcinát akkumulálódása a tumorsejtekben a prolil-hidroxiláz enzim inhibícióját eredményezi, így a hipoxia indukálta faktor 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stabilizálódik, mivel a prolil-hidroxiláz nem képes hidroxilálni a HIF-1 $\alpha$ -t, ezáltal nem degradálódik. Emiatt a HIF-1 $\alpha$  a sejtmagba transzlokálódik, ahol elősegítheti az angiogenezis folyamatát, az apoptózissal szembeni rezisztenciát, valamint a tumorinvázióban szerepet játszó gének aktiválódását<sup>172</sup>. Egy másik tanulmány szerint a tumorsejtek által szekretált szukcinát a tumor progresszióját elősegítő faktorok közé tartozik, mivel gátolja a tumor-asszociált makrofágok polarizációját, valamint a tumor előrehaladását segítő szignalizációs utakat aktivál (PI3K/AKT, HIF-1 $\alpha$ )<sup>173</sup>. A szukcinát mellett az aszpartát is onkometabolit, azaz elősegíti a

tumoros folyamatokat. Egy tanulmány szerint az aszpartát hiánya limitálja a tumorsejtek proliferációját hipoxiás állapotban, ezáltal az aszpartát limitáló szerepet tölthet be a tumornövekedést tekintve<sup>174</sup>. Ez arra utal, hogy a *C. albicans* által indukált aszpartát termelés elősegítheti a tumor növekedését. Azt feltételezzük, hogy a csökkent gliceraldehid-3-foszfát a megnövekedett gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) emelkedett aktivitásának az eredménye, mivel a GAPDH katalizálja azt a redox reakciót a glikolízis során, amelyben a GA-3P 1,3-biszfoszfogliceráttá oxidálódik, miközben a NAD<sup>+</sup> NADH-vá redukálódik. Ha a feltételezésünk igaz, miszerint megemelkedik a GAPDH aktivitása, az a tumorsejtekben metasztatikus aktivitást és tumornövekedést eredményezhet, mivel egy tanulmány szerint a GAPDH a SNAIL (SNAIL család transzkripciós represszor 1) transzkripciós faktor által részt vesz a tumor invazív folyamataiban<sup>175</sup>.

Az eddigi eredményeket összegezve elmondható, hogy élő *C. albicans* sejtek jelenlétében megfigyelhetők olyan szignifikáns változások (leszakadó sejtek 2D-s migrációs modellben, fokozott szekretált összes MMP aktivitás, onkometabolitok termelése), amelyek összefüggésbe hozhatók a tumorprogresszióval.

### **6.2.3 Az élő *C. albicans* stimulus aktiválja az OSCC invazív folyamataiban szerepet játszó géneket és jelátviteli utakat**

Annak érdekében, hogy feltérképezzük az *in vitro* kísérletek során látott fenotípusos változás molekuláris hátterét, a HSC-2 és HO-1-N-1 sejtek teljes transzkriptóm analízisét végeztük el zimozán, HI-*C. albicans*, HI-*C. parapsilosis*, élő *C. albicans* és élő *C. parapsilosis* sejtekkel történő kezelést követően. A transzkriptomikai vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az élő *C. albicans* sejt kezelés okozta a legtöbb szignifikáns génexpressziós változást az OSCC sejtekben (HSC-2: n=2764; HO-1-N-1: n=190). A HO-1-N-1 sejtvonal zimozán kezelését követően 19 gén expressziós szintje változott szignifikánsan. A többi kezelés esetén nem, vagy elhanyagolható mértékben történt változás az OSCC sejtek expressziós aktivitásában (1. táblázat).

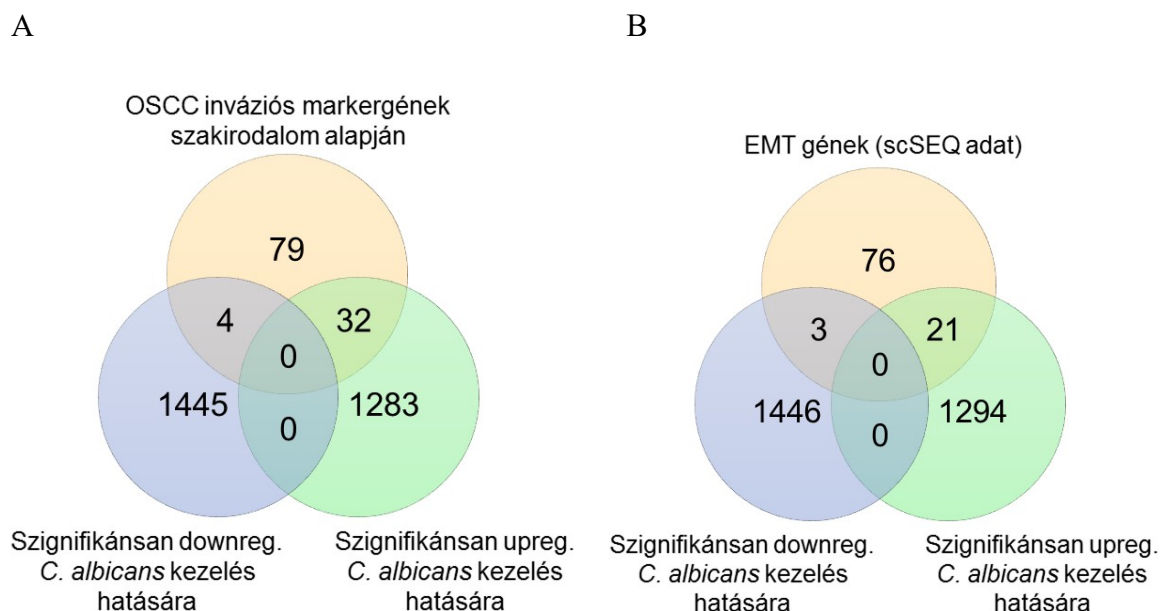


**1. táblázat:** Az OSCC sejtek különböző gombastimulus hatására bekövetkező szignifikánsan változó génjeinek száma. n=3. HI-C.a. - hőinaktivált *C. albicans*, HI-C.p.- hőinaktivált *C. parapsilosis*, élő C.a. - élő *C. albicans*, élő C.p. - élő *C. parapsilosis*.

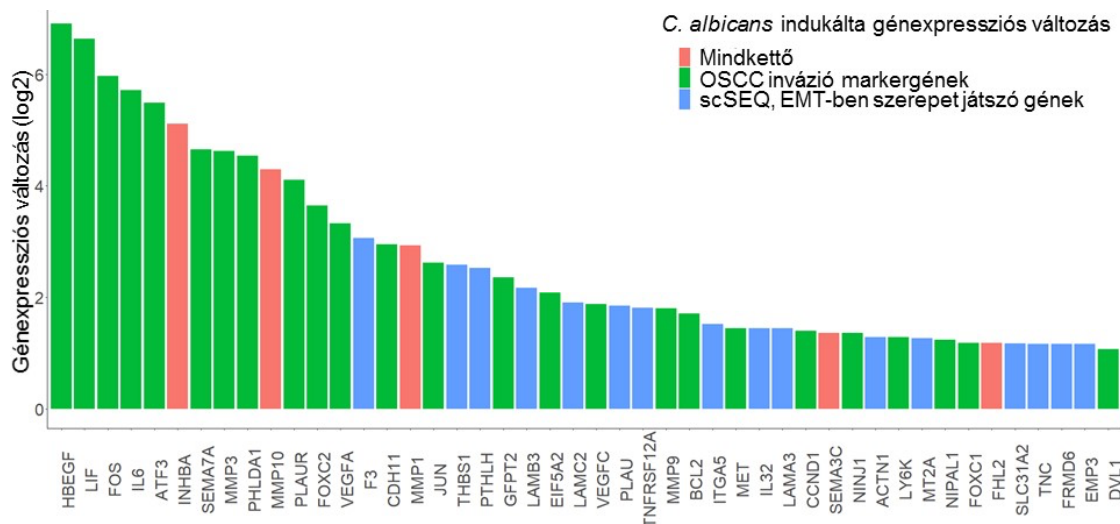
		zimozan	HI-C.a.	HI-C.p.	élő C.a.	élő C.p.
HO-1-N-1	upreg.	19	0	3	173	0
	downreg.	0	0	0	17	0
HSC-2	upreg.	0	0	4	1315	3
	downreg.	1	2	1	1449	0

Ha a két sejtvonalat hasonlítjuk össze élő *C. albicans* sejtek jelenlétében, akkor elmondható, hogy a HSC-2 sejtvonal esetén több gén expressziós szintje változott meg (upregulálódó gének: n=1315; downregulálódó gének: n=1449), mint a HO-1-N-1 esetén (upregulálódott gének: n=173; downregulálódott gének: n=17) (1. táblázat). Ezután vizsgáltuk az élő *C. albicans* sejtek által indukált géneket. Kigyűjtöttük a szakirodalomból azokat, amelyeknek bizonyított szerepe van a már kialakult OSCC progressziójában, és összehasonlítottuk azokkal a génekkel, amelyek génexpressziós szintje megváltozott *C. albicans* kezelés hatására. A HSC-2 sejtvonal esetében 36 olyan gént azonosítottunk (32 upregulálódó, 4 downregulálódó), amelyek szerepet játszanak az OSCC progressziójában (3. melléklet) és *C. albicans* jelenlétében változik expressziójuk (20. A ábra, 21. ábra). Ezután a *C. albicans* hatására változó génexpressziós profilt összehasonlítottuk egy egy-sejt szekvenálásból (scSEQ) származó génexpressziós profillal. A tanulmányban 18 fejnyaki daganatos (HNSCC) beteg mintáiból végeztek egy-sejt szekvenálást, majd összehasonlították a metasztatikus és nem-metasztatikus génexpressziós profilt<sup>176</sup>. Ez alapján megvizsgáltuk, hogy a metasztatikus állapotra jellemző és EMT-ben szerepet játszó gének közül van-e átfedés a *C. albicans* által indukált génekkel. Az eredmények alapján elmondható, hogy *C. albicans* jelenlétében 21 gén upregulálódik és 3 downregulálódik, amelyeknek szerepe van az EMT folyamataiban az scSEQ adatok alapján (20. B ábra, 21. ábra). A két elemzésből származó adatot (20. A és B ábra) összehasonlítva elmondható, hogy 5 olyan gént találtunk (INHBA - inhibin béta-alegység

A; MMP10 - mátrix metalloproteináz 10; MMP1 - mátrix metalloproteináz 1; SEMA3C - szemaforin 3C; FHL2 - négy-és-fél LIM domén), amelyek expressziója szignifikánsan növekszik *C. albicans* jelenlétében, valamint szerepe van az OSCC invázióban a kigyűjtött szakirodalmi adatok és az scSEQ adatok alapján is (21. ábra).

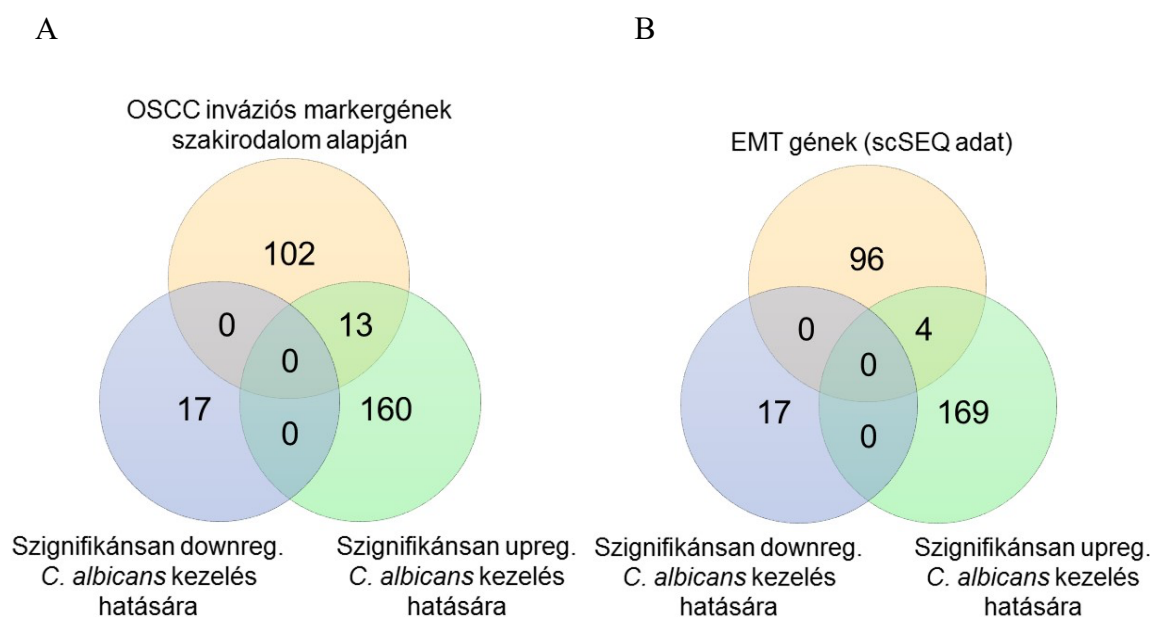


**20. ábra:** Élő *C. albicans* sejtek jelenlétében változó HSC-2 géneket és a szakirodalom alapján OSCC progressziójában szerepet játszó géneket ábrázoló Venn-diagram. (A) *C. albicans* jelenlétében változó gének, valamint a szakirodalmi adatok alapján OSCC markergének összehasonlítása. (B) *C. albicans* jelenlétében változó gének, valamint 18 betegből származó minták egy-sejt szekvenálási adataiból származó (scSEQ) EMT-vel összefüggő gének összehasonlítása.

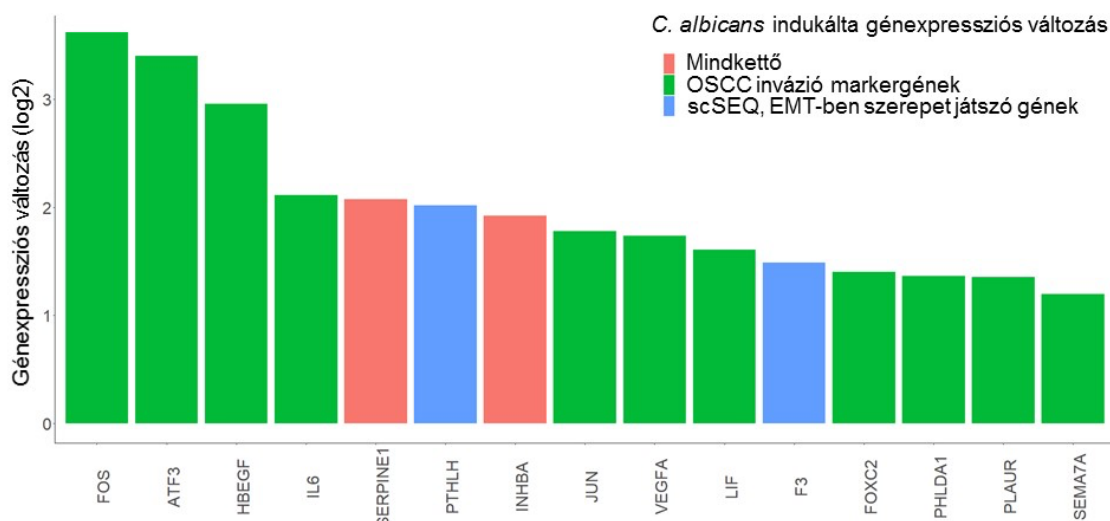


**21. ábra:** *C. albicans* által indukált gének változása (log<sub>2</sub>) a HSC-2 sejtvonalban. A grafikonon azok a gének vannak feltüntetve, amelyek átfedésben vannak a szakirodalomban azonosított markergénekkel (zöld) vagy az egy-sejt szekvenálás eredményéből azonosított EMT génekkel (kék), illetve amelyek mindegyik adathalmazban előfordultak (piros). HBEGF - heparinkötő epidermális növekedési faktor-szerű növekedési faktor; LIF - leukémia gátló faktor; FOS - cFOS proto-onkogén; IL6 - interleukin 6; ATF3 - aktiváló 3. transzkripció faktor; INHBA - inhibin béta-alegység A; SEMA7A - szemaforin 7A; MMP3 - mátrix metalloproteináz 3; PHLDA1 - pleksztrin homológ-szerű domén, A család, 1-es tag; MMP10 - mátrix metalloproteináz 10; PLAUR - plazminogén aktivátor, urokináz receptor; FOXC2 - C2-es doboz; VEGFA - vaszkuláris endotél növekedési faktor A; F3 - szöveti faktor; CDH11 - cadherin 11; MMP1 - mátrix metalloproteináz 1; JUN - jun proto-onkogén; THBS1 - thrombospondin 1; PTH1H - mellékpajzsmirigy hormon-szerű hormon; GFPT2 - glutamin-fruktóz-6-foszfát transzamináz; LAMB3 - laminin, béta 3 alegység; EIF5A2 - eukarióta transzláció iniciációs faktor 5A2; LAMC2 - laminin gamma 2 alegység; VEGFC - vaszkuláris endotél növekedési faktor C; PLAU - plazminogén aktivátor, urokináz; TNFRSF12A - tumor nekrozis faktor szupercsalád, 12A tagja; MMP9 - mátrix metalloproteináz 9; BCL2 - BCL2 apoptózis regulátor; ITGA5 - integrin alfa 5 alegység; MET - MET proto-onkogén; IL32 - interleukin 32; LAMA3 - laminin alfa 3 alegység; CCND1 - ciklin D1; SEMA3C - szemaforin 3C; NINJ1 - ninjurin 1; ACTN1 - alfa-aktin 1; LY6K - limfocita antigén komplex 6, K lókus; MT2A - metallotionein 2A; NIPAL1 - nipa-szerű protein 1; FOXC1 - C1-es doboz; FHL2 - négy-és-fél LIM domén 2; SLC31A2 - oldott anyag hordozó család 31, 2-es tagja; TNC - tenascin C; FRMD6 - FRM 6-ot tartalmazó domén; EMP3 - epiteliális membrán protein 3; DVL1 - DSH homológ.

A HO-1-N-1 sejtvonal transzkriptomikai eredményeit is összehasonlítottuk a szakirodalmi adatokkal. Ebben az esetben lényegesen kisebb volt az átfedő gének száma. Tizenhárom olyan gént azonosítottunk, amelyek *C. albicans* stimulus hatására upregulálódtak és egyben OSCC inváziós markergének is (22. A ábra). Ezenkívül négy olyan gént találtunk, amelyeknek az EMT-ben van szerepe az scSEQ adatok alapján (22. B ábra). Két olyan *C. albicans* indukálta gént azonosítottunk, amely mindkét szakirodalmi adathalmazban jelen volt (SERPINE1 - szerpin E család 1-es tagjához tartozó gén, INHBA) (23. ábra).

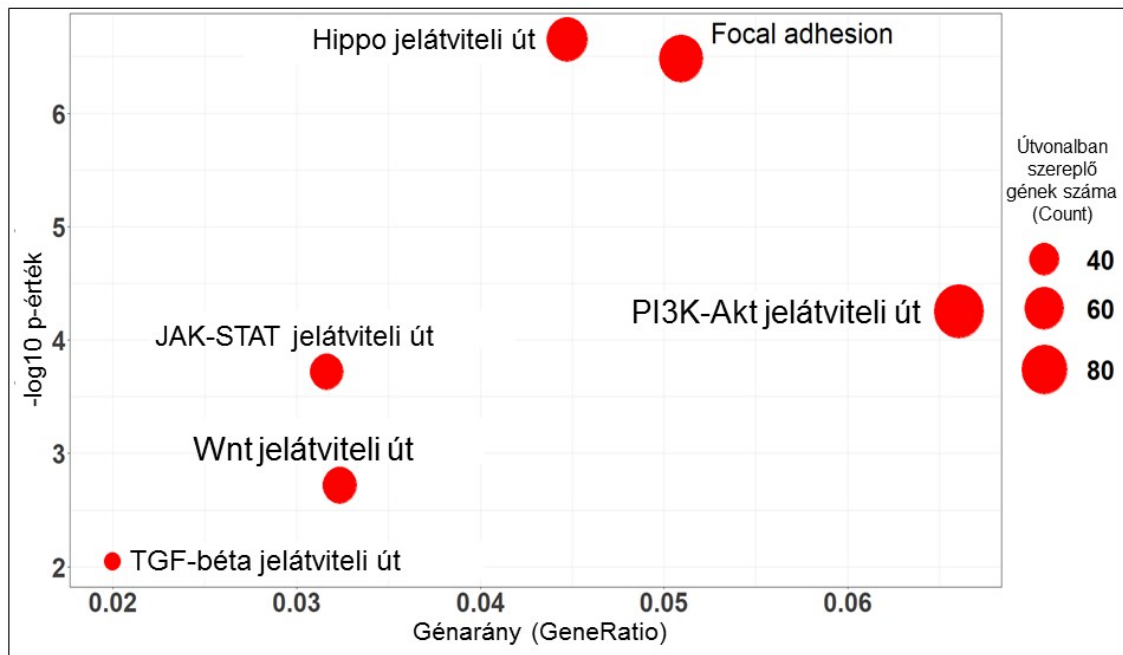


**22. ábra:** Élő *C. albicans* sejtek jelenlétében változó HO-1-N-1 géneket és a szakirodalom alapján OSCC progressziójában szerepet játszó géneket ábrázoló Venn-diagram. (A) *C. albicans* jelenlétében változó gének, valamint a szakirodalmi adatok alapján OSCC markergének összehasonlítása. (B) *C. albicans* jelenlétében változó gének, valamint 18 betegből származó minták egy-sejt szekvenálási adataiból származó (scSEQ) EMT-vel összefüggő gének összehasonlítása.



**23. ábra:** *C. albicans* által indukált gének változása (log<sub>2</sub>) a HO-1-N-1 sejtvonalban. A grafikonon azok a gének vannak feltüntetve, amelyek átfedésben vannak a szakirodalomban azonosított markergénekkkel (zöld) vagy az egy-sejt szekvenálás eredményéből azonosított EMT génekkkel (kék), illetve amelyek mindegyik adathalmazban előfordultak (piros). FOS - cFOS proto-onkogén; ATF3 - aktiváló 3. transzkripció faktor; HBEGF - heparinkötő epidermális növekedési faktor-szerű növekedési faktor; IL6 - interleukin 6; SERPINE1 - szerpín E család 1-es tagjához tartozó gén; PTHLH - mellékpajzsmirigy hormon-szerű hormon; INHBA - inhibin béta-alegység A; JUN - jun proto-onkogén; VEGFA - vaszkuláris endotél növekedési faktor A; LIF - leukémia gátló faktor; F3 - szöveti faktor; FOXC2 - C2-es doboz; PHLDA1 - pleksztrin homológ-szerű domén, A család, 1-es tag; PLAUR - plazminogén aktivátor, urokináz receptor; SEMA7A - szemaforin 7A.

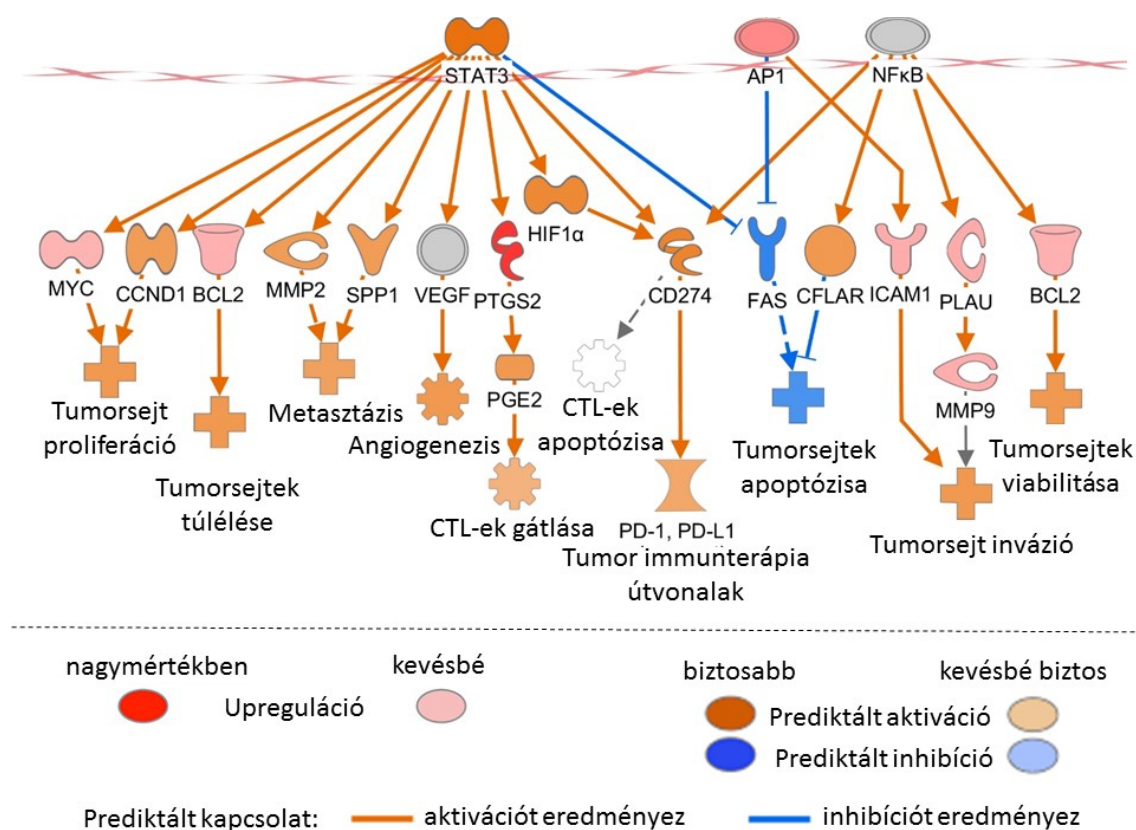
Ezután elemeztük, hogy a *C. albicans* jelenlétében változó gének milyen szignalizációs útvonalakban vesznek részt. Ehhez KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) analízist végeztünk. Az analízis alapján elmondható, hogy a *C. albicans* jelenléte olyan szignalizációs útvonalakat aktivál a HSC-2 sejtekben, amelyekről korábban már bizonyították, hogy szerepük van az OSCC kialakulásának folyamatában és metasztázis képzésében. Ezek a jelátviteli útvonalak a Hippo, Focal adhesion, JAK-STAT, PI3K-Akt, Wnt és a TGFβ jelátviteli utak (24. ábra)<sup>21,177–180</sup>. A HO-1-N-1 sejtvonal esetében nem találtunk olyan útvonalakat a KEGG analízis során, amelyek összefüggésbe hozhatóak az OSCC progressziójával.



**24. ábra:** Jelátviteli útvonalak, amelyek kulcsszerepet játszanak az OSCC inváziós folyamataiban és *C. albicans* jelenlétében aktiválódnak. A „Count” jelöli, hogy az adott útvonal szereplői közül hány gén upregulálódott *C. albicans* jelenlétében. A génarány jelöli az útvonalban *C. albicans* hatására aktiválódott gének arányát az összes változó génhez viszonyítva. A bal oldali y tengelyen pedig a p érték van feltüntetve.

Ezután génkapcsolat vizsgálatot végeztünk a *C. albicans* kezelés hatására változó HSC-2 génkészlet alapján. A HO-1-N-1 sejtvonal esetében nem volt megfelelő számú gén, amely alapján értelmezhető eredményeket lehetett volna kinyerni. A kauzális génkapcsolat vizsgálat a *C. albicans* jelenlétében változó gének alapján a tumor mikrokörnyezet jelátviteli útvonalak, metasztázishoz, invázióhoz, angiogenezishez, proliferációhoz köthető útvonalak szignifikáns aktiválódását prediktálta (25. ábra).

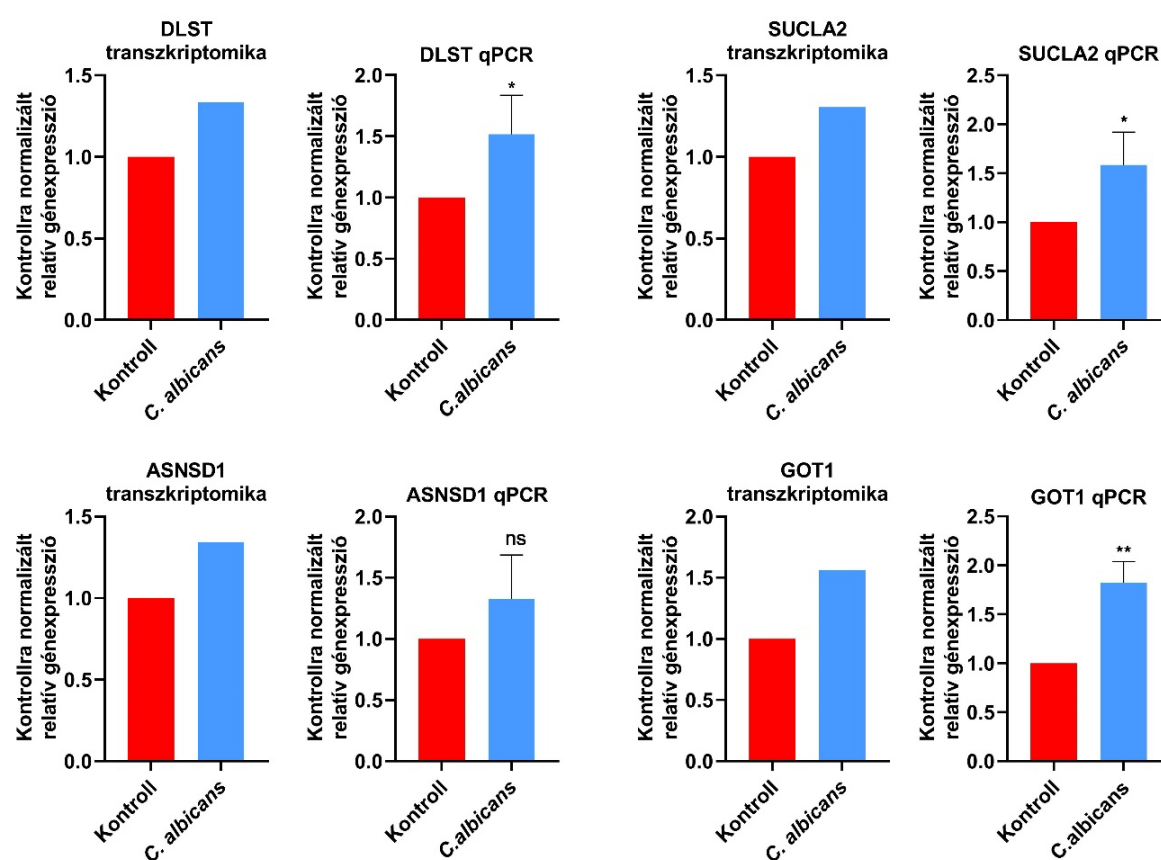




**25. ábra:** Kauzális génkapcsolat vizsgálat. A HSC-2 sejtvonal *C. albicans* jelenlétében változó génjei alapján prediktált progresszív folyamatai. STAT3 - jelátalakító és transzkripció aktivátor 3; AP1 - aktiváló protein 1; NFκB - sejtmagi faktor kappa B; MYC - MYC proto-onkogén; CCND1 - ciklin D1; BCL2 - BCL2 apoptózis szabályozó; MMP2 - mátrix metalloproteináz 2; SPP1 - szekretált foszfoprotein 1; VEGF - vaszkuláris endotél növekedési faktor; PTGS2 - proszttaglandin endoperoxid szintáz 2; HIF1α – hipoxia indukálta faktor 1 alfa; PGE2 - proszttaglandin E2; CTL - citotoxikus T-limfocita; CD274 - programozott sejthalál 1, ligand 1; PD-1 - programozott sejthalál 1; PD-L1 - programozott sejthalál ligand 1; FAS - FAS sejtfelszíni sejthalál receptor; CFLAR - CASP8 és FADD-szerű apoptózis szabályozó; ICAM1 - intercelluláris adhézións molekula 1; PLAU - plazminogén aktivátor, urokináz; MMP9 - mátrix metalloproteináz.

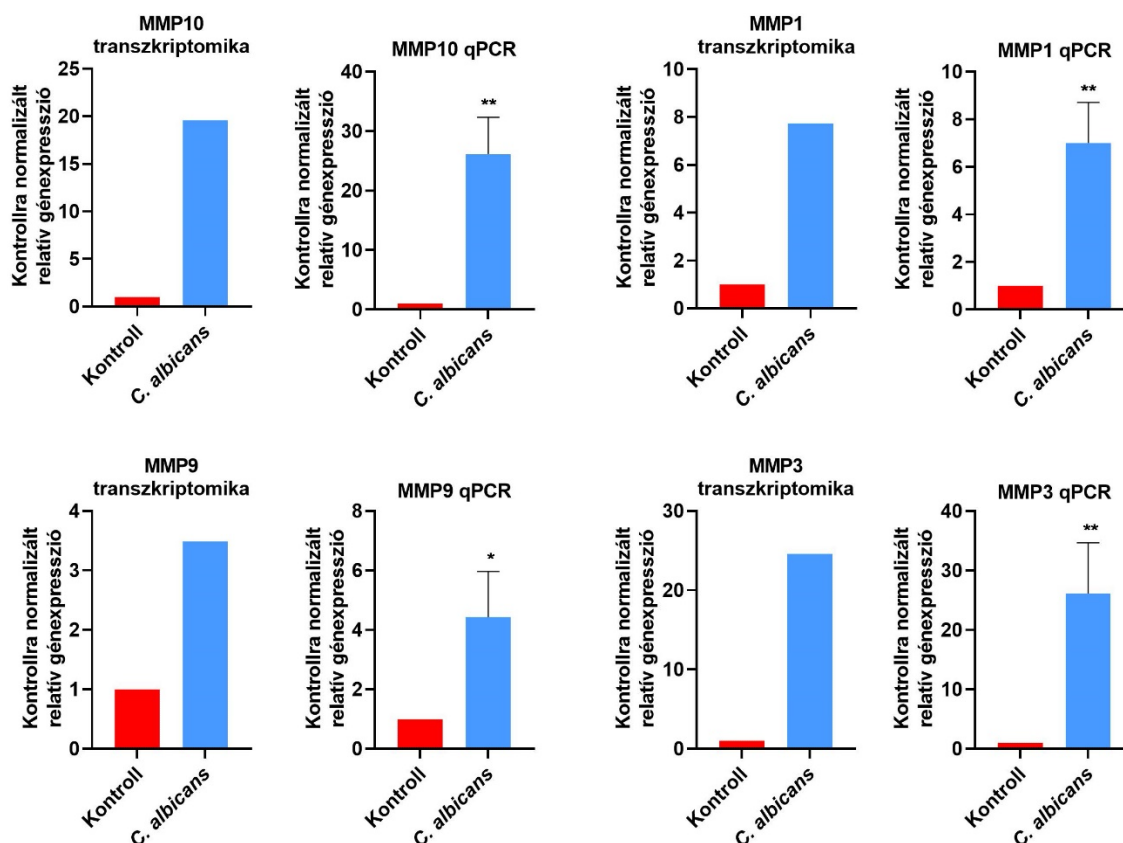
A korábbi *in vitro* eredményeinket alátámasztják a transzkriptomikai eredmények, miszerint *C. albicans* hatására nő a HSC-2 sejtek dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz (DLST) és a szukcinil-KoA ligáz β-alegység (SUCLA2) génjeinek expressziója, amelyek szerepet játszanak a szukcinát metabolizmusában. Ezenkívül az aszparagin-szintetáz tartalmazó domén 1 (ASNSD1) és a glutamát-oxálacetát-transzamináz 1 (GOT1) génexpressziós szintje is megemelkedett, amelyek pedig az aszpartát szintézis folyamatában játszanak szerepet (26. ábra). A génexpressziós változás kismértékű volt

ugyan, azonban a HPLC-HRMS-sel mért metabolomikai eredményeket igazolta. A génexpressziós változásokat qPCR-rel validáltuk. Tovább erősíti az előzetes *in vitro* MMP aktivitás növekedés eredményeket, hogy *C. albicans* jelenlétében több MMP génexpressziós szintje is megemelkedett (27. ábra). A génexpressziós változásokat szintén qPCR-rel validáltuk. Emellett kiválasztottunk néhány, *C. albicans* jelenlétében emelkedett expressziót mutató gént, amelynek szerepe van az OSCC inváziójában és qPCR-rel igazoltuk a megváltozott génexpressziós mintázatot (4. melléklet), valamint a fentebb említett szignalizációs utak néhány komponensének megváltozott expresszióját is validáltuk qPCR-rel (5. melléklet).



**26. ábra:** A szukcinát és aszpartát metabolizmusában szerepet játszó gének expressziójának változása *C. albicans* jelenlétében HSC-2 sejtvonal esetében. A „transzkriptomika” feliratú grafikon mutatja a transzkriptomikai eredményekből származó génváltozás mértékét, míg a „qPCR” feliratú a validálás során alkalmazott qPCR eredményét mutatja az adott génre vonatkoztatva.  $n=3$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ), ns=nem szignifikáns. DLST - dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz; SUCLA2 - szukcinil-KoA ligáz  $\beta$ -alegység; ASNSD1 - aszparagin-szintetázt tartalmazó domén 1; glutamát-oxálacetát-transzamináz 1.





**27. ábra:** HSC-2 sejtvonalban *C. albicans* hatására upregulálódó MMP gének. A „transzkriptomika” feliratú grafikon mutatja a transzkriptomikai eredményekből származó génváltozás mértékét, míg a „qPCR” feliratú a validálás során alkalmazott qPCR eredményét mutatja az adott génre vonatkoztatva.  $n=3$ , párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ). MMP10 - mátrix metalloproteináz 10; MMP1 - mátrix metalloproteináz 1; MMP9 - mátrix metalloproteináz 9; MMP3 - mátrix metalloproteináz 3.

#### 6.2.4 *In vitro* transzkriptomikai analízis – értékelés

Az *in vitro* transzkriptomikai analízis molekuláris szinten is megerősíti azt az eredményt, miszerint az élő *C. albicans* sejtek jelenléte növeli az OSCC sejtek, elsősorban a HSC-2 sejtvonal, progresszióval összefüggő folyamatait. Az eredmények összecsengenek a migrációs, MMP aktivitási és metabolomikai vizsgálatokkal, miszerint a HI-*Candida*, a zimoján és az élő *C. parapsilosis* sejtek nem, vagy enyhe változást eredményeznek az OSCC sejtek progresszióját tekintve. Az élő *C. albicans* sejtek jelenlétében megfigyelt fenotipikus változásokat alátámasztják a transzkriptomikai vizsgálatok, mivel megemelkedett a szukcinát és aszpartát onkometabolitok metabolizmusában szerepet játszó gének expressziós szintje. Továbbá szignifikáns növekedést figyeltünk meg négy MMP

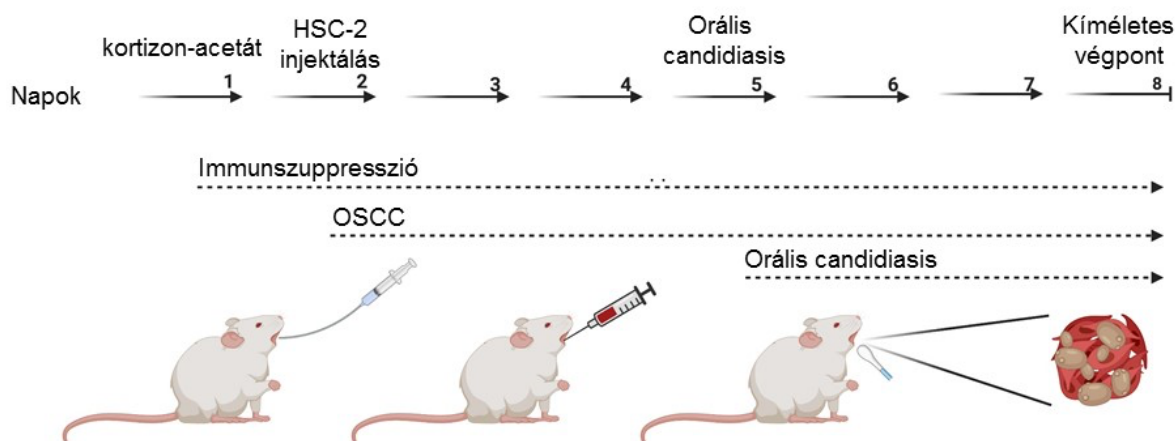
gén expressziós szintjében (MMP1, MMP10, MMP9, MMP3), amely szintén összecseng a szekretált összes MMP aktivitás vizsgálatok eredményeivel. A szakirodalmi adatokat elemezve azonosítottunk olyan OSCC markergéneket, amelyek expressziója szignifikánsan változik *C. albicans* jelenlétében. Tizennégy olyan OSCC progressziós markergént találtunk (ATF3, F3, FOS, FOXC2, HBEGF, IL6, INHBA, JUN, LIF, PHLDA1, PLAUR, PTHLH, SEMA7A, VEGFA), amelyek HSC-2 és HO-1-N-1 sejtekben is upregulálódtak élő *C. albicans* sejtek hatására. A HSC-2 sejtvonal esetében számos génexpressziós változást detektáltunk, amely lehetőséget biztosított további analízisek elvégzésére. A változó géneket vizsgálva olyan jelátviteli utak aktivációját is azonosítottuk, amelyeknek szerepe van az OSCC proliferációjában, inváziójában, tumornövekedésében, angiogenezisében és metasztázis képzésében. A HSC-2 sejtekben megváltozott expressziót mutató gének alapján végzett kauzális génkapcsolat vizsgálat a tumor progressziójával kapcsolatos folyamatokat prediktálta, amelyek élő *C. albicans* sejtek hatására bekövetkezhetnek. Ilyen folyamatok például a tumorsejtek proliferációja, túlélése, metasztázisa, angiogenezise, inváziója, viabilitása vagy a citotoxikus T-sejtek gátlása.

### **6.3 Az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo***

#### **6.3.1 Egy új xenograft egérmodell kidolgozása a *C. albicans* OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához**

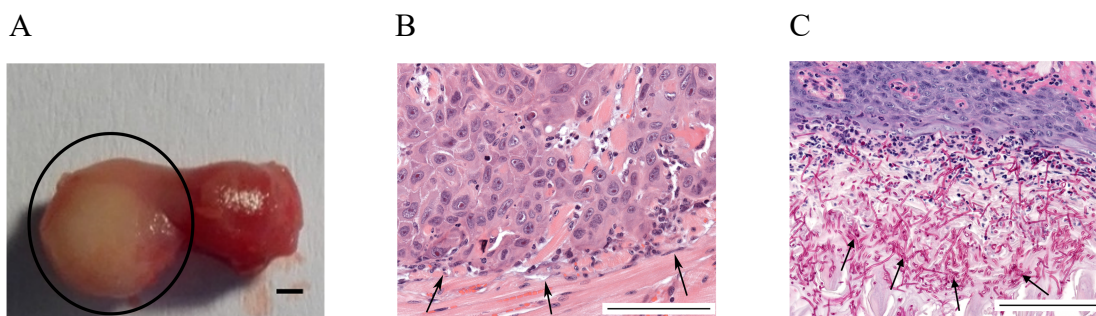
Munkánk során sikeresen létrehoztunk egy *in vivo* xenograft egérmodellt az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára. Ebben a modellben az OSCC tumorsejtek nincsenek direkt kapcsolatban a *C. albicans* sejtekkel, így csak az indirekt kapcsolatokon keresztül vizsgálható a hatás. Ilyen indirekt kapcsolat lehet például az immunrendszer által közvetített hatás vagy a gombák által termelt és szekretált extracelluláris vezikulák hatása. A tumor létrehozását az egérben genetikailag módosított egerek (pl. súlyos kombinált immunhiány - SCID, timozin hiányos egér - NUDE) segítségével lehet technikailag legegyszerűbben megvalósítani. Ezeknek a transzgenikus egereknek azonban hátrányuk, hogy részben vagy egészben hiányzik az adaptív immunitásuk, így nem lehet az immunrendszer OSCC-*Candida* kapcsolatában betöltött szerepét teljeskörűen vizsgálni. Ahhoz, hogy az OSCC-*Candida* kapcsolatot teljes immunológiai környezetben vizsgálhassuk, az immunszuppresszióhoz kortizon-acetát kezelést alkalmaztunk *per os* naponta. Továbbá előnye ennek az immunszuppresszálsási módszernek, hogy az OSCC esetén alkalmazott kemoradio-terápiához hasonló mieloszuppresszív állapotot eredményez.

Mivel a HSC-2 sejtvonal esetében láttunk nagyobb mértékű változást, ezért ezt a sejtvonalat használtuk az OSCC kialakításához. A tumor létrehozásához  $1 \times 10^6$  HSC-2 sejtet injektáltunk kortizon-acetáttal immunszuppresszálsált 6-8 hetes balb/c egerek nyelvébe. Az állatok nyelvében a tumorinjektálást követő harmadik napon szabad szemmel látható méretűre fejlődött a tumor. A tumorinjektálást követő harmadik napon orális candidiasist idéztünk elő úgy, hogy *C. albicans* sejtuszuspenzióba áztatott vattát helyeztünk az állatok nyelve alá 75 percre. Az egereket a kísérlet 8. napján termináltuk az előírásoknak megfelelően a csökkent aktivitás, valamint a 25%-os súlyvesztés miatt (28. ábra).



**28. ábra:** Az OSCC-orális candidiasis *in vivo* xenograft modell folyamatábrája. Első naptól kezdve az ötödik napig kortizon-acetát kezelés naponta, *per os*. A hatodik napon az orális candidiasis után kortizon-acetát kezelés intraperitoneálisan. A kísérlet második napján HSC-2 tumorsejtek injektálása az egér nyelvébe. Az ötödik napon orális candidiasis előidézése. Nyolcadik napon terminálás. Az ábra a BioRender.com honlapon készült.

A terminálást követően a tumort tartalmazó nyelvet kimetszettük, és validáltuk az OSCC, valamint az orális candidiasis kialakulását. A nyolcadik napon az átlagos tumorméret 5 mm átmérőjű volt (29. A ábra). A kimetszett nyelvmintából szövetszövetet készítettünk, majd H&E, valamint PAS festést végeztünk. Az immunhisztokémiai festések után tumorsejteket és a mukózában lévő gombahifát detektáltunk (29. A, B ábra). Az orális candidiasis sikerességét kolónia formáló egységek (CFU) számának meghatározásával is megerősítettük. A kimetszett nyelvekből készített homogenizátumból adott mennyiséget YPD táptalajra szélesztettünk, majd az inkubációs idő letelte után megszámoltuk a kolóniákat. A vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy  $10^5$ - $10^6$  CFU/nyelvszövet gramm volt a koncentráció, amely azonos a szakirodalomban fellelhető adatokkal<sup>117</sup>.



**29. ábra:** A kísérlet 8. napján kimetszett tumor. (A) A kísérlet 8. napján kimetszett reprezentatív egérnyelv. A bekarikázott rész mutatja a kifejlődött tumort. Méretjelző sáv: 1 mm. (B) Orális candidiasist el nem szenvedő állat hisztopatológiai képe, HE festés. A nyilak a tumor határát mutatják. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. (C) Tumorinjektáláson és orális candidiasison is átesett állat hisztopatológiai képe. PAS festés. A nyilak a mukózában található gombahifát mutatják. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m.

### 6.3.2 Az orális candidiasis elősegíti az OSCC progresszióját *in vivo*

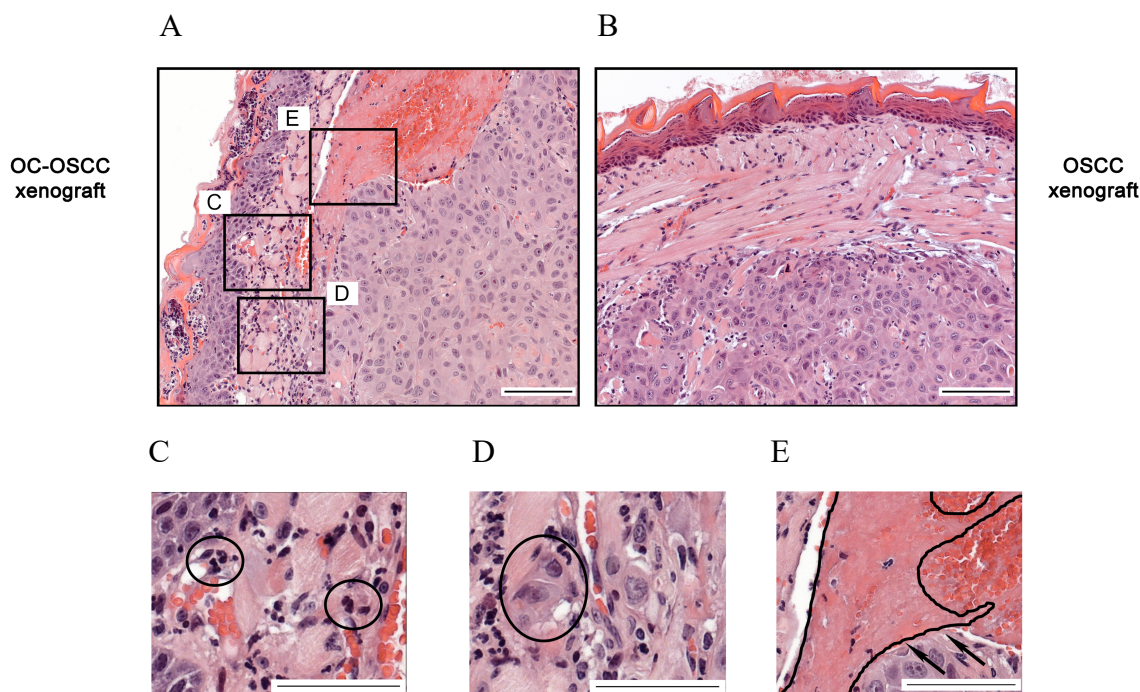
Miután sikeresen létrehoztuk és validáltuk az OSCC xenograft-orális candidiasis modellt, megvizsgáltuk, hogy a túlzottan elszaporodó *C. albicans* gombasejteknek van-e hatása az OSCC progressziójára *in vivo*. Ehhez két egércsoportot hoztunk létre. Az első csoport esetén csak tumorinjektálást végeztünk, a későbbiekben ezt a csoportot (kontroll) OSCC xenograftként jelöljük. A második egércsoport esetében a tumorinjektálást követően orális candidiasist (OC) idéztünk elő, ezt a csoportot a későbbiekben OC-OSCC xenograftként jelöljük. Ezzel a kísérleti felállással tudtuk vizsgálni a *C. albicans* gombasejtek humán HSC-2 OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatását. Mindegyik egércsoport 8-8 állatot tartalmazott, amelyek négy független kísérletből származtak. A tumorminták hisztopatológiai metszetét HE festést követően vakteszten a Szegedi Tudományegyetem Patológiai Intézet patológusa Prof. Dr. Tiszlavicz László elemezte. A patológiai elemzés szempontjai a gyulladás mértéke, nekrózis mértéke, infiltráló vagy pushing tumorszél, EMT-n átmenő sejtek jelenléte, invázió jelenléte, trombózis jelenléte, valamint peritumorális gyulladás voltak (2. táblázat).

**2. táblázat:** OSCC xenograft és OC-OSCC xenograft minták patológiai elemzése vakteszten. Gyulladás-0/1/2/3 (súlyosság szerint növekszik), nekrozis-0/1(megfigyelhető-e), tumorszél-I (infiltráló)/P (pushing), EMT-0/1/2/3 (leszakadó, magányos tumorsejtek jelenléte), invázió-0/1 (izmok között, ereken van-e tumorsejt), trombózis-0/1 (van-e vérrög) - Prof. Dr. Tiszlavicz László patológus értékelése alapján. Nem detektálható - 0; enyhe - 1; közepes - 2; fokozott - 3. n=8/csoport. A 8-8 egér 4 különböző kísérletből származott.

Egerek	OSCC xen. 1	OC- OSCC xen. 1	OSCC xen. 2	OC- OSCC xen. 2	OSCC xen. 3	OC- OSCC xen. 3	OSCC xen. 4	OC- OSCC xen. 4
Felszíni hám (gyulladás)	0	1	0	3	0	2	0	2
Nekrózis	0	1	1	1	1	1	1	1
Tumorszél	I	P/I	P	I	I	I	P	I
EMT	1	1	2	1	1	2	1	2
Invázió	1	1	1	1	1	1	2	2
Trombózis	0	1	1	2	0	1	0	0
Egerek	OSCC xen. 5	OC- OSCC xen. 5	OSCC xen. 6	OC- OSCC xen. 6	OSCC xen. 7	OC- OSCC xen. 7	OSCC xen. 8	OC- OSCC xen. 8
Felszíni hám (gyulladás)	0	3	0	3	0	3	0	2
Nekrózis	0	1	0	1	0	0	0	0
Tumorszél	I	P	I	P	P	I	P	P
EMT	2	2	1	2	1	3	1	2
Invázió	1	1	1	1	1	1	1	1
Trombózis	0	0	0	0	0	1	0	1

Az elemzés alapján elmondható, hogy a 8-8 egér mintáit összehasonlítva öt esetben magasabb volt az EMT értéke az orális candidiasist elszenvedő egerek mintáiban, mint a kontroll mintákban (OSCC xenograft). Trombózist öt OC-OSCC xenograft mintában detektáltunk, míg az OSCC xenograft minták közül csak egy esetén fordult elő. Az OC-OSCC xenograft minták esetén infiltráló immunsejteket figyeltünk meg, amelyek *C. albicans* indukálta gyulladásra utalnak (30. C ábra). Az OSCC xenograft mintákban nem figyeltünk meg gyulladást a felszíni hámban. Továbbá

nagyobb számú magányos, leszakadó tumorsejtek voltak jelen az OC-OSCC xenograft mintákban (30. D ábra). A gyulladáson és a leszakadó tumorsejteken kívül nagyobb mértékben volt jelen trombózis az OC-OSCC xenograft mintákban (30. E ábra).



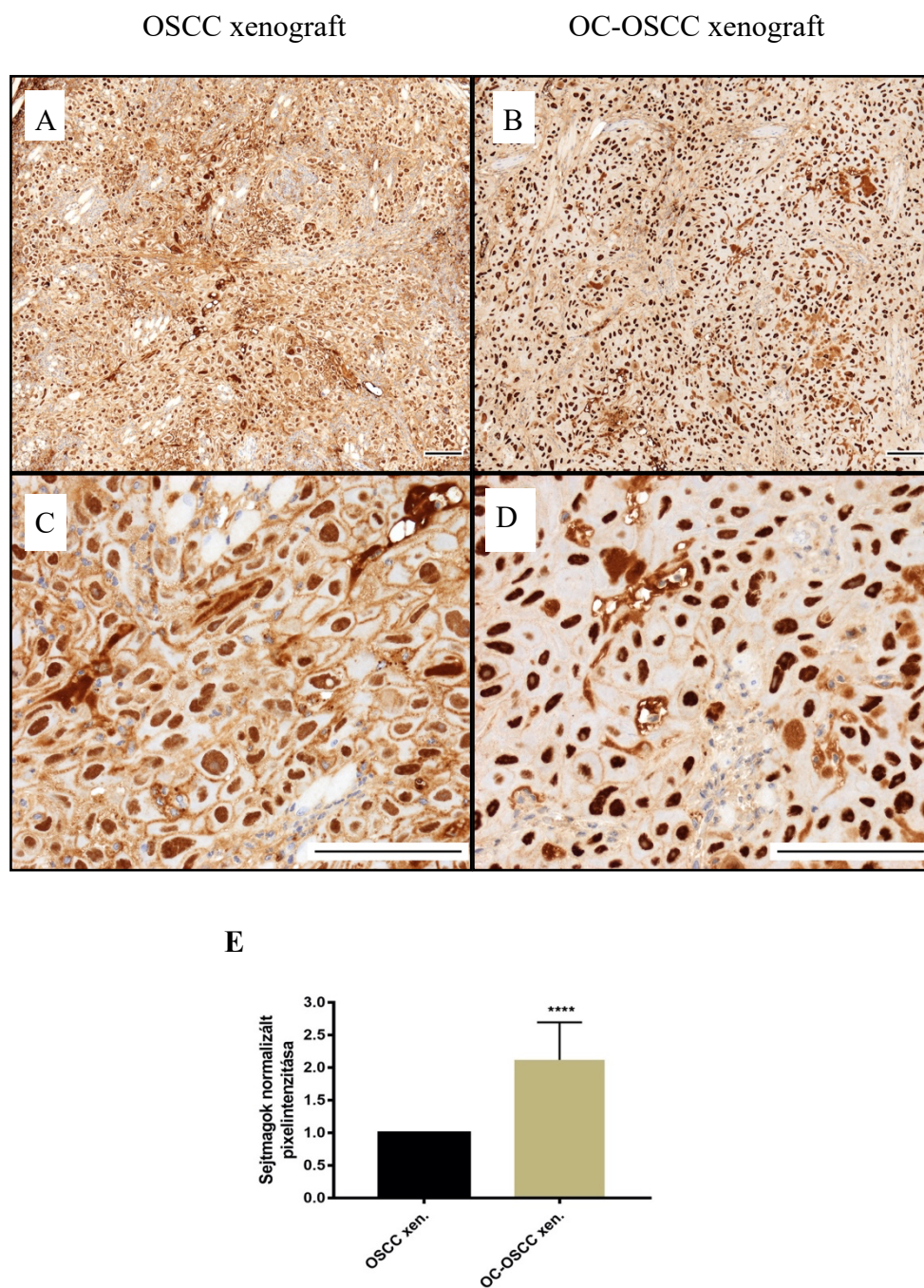
**30. ábra:** A kísérlet nyolcadik napján kimetszett nyelvek reprezentatív hisztopatológiai képe. (A) Reprezentatív kép az egyik OC-OSCC xenograft mintáról. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. (B) Reprezentatív kép az egyik OSCC xenograft mintáról. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. (C) Infiltráló immunsejtek az OC-OSCC xenograft mintákban, amely *C. albicans* okozta gyulladást jelöl. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. (D) Leszakadó tumorsejtek az OC-OSCC xenograft mintában, amely EMT-re utal. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. (E) Trombózis az OC-OSCC xenograft mintában. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m.

Az orális candidiasis növeli a p63 és vimentin, valamint csökkenti az E-cadherin expresszióját az OSCC hisztopatológiai mintákban. A p63 fehérje expressziójának vizsgálata egy megbízható módszer laphámsejtes karcinóma előrehaladottságának megállapítására. Az emelkedett expressziót mutató p63 fehérje rosszabb végkimenetelre, valamint a tumor előrehaladottabb állapotára utal<sup>181</sup>. Összehasonlítva az OSCC és OC-OSCC xenograft mintákat, az orális candidiasis jelenlétében magasabb szintű expressziót és a sejtmagba történő lokalizációt figyeltünk meg a kontroll (OSCC xenograft) szövetmetszetéhez képest (31. A, B, C, D ábra). Ezután megvizsgáltuk, hogy történik-e változás az EMT markerek expressziójában orális candidiasis hatására. Ennek érdekében



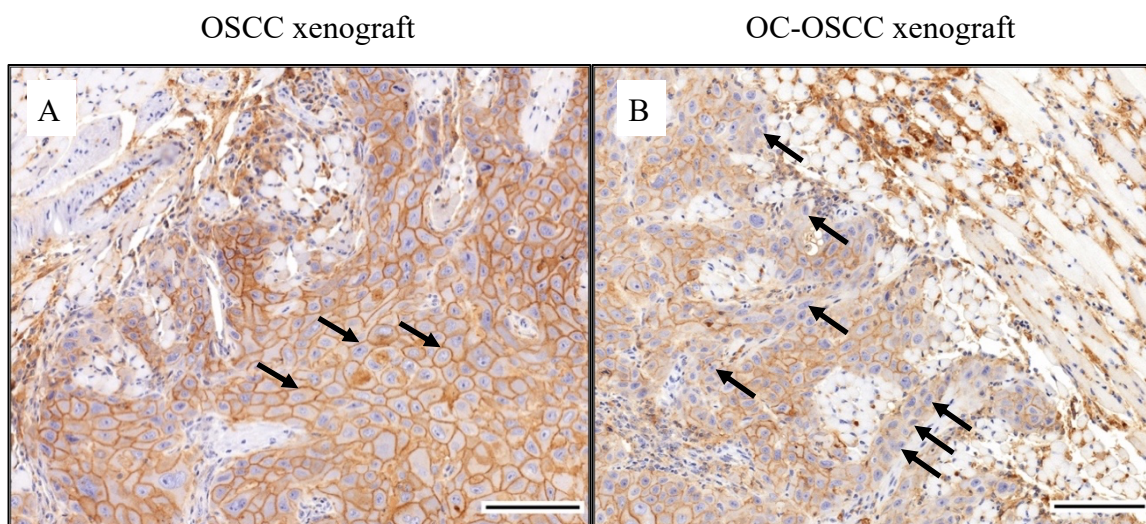
az E-cadherin és vimentin immunhisztokémiai festését végeztük el. Az eredmények alapján elmondható, hogy az OSCC xenograft mintákban erős E-cadherin membránpozitivitást figyeltünk meg, míg az OC-OSCC xenograft mintákban E-cadherin vesztést tapasztaltunk (32. ábra). A vimentin markert tekintve elmondható, hogy orális candidiasis hatására nő a tumorsejtek citoplazmájában a vimentin mennyisége, mivel az OC-OSCC xenograft mintákban több vimentin pozitív sejtet figyeltünk meg, mint az OSCC xenograft szövetmetszetekben (33. ábra). Az E-cadherin csökkenése és a vimentin mennyiségének növekedése EMT-re utal, amely a tumorprogresszióval hozható összefüggésbe.



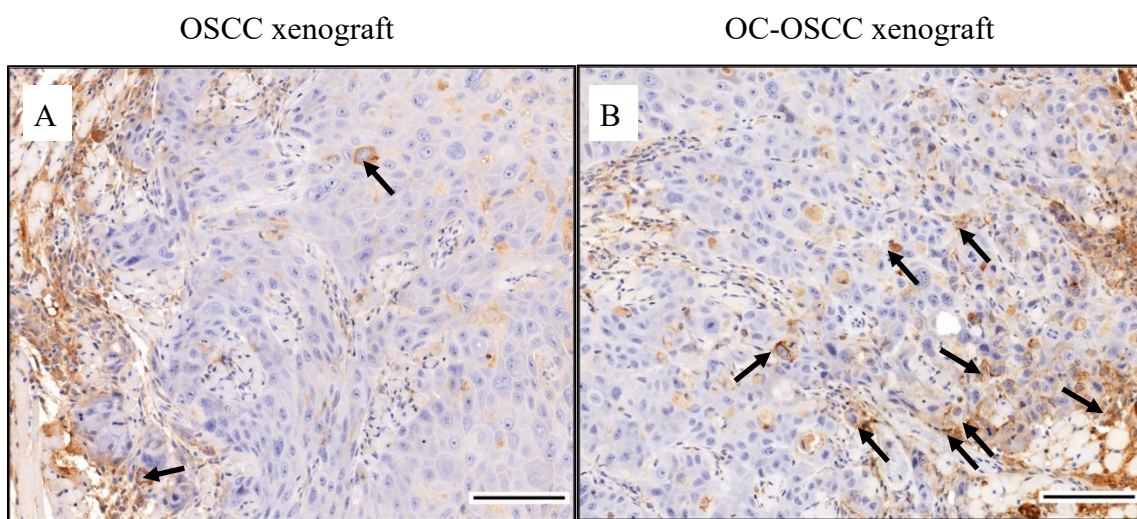


**31. ábra:** Az OSCC és OC-OSCC xenograft tumorminták p63 immunhisztokémiai festésének reprezentatív képe. (A, C): OSCC xenograft minta. A: 10x-es, C: 40x-es nagyítás. (B, D): OC-OSCC xenograft minta. B: 10x-es, D: 40x-es nagyítás. Méretjelző sáv: 100  $\mu$ m. n=8/csoport, a 8-8 egér 4 független kísérletből származott. A képeken látható, hogy orális candidiasis hatására erősebb p63 festődés figyelhető meg a sejtmagokban. Ezt a különbséget mindegyik OC-OSCC mintán megfigyeltük. (E) Az OSCC és OC-OSCC xenograft minták összehasonlítása sejtmagjuk pixelintenzitása (p63 festődés mértéke) alapján. n=15 (sejtmag), párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns.





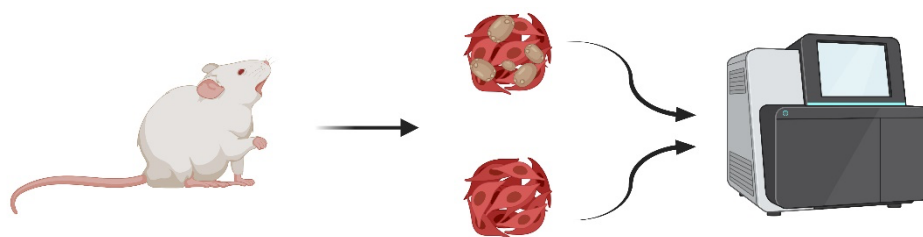
**32. ábra:** Az OSCC és OC-OSCC xenograft tumorminták E-cadherin immunhisztokémiai festésének reprezentatív képe. (A): OSCC xenograft minta. A nyilak az E-cadherin pozitivitást mutatják a sejtek membránjában. Méretjelző sáv: 100 µm. (B): OC-OSCC xenograft minta. A nyilak a sejtek membránjából történő E-cadherin veszteséget mutatják. Méretjelző sáv: 100 µm. n=8/csoport, a 8-8 egér 4 független kísérletből származott. A kontrollhoz viszonyított E-cadherin veszteséget mindegyik OC-OSCC mintán megfigyeltük.



**33. ábra:** Az OSCC és OC-OSCC xenograft tumorminták vimentin immunhisztokémiai festésének reprezentatív képe. (A): OSCC xenograft minta. Méretjelző sáv: 100 µm. A nyilak a vimentin-pozitív sejteket mutatják (B): OC-OSCC xenograft minta. A nyilak a vimentin-pozitív sejteket mutatják. Méretjelző sáv: 100 µm. n=8/csoport, a 8-8 egér 4 független kísérletből származott. A kontrollhoz viszonyított intenzívebb vimentin pozitivitást mindegyik OC-OSCC mintán megfigyeltük.

### 6.3.3 Az orális candidiasis növeli az OSCC progresszióját különböző gének expressziójának befolyásolásával *in vivo*

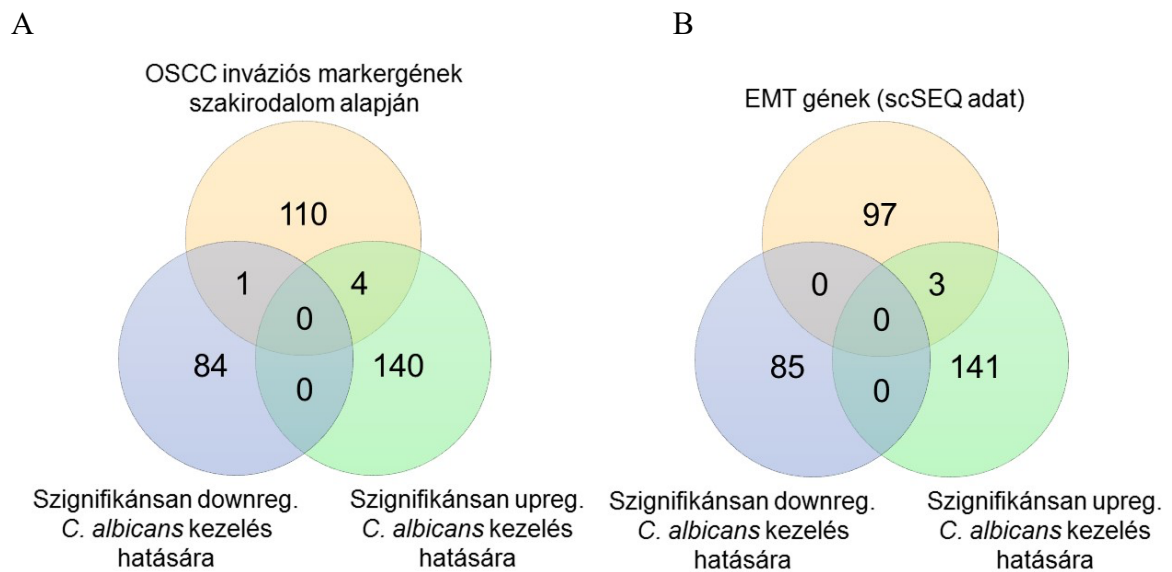
A hisztopatológiai eredményekből arra következtettünk, hogy az orális candidiasis jelenléte elősegíti az OSCC progressziót. Az ennek hátterében álló molekuláris folyamatok feltérképezése érdekében transzkriptomikai vizsgálatokat végeztünk. Összehasonlítottuk az OSCC xenograft modellben lévő HSC-2 sejtek transzkriptómját az orális candidiasist is elszenvedő állatok tumormintáját adó HSC-2 sejtek transzkriptómjával (34. ábra). A vizsgálathoz négy OSCC xenograft egér, illetve négy OC-OSCC egér mintáit használtuk fel. A bioinformatikai analízis során a mintákból származó szekvenciákat ráillesztettük humán (*Homo sapiens*), illetve egér (*Mus musculus*) referenciagenomjára, hogy el tudjuk különíteni a tumor (humán HSC-2) és az egér eredetű szekvenciákat.



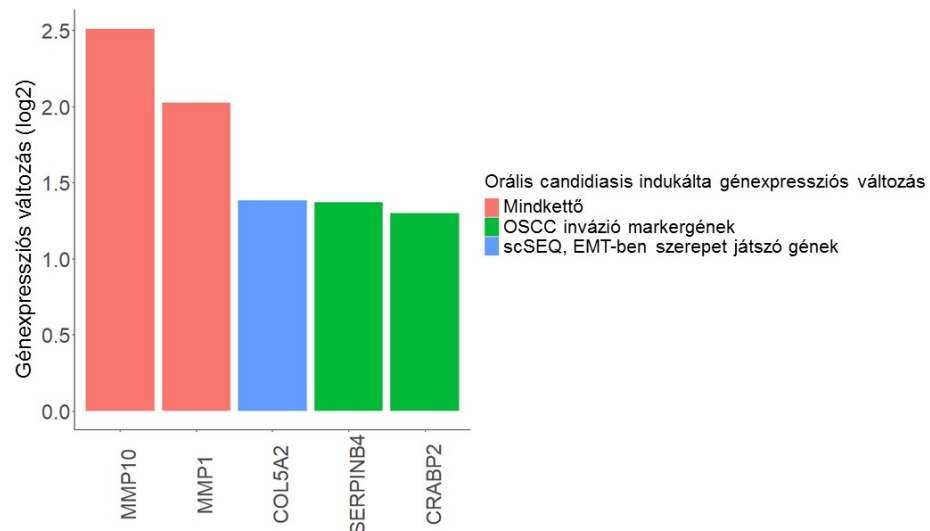
**34. ábra:** Az *in vivo* tumorminták transzkriptomikai analízise. Humán HSC-2 sejtek transzkriptómjának összehasonlítása (OSCC xenograft tumorminta) az orális candidiasist elszenvedett állatok (OC-OSCC xenograft tumorminta) tumorállományát adó humán HSC-2 sejtek transzkriptómjával. n=4/csoport. Az ábra a BioRender.com honlapon készült.

A bioinformatikai analízis alapján elmondható, hogy orális candidiasis hatására 229 gén expressziós szintje (144 upreguláció, 85 downreguláció) változott meg a HSC-2 sejtekben *in vivo*. A változó gének közül 5 olyan gént azonosítottunk (MMP10, MMP1, SERPINB4 – szerpin B család 1-es tagja és CRABP2 - celluláris retinsav-kötő fehérje 2 upregulálódott; MMP7 downregulálódott), amelyeknek szerepe van az OSCC invázióban a már fentebb említett, szakirodalomból kigyűjtött génlista alapján (35. A ábra). Továbbá 3 olyan gént találtunk, amelyek a korábban említett egy-sejt szekvenálási tanulmány alapján az EMT-ben játszanak szerepet (MMP10, MMP1 és COL5A2 - V-ös típusú kollagén alfa 2 lánc upregulálódott) (35. B ábra). Érdekes eredmény, hogy az MMP1 és MMP10 mindkét irodalmi adat alapján szerepet játszik az OSCC invázióban, és orális candidiasis hatására

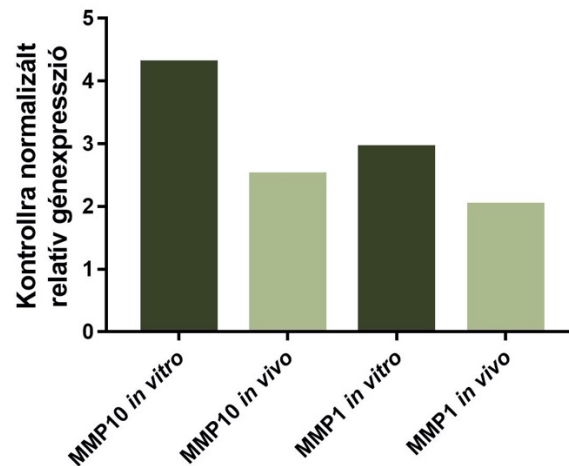
upregulálódik (36. ábra). Továbbá fontos megemlíteni, hogy az MMP1 és MMP10 gének expressziós szintje *in vitro* és *in vivo* is megemelkedett (37. ábra).



**35. ábra:** *In vivo* minták transzkriptomikai analíziséből származó eredmények. Az orális candidiasis hatására változó gének analízise. (A) Orális candidiasis hatására változó gének, valamint a szakirodalmi adatok alapján OSCC markergének összehasonlítása. (B) Orális candidiasis hatására változó gének, valamint 18 betegből származó minták egy-sejt szekvenálási adataiból származó (scSEQ), EMT-vel összefüggő gének összehasonlítása. n=4/csoport.

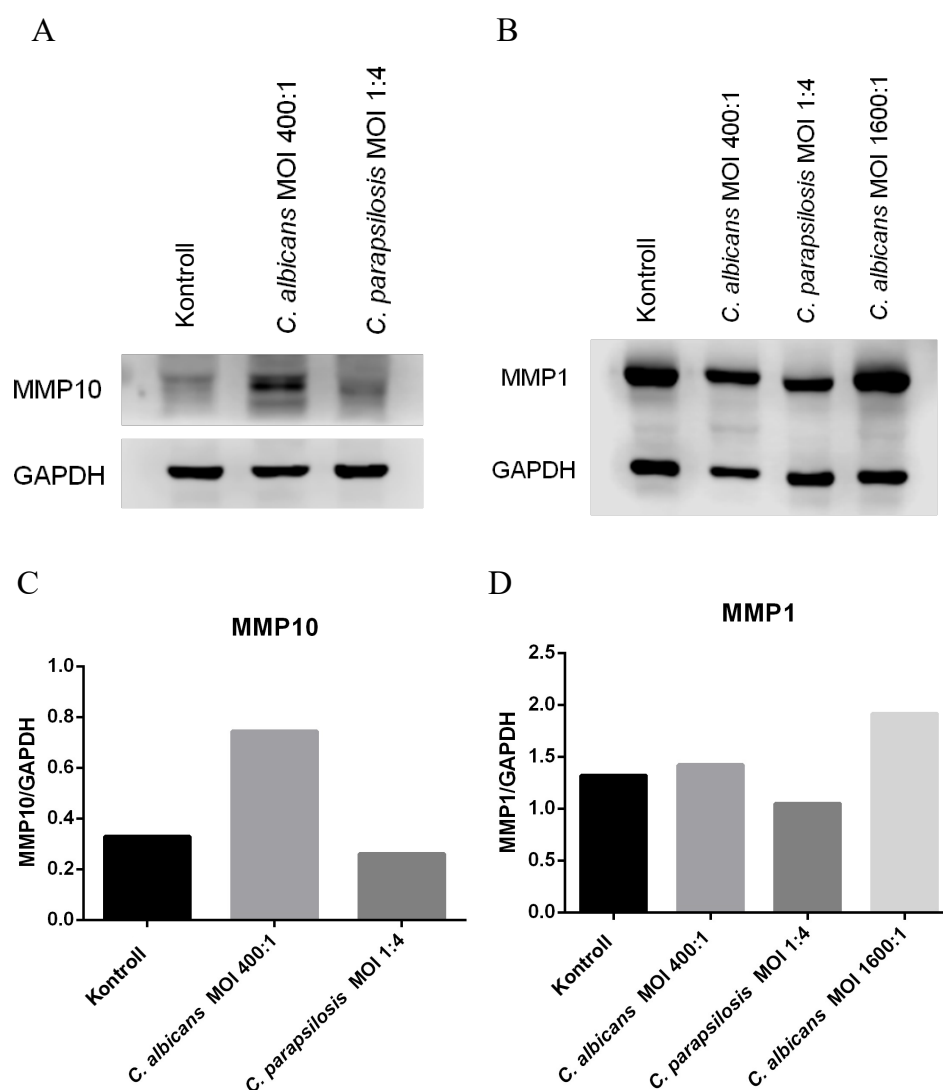


**36. ábra:** Orális candidiasis által indukált gének változása (log2) az *in vivo* tumor xenograft mintákban (HSC-2 sejtvonal). A grafikonon azok a gének vannak feltüntetve, amelyek átfedésben vannak a szakirodalomban azonosított markergénekekkel (zöld) vagy az egy-sejt szekvenálás eredményéből azonosított EMT génekekkel (kék), illetve amelyek mindegyik adathalmazban előfordultak (piros).



**37. ábra:** Az *in vitro* és *in vivo* transzkriptomikai adatok összehasonlítása. *C. albicans* hatására megemelkedett az MMP1 és MMP10 génexpressziós szintje *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

Az MMP10 és MMP1 mátrix metalloproteinázok szintje a transzkriptomikai elemzések alapján *in vitro* és *in vivo* egyaránt szignifikánsan megemelkedett *C. albicans* kezelés hatására. Ezt az eredményt HSC-2 sejteken qPCR-rel (27. ábra) és Western blot analízissel (38. ábra) is validáltuk *in vitro*.



**38. ábra:** HSC-2 sejtek MMP10 és MMP1 mátrix metalloproteinázok Western blot analízise *in vitro*. (A) MMP10 fehérje Western blot analízise. (B) MMP1 fehérje Western blot analízise. (C) MMP10 Western blot elemzésből származó denzitometrálas alapján mért relatív fehérje expresszió. (D) MMP1 Western blot elemzésből származó denzitometrálas alapján mért relatív fehérje expresszió. MMP10 - mátrix metalloproteináz 10; MMP1 - mátrix metalloproteináz 1; GAPDH - glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz; MOI- fertőző sejtek és a fertőző ágens aránya (tumorsejt:gombasejt). n=3, az ábra reprezentatív.



#### 6.3.4 Az orális candidiasis OSCC progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo* – értékelés

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk az orális candidiasis hatását az OSCC progressziójára, sikeresen létrehoztunk egy *in vivo* xenograft egérmodellt, amelyben immunszuppresszált egerek nyelvében OSCC-t, majd orális candidiasist idéztünk elő. Ezután összehasonlítottuk az orális candidiasist elszenvedő és el nem szenvedő állatcsoportokat. A hisztopatológiai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy *C. albicans* hatására erős gyulladás alakult ki. A gyulladás hozzájárulhat a tumorprogresszióhoz és a metasztázishoz azáltal, hogy tumorprogressziót elősegítő citokinek termelődnek. Emellett a gyulladás megváltoztathatja a tumor mikrokörnyezetet, így tumornövekedést, túlélést, angiogenezist és reaktív oxigéngyökök termelését indukálhatja<sup>40</sup>. A hisztopatológiai vizsgálatok során EMT-t és trombózist is megfigyeltünk orális candidiasis hatására. Az EMT kulcsszerepet játszik a tumorinvázió és a metasztázis folyamataiban<sup>182</sup>. A trombózis is bizonyítottan elősegíti a tumor progresszióját<sup>183</sup>, azonban a pontos mechanizmusok részleteiben még nem ismertek.

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk az orális candidiasis tumorprogressziót elősegítő szerepéről, a p63, E-cadherin és vimentin immunhisztokémiai festését végeztük el. A p63 fehérjét a *TP63* gén kódolja, amely a *TP53* gén (p53 fehérje) homológja. A *TP63* génnek két splice variánsa ismert. Az egyik a TAp63, amely tartalmazza az NH<sub>2</sub>-terminális transzaktivációs domént, illetve a ΔNp63, amely nem tartalmazza az NH<sub>2</sub>-terminális transzaktivációs domént. A ΔNp63 splice variánsnak fontos szerepe van az OSCC progresszióban azáltal, hogy lefoglalja a kötőhelyeket, így a TAp63 és p53 nem képesek ellátni funkciójukat<sup>184,185</sup>. Emiatt a p63 túltermelődése jól alkalmazható prognosztikai markerként laphámsejtes karcinóma esetén<sup>184</sup>. Az *in vivo* minták esetén elmondható, hogy orális candidiasis hatására magasabb szinten expresszáldott, valamint lokalizálódott a sejtmagban a p63 fehérje. qPCR segítségével ellenőriztük, hogy az általunk használt HSC-2 sejtvonalban a ΔNp63 splice variáns expresszáldódik (6. melléklet). A vimentin egy citoskeletális fehérje, amelyet a mesenchimális sejtek expresszálnak (fibroblasztok, endotél sejtek, limfociták), egészséges epiteliális sejtek pedig nem expresszálják. Laphámsejtes karcinóma esetén a vimentin expressziója metasztázissal és rosszabb prognózissal hozható összefüggésbe<sup>186–189</sup>. A hisztopatológiai minták esetében orális candidiasis hatására több vimentin-pozitív sejtet detektáltunk, mint a kontroll minták esetében.

Az E-cadherin egy 120 kDa-os transzmembrán adhéziós fehérje, amely az epitélsejtek esetében a sejt-sejt kapcsolatokban játszik fontos szerepet, valamint részt vesz az apoptózis indukálásában<sup>190</sup>. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a csökkent E-cadherin mennyiség egy jól használható marker a tumor növekedett inváziós kapacitásának kimutatására<sup>191</sup>. Az orális candidiasis hatására E-cadherin csökkenést figyeltünk meg az *in vivo* tumormintákban. A *C. albicans* általi emelkedett p63, vimentin és csökkent E-cadherin expresszió arra enged következtetni, hogy a túlszaporodott *C. albicans* sejtek növelik az EMT folyamatát, amely rosszabb végkimenetelre utal a betegek túlélését tekintve.

A hisztopatológiai eredményeket megerősítették az *in vivo* transzkriptomikai eredmények. Öt olyan gént azonosítottunk, amelyek szerepet játszanak az OSCC progressziójában, és orális candidiasis esetében nő a génexpressziós szintjük (MMP1, MMP10, COL5A2, SERPINB4, CRABP2). Fontos kiemelni az MMP1-et és az MMP10-et, mivel az *in vitro* vizsgálatok is kimutatták, hogy a *C. albicans* növeli az összes szekretált MMP aktivitást.



## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

A szájüregi laphámsejtes karcinóma komoly egészségügyi problémát jelent világszerte. A tumorterápia következtében gyakran szájüregi candidiasis alakul ki, amely további egészségügyi kihívásokat okoz. Ezenkívül több tanulmány is összefüggésbe hozta a *Candida* gombákat a szájüregi laphámsejtes karcinóma kialakulásával. A *Candida*-OSCC közti kapcsolatról számos tanulmány beszámolt, azonban az ok-okozati összefüggések részleteiben még nem ismertek<sup>148,150,152–155,192</sup>. A *Candida*-OSCC kapcsolatát bizonyítja laboratóriumunk egy korábbi tanulmánya, miszerint OSCC esetén megváltozik a szájban élő élesztőgombák mennyisége és diverzitása. A tumoros szájüregben több és többféle élesztőgomba volt jelen, mint az egészséges szájüregben, valamint a tumor felszínén is több élesztő volt detektálható az egészséges felszínhez képest<sup>138</sup>. A *Candida* gombák hozzájárulhatnak a karcinogenezishez például nitrózaminok termelése által<sup>193</sup>. Ezek a karcinogének képesek hibákat okozni a DNS replikációja során, ezáltal mutációkat idézhetnek elő. A pontmutációk onkogéneket aktiválhatnak, amelynek következtében szájüregi tumor alakulhat ki. Továbbá proinflammatorikus citokinek termelődésének aktivációja révén karcinogén lehet az acetaldehid, amely a metanol metabolizmusából származik. Mindkét karcinogén csoport összefüggésbe hozható a *Candida* gombákkal<sup>194</sup>. A *Candidák* karcinogén hatása miatt feltételezhető, hogy nemcsak a karcinogenezisben játszanak szerepet, hanem a tumor progressziójában is.

A *C. albicans* és *C. parapsilosis* a szájüreg természetes mikroflórájának része<sup>195</sup>. Mindkét gombafaj opportunistáknak humánpatogén, azonban a *C. albicans* gyakrabban okoz orális candidiasist a *C. parapsilosis*hoz képest<sup>196</sup>. A *C. albicans* képes valódi hifát képezni, ezzel szemben a *C. parapsilosis* csak pseudohifa létrehozására képes<sup>197,162</sup>. A valódi hifaképzés képessége fontos tulajdonság a gazdaszervezet károsodása, valamint a gazda által adott immunválasz szempontjából. Mindkettő a hifa-forma által termelt candidalizin jelenlétéhez köthető. A candidalizin egy pórusképző fehérjetoxin, amely képes a gazda epitelsejtjeinek károsítására, valamint a patogénre adott „danger” válasz útvonalak aktiválására, amely citokinek és kemokinek szekréciójához vezet<sup>198</sup>. A szakirodalmi adatok alapján egyértelmű kapcsolat van az OSCC és az orális candidiasis között. Azt is feltételezték eddig, hogy az orális candidiasisnak szerepe lehet a tumor progressziójában, azonban ezt még nem vizsgálta eddig senki. Munkánk során ezért célul tűztük ki ennek a jelenségnek a vizsgálatát.

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a hőinaktivált *Candida* gombasejteknek és a zimozánnak van-e valamilyen tumorprogresszióra gyakorolt hatása. Ezzel a gombasejtfal és az OSCC között kialakuló direkt kapcsolatot tudtuk elemezni. Vizsgáltuk a tumorsejtek proliferációs és migrációs aktivitását a különböző gombastimulusok jelenlétében. A HI gomba és a zimoján jelenléte nem befolyásolta a tumorsejtek proliferációs aktivitását, azonban a HO-1-N-1 sejtvonal migrációs aktivitásában enyhe szignifikáns növekedést detektáltunk. Mivel az élő gombák esetében nemcsak direkt, hanem indirekt kapcsolatok is szerepet játszhatnak az interakcióban, ezért videófelvételt készítettünk a tumorsejtek migrációjáról élő *Candida* sejtek jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a HSC-2 sejtvonal sejtjei élő *C. albicans* sejtek jelenlétében egymástól elszakadva, magányosan vándorolnak. A folyamatban feltehetően szekretált molekulák és vezikulák is szerepet játszanak, mivel a gombatelepektől kissé távolabb is megfigyeltük ezt a jelenséget. Élő *C. parapsilosis* esetében nem tapasztaltunk változást a kontroll sejtekhez képest.

Ezután vizsgáltuk a tumorsejtek szekretált MMP aktivitását a különböző gombastimulusok jelenlétében. Az MMP-k elősegítik a tumorprogressziót az extracelluláris mátrix degradálása révén, így lehetősége nyílik egy-egy tumorsejtnak, hogy eljusson a szervezet egy másik pontjára és áttétet képezzen. Eredményeink alapján elmondható, hogy a HI gombák jelenléte ugyan enyhe, de szignifikáns növekedést eredményezett a HSC-2 sejtek szekretált MMP aktivitásában. Ezzel szemben az élő *C. albicans* sejtek mindkét sejtvonal esetében nagymértékű szignifikáns szekretált összes MMP aktivitás növekedést eredményeztek. Az élő *C. parapsilosis* sejtek esetében nem figyeltük meg ezt a jelenséget. Fontos kiemelni, hogy a transzkriptomikai eredmények alátámasztják ezt az eredményt, mivel élő *C. albicans* jelenlétében több MMP gén expressziós szintje is megemelkedett a HSC-2 sejtvonal esetében.

Mivel a metasztatikus tumorsejtek sajátos metabolomikai profillal rendelkeznek, ezért megmértük a glikolízis és citrátkör intermedierek és különböző aminosavak mennyiségének változását a különböző gombastimulusok jelenlétében. A HI gombasejtek és a zimoján jelenlétében csak enyhe változást figyeltünk meg, illetve a változó metabolitokból nem tudtunk tumorprogresszióra vonatkozó összefüggéseket megállapítani. Ezzel szemben az élő *C. albicans* sejtek jelenléte szignifikánsan megnövelte az aszpartát és a szukcinát, valamint lecsökkentette a glicerinaldehid-3-foszfát mennyiségét az OSCC sejtekben. A transzkriptomikai eredmények alátámasztják ezeket az eredményeket, mivel HSC-2 sejtvonal esetében élő *C. albicans* kezelést

követően megemelkedett a GOT1, DLST, SUCLA2, ASNSD1 gének expressziós szintje, amely gének szerepet játszanak az aszpartát és szukcinát metabolizmusában. A szukcinát és aszpartát növekedése szerepet játszik a tumor progressziójában, azaz onkometabolitoknak tekinthetők.

Az *in vitro* metasztázissal összefüggésbe hozható eredmények molekuláris hátterének feltárása érdekében transzkriptomikai vizsgálatokat végeztünk. HI-*Candida* sejtek, zimoján és élő *C. parapsilosis* jelenlétében nem történt jelentős változás génexpressziós szinten. A két sejtvonalat összehasonlítva elmondható, hogy a HSC-2 sejtek esetében több gén expressziós szintje változik élő *C. albicans* kezelés hatására, mint a HO-1-N-1 sejtekben. Mindkét sejtvonal esetében azonosítottunk olyan géneket, amelyek expressziós szintje megemelkedik élő *C. albicans* sejtek jelenlétében, valamint szakirodalmi adatok alapján szerepet játszanak az OSCC progressziójában. Tizennégy olyan gént azonosítottunk ezek közül, amelyek expressziós szintje mindkét sejtvonalban megemelkedett (ATF3, F3, FOS, FOXC2, HBEGF, IL6, INHBA, JUN, LIF, PHLDA1, PLAUR, PTHLH, SEMA7A, VEGFA).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az orális candidiasis OSCC sejtek progressziójára gyakorolt hatását *in vivo*, létrehoztunk egy egér OSCC xenograft modellt. HSC-2 tumorsejteket injektáltunk vad típusú immunszuppresszált balb/c egerek nyelvébe az OSCC létrehozásához. Az orális candidiasis tumorprogresszióra gyakorolt hatását úgy vizsgáltuk, hogy összehasonlítottuk az OSCC xenograft állatok mintáit az orális candidiasist is elszenvedő OSCC xenograft állatok mintáival. Az orális candidiasis hatására infiltráló immunsejteket detektáltunk az állatok nyelvében, amelyek gyulladást jeleznek. A gyulladás elősegítheti a tumorprogressziót, metasztázist és az inváziót. A gyulladás mellett nagyobb mértékben figyeltünk meg trombózt az orális candidiasist is elszenvedő állatok mintáiban, amely szintén a *C. albicans* tumorprogressziót promótáló hatását jelzi.

Az EMT fontos szerepet játszik a tumorprogresszióban. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az orális candidiasis EMT-re gyakorolt hatását, elvégeztük a tumorminták immunhisztokémiai festését. Eredményeink alapján elmondható, hogy magasabb szintű p63 és vimentin, valamint alacsonyabb szintű E-cadherin expressziót figyeltünk meg azokban a metszetekben, ahol az állatok orális candidiasist is elszenvedtek. Ez alátámasztja eddigi eredményeinket, miszerint az emelkedett *C. albicans* jelenlét hozzájárul az OSCC EMT folyamataihoz.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *in vivo* minták transzkriptomikai változásait, összehasonlítottuk az OSCC xenograft és az OC-OSCC xenograft minták génexpressziós profilját. Sikerült azonosítanunk OSCC invázióban szerepet játszó géneket, amelyek génexpressziós szintje megemelkedik orális candidiasis hatására (MMP1, MMP10, COL5A2, SERPINB4, CRABP2). Érdekes eredmény, hogy az MMP1 és MMP10 génexpressziós szintje *in vitro* és *in vivo* egyaránt megemelkedett.

**Összegzőként a következő eredmények eléréséről számolhatunk be:**

**Munkánk során bizonyítottuk, hogy az orális candidiasis valóban elősegíti a szájüregi laphámsejtes karcinóma progresszióját azáltal, hogy direkt és indirekt módon növeli az invázióban és a tumor progressziójában szerepet játszó gének expresszióját, MMP aktivitását, onkometabolitok termelődését, a gyulladás mértékét és EMT folyamatát *in vitro* és *in vivo*.**

**Az OSCC esetén a tumorterápia következtében gyakran kialakul orális candidiasis, ezáltal csökken a betegek túlélési esélye. Emiatt célszerű a tumorterápiával egyidőben az antifungális szerek alkalmazása az orális candidiasis kialakulásának elkerülése érdekében.**

## 8 SUMMARY

OSCC is highly associated with the presence of oral candidiasis. However, the details of the cause versus causative relationship are not understood<sup>148,150,152–155,192</sup>. Our previous study showed that the diversity of the oral fungal microflora of OSCC patients is remarkably different from healthy individuals: the fungal burden and diversity of yeasts was significantly higher in patients with oral tumors compared to the oral cavity of healthy individuals. Furthermore, fungal colonisation in the oral cavity in patients with OSCC is higher on the neoplastic epithelial surface compared to healthy surfaces, which indicates a positive association between oral yeast carriage and epithelial carcinoma<sup>138</sup>. *Candida* might induce carcinogenesis by the production of carcinogenic compounds, for example, nitrosamines<sup>193</sup>. These carcinogens bind to bases, phosphate residues, and/or hydrogen bonding sites of DNA that could interfere with DNA replication. Induced point mutations might activate oncogenes and initiate the development of oral cancer. Accumulation of acetaldehyde, a by-product of ethanol metabolism that is also considered to be carcinogenic, and the induction of proinflammatory cytokines could also contribute to oral cancer development<sup>194</sup>, both of which are triggered by the presence of *Candida* cells.

*C. albicans* and *C. parapsilosis* both are common commensals of the oral cavity<sup>195</sup>. Both are also opportunistic human pathogenic fungi, although *C. albicans* is more frequently associated with oral candidiasis compared to *C. parapsilosis*<sup>196</sup>. *C. albicans* is truly polymorphic, due to its ability to form hyphae and/or pseudohyphae<sup>197</sup>. Concerning *C. parapsilosis*, this species does not produce true hyphae but can generate pseudohyphae that are characteristically large and curved<sup>162</sup>. Hypha formation is critical for host cell damage and immune activation, which are both driven by the secretion of Candidalysin, a peptide toxin. Candidalysin damages epithelial membranes and activates danger response pathways, which results in immune activation and the secretion of cytokines and chemokines<sup>198</sup>.

To date, there is increasingly strong evidence that suggests that the development of oral candidiasis in oral tumor patients enhances progression events that could result in poor prognosis. Despite of this, no study has effectively investigated this phenomenon and characterized the potential underlying mechanisms for *Candida* enhancing OSCC development and progression. In this study, we aimed to investigate

fungus-specific molecular mechanisms that could facilitate and enhance cancer development or progression.

To examine the effect of the increased fungal burden on oral tumor progression, first we analyzed the direct connection between fungal cell wall components and OSCC by treating OSCC cells with HI-*C. albicans*, HI-*C. parapsilosis* and zymosan. To examine the potential pro-tumor effect of direct cell-cell interactions, first host cell proliferation and migration were assessed. During our experiments we could not detect any significant changes in host cell proliferation after the applied stimuli; however, the migration activity of the HO-1-N-1 cell line significantly increased after HI-fungal and zymosan treatment. Live cell imaging revealed separately migrating HSC-2 tumor cells from the edges of the disrupted regions of the tumor monolayer after exposure to live *C. albicans* cells. As several of the segregated cells appeared distinctly from the plate-attached hyphae of *C. albicans* cells, we assume that an indirect interaction could also take place between tumor and yeast cells possibly through secreted molecules or extracellular vesicles. This may play a role in tumor progression by the enhancement of invasion. No such phenomenon was observed in the presence of live *C. parapsilosis* cells. Matrix metalloproteinases (MMPs) are essential to the tumor metastasis processes, as their secretion degrades components of the extracellular matrix elements, facilitating the migration of individual malignantly transformed cells. Notably, as a result of HI fungal challenge and zymosan treatment, we detected a slight increase in secreted MMP activity. Additionally, live *C. albicans* treatment resulted in a marked increase in MMPs activity, supporting the hypothesis that *C. albicans* can increase tumor invasion by the activation of MMPs. Live *C. parapsilosis* treatment did not trigger an increase in MMP concentrations. Our transcriptomic results also support this finding as *C. albicans* induced the expression of several MMP genes in the HSC-2 cell line.

Metastatic tumor cells have unique metabolic profiles. For this reason, we examined the concentrations of glycolysis, TCA cycle intermediates and some amino acids with HPLC-HRMS with and without exposure to *Candida* or zymosan. Metabolic analysis revealed that HI-*Candida* and zymosan treatments result in only a slight and inconsistent alteration in the production of a few metabolites. In contrast, live *C. albicans* cells increased the amount of aspartic acid and succinic acid and decreased the amount of glyceraldehyde-3P in both OSCC cell lines. Transcriptomic and qPCR results also support these findings. Gene expression of GOT1, DLST and SUCLA2, involved

in aspartic and succinic acid synthesis, was significantly increased. Aspartate and succinate are playing role in tumor progression, considered as oncometabolites.

Transcriptome analysis results also supported our *in vitro* findings as the presence of live *C. albicans* cells alters the metastatic features of OSCC cells, while HI-*Candida* and zymosan stimuli had a mild effect. Comparing the two cell lines, HSC-2 showed more prominent responses to live *C. albicans* treatment in terms of the activation of genes and pathways than HO-1-N-1 cells. In both cell lines, we identified several *C. albicans*-induced genes that are involved in OSCC invasion and metastasis regulation. Among the overlapping genes, there were 14 *C. albicans*-induced genes (ATF3, F3, FOS, FOXC2, HBEGF, IL6, INHBA, JUN, LIF, PHLDA1, PLAUR, PTHLH, SEMA7A, and VEGFA) whose expression increased in both cell lines.

To examine whether live *C. albicans* enhances invasion and metastatic activity of OSCC *in vivo*, we developed a novel *in vivo* mouse model of OSCC and oral candidiasis. Human HSC-2 OSCC cells were injected into the tongue of the immunosuppressed BALB/c mice. After oral tumor development, xenograft mice were infected with *C. albicans* to induce oral candidiasis development. During the subsequent experiments, yeast-free tumor samples were compared to *C. albicans*-colonized tumors derived from the xenograft groups. In the OC-OSCC tongues, infiltrating immune cells were observed on the mucosa, which was further characterized as having severe inflammation caused by *C. albicans*. Signs of inflammation could also be observed in the tumor tissue. Inflammatory cells promote the development, advancement, and metastasis of cancer by producing tumor-promoting cytokines. Thrombosis was also detected in 3 OC-OSCC xenograft samples. The relationship between thrombosis and tumor invasion is well established, but the details of the exact pathological processes are not yet known. Although the details of the process are unknown, thrombosis promotes metastasis.

EMT plays a vital role in invasion and metastasis of cancer cells. To further evaluate the metastasis enhancing effect of *C. albicans*, we performed EMT marker' staining on histopathological samples. In OC-OSCC xenograft samples, p63 and vimentin expression were higher compared to the OSCC xenograft samples. OSCC tumor samples showed E-cadherin membrane positivity, in contrast to this OC-OSCC samples showed reduced E-cadherin membrane positivity. Increased p63 and vimentin expression and decreased E-cadherin expression in the isolated *Candida* colonized tumors altogether indicate a poor prognosis for oral candidiasis-associated OSCC.

Importantly, subsequent transcriptome analysis results of the *in vivo* OC-OSCC samples revealed that the presence of *C. albicans* cells induced a similar effect under these experimental arrangements as in the *in vitro* setting. The expression of MMP1, MMP10, COL5A2, SERPINB4, and CRABP2 was increased after oral candidiasis, confirming the OSCC progression enhancing effect of live *C. albicans* cells. Interestingly MMP1 and MMP10 gene expression were increased both *in vitro* and *in vivo*.

**As a summary, we report the following:**

**In this study we have shown that oral candidiasis indeed aids tumor progression by exacerbating the expression of tumor invasion and metastasis-associated prognostic markers.**

**Given that oral candidiasis frequently develops in oral tumor patients, as the consequence of chemoradiotherapy, it therefore increases the risk for tumor invasion and metastasis. Thus, applying antifungal treatment simultaneously with chemotherapy might be recommended in this patient cohort.**



## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. Markopoulos, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent. J.* **6**, 126–130 (2012).
3. Sharma, P., Saxena, S. & Aggarwal, P. Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: an institutional study. *Indian J. Dent. Res. Off. Publ. Indian Soc. Dent. Res.* **21**, 316–319 (2010).
4. Choi, S. & Myers, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J. Dent. Res.* **87**, 14–32 (2008).
5. Mehrotra, R. & Yadav, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J. Cancer* **43**, 60–66 (2006).
6. Scott, S. E., Grunfeld, E. A., Main, J. & McGurk, M. Patient delay in oral cancer: a qualitative study of patients' experiences. *Psychooncology.* **15**, 474–485 (2006).
7. van der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* **45**, 317–323 (2009).
8. Scully, C. & Bagan, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* **45**, 301–308 (2009).
9. Haya-Fernández, M. C., Bagán, J. V, Murillo-Cortés, J., Poveda-Roda, R. & Calabuig, C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* **10**, 346–348 (2004).
10. Sankaranarayanan, R., Fernandez Garrote, L., Lence Anta, J., Pisani, P. & Rodriguez Salva, A. Visual inspection in oral cancer screening in Cuba: a case-control study. *Oral Oncol.* **38**, 131–136 (2002).
11. Shugars, D. C. & Patton, L. L. Detecting, diagnosing, and preventing oral cancer. *Nurse Pract.* **22**, 105, 109–10, 113–5 passim (1997).
12. Brandizzi, D., Gandolfo, M., Velazco, M. L., Cabrini, R. L. & Lanfranchi, H. E. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **13**, E544-8 (2008).
13. Mashberg, A. *et al.* Appearance, site of occurrence, and physical and clinical

- characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer* **63**, 2522–2527 (1989).
14. Bagan, J., Sarrion, G. & Jimenez, Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* **46**, 414–417 (2010).
  15. Gupta, P. C., Murti, P. R., Bhonsle, R. B., Mehta, F. S. & Pindborg, J. J. Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-yr follow-up study of 12,212 users. *Oral Dis.* **1**, 54–58 (1995).
  16. Talhout, R. *et al.* Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**, 613–628 (2011).
  17. Warnakulasuriya, K. A., Johnson, N. W., Linklater, K. M. & Bell, J. Cancer of mouth, pharynx and nasopharynx in Asian and Chinese immigrants resident in Thames regions. *Oral Oncol.* **35**, 471–475 (1999).
  18. Scully, C., Field, J. K. & Tanzawa, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* **36**, 256–263 (2000).
  19. Mello, F. W. *et al.* The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Investig.* **23**, 2849–2859 (2019).
  20. Ogden, G. R. Alcohol and oral cancer. *Alcohol* **35**, 169–173 (2005).
  21. Chen, C. *et al.* Gene expression profiling identifies genes predictive of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. a Publ. Am. Assoc. Cancer Res. cosponsored by Am. Soc. Prev. Oncol.* **17**, 2152–2162 (2008).
  22. Taghavi, N. & Yazdi, I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch. Iran. Med.* **10**, 227–232 (2007).
  23. Angiero, F. *et al.* Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res.* **30**, 3435–3440 (2010).
  24. Nuovo, G. J. *In situ* detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol. Biol.* **688**, 35–46 (2011).
  25. Scully, C. & Felix, D. H. Oral medicine – update for the dental practitioner oral cancer. *Br. Dent. J.* **200**, 13–17 (2006).
  26. Syrjänen, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21 Suppl 7**, vii243-5 (2010).
  27. Jalouli, J. *et al.* Prevalence of viral (HPV, EBV, HSV) infections in oral submucous fibrosis and oral cancer from India. *Acta Otolaryngol.* **130**, 1306–1311 (2010).

28. Farah, C. *et al.* Aetiology of Oral Cavity Cancer. in *Contemporary Oral Oncology* (2016). doi:10.1007/978-3-319-14911-0\_2.
29. Garavello, W. *et al.* Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Int. J. cancer* **122**, 1827–1831 (2008).
30. Sreelekha, T. T. *et al.* Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.* **37**, 593–598 (2001).
31. Li, H., Chen, X.-L. & Li, H.-Q. Polymorphism of CYP1A1 and GSTM1 genes associated with susceptibility of gastric cancer in Shandong Province of China. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5757–5762 (2005).
32. Califano, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* **56**, 2488–2492 (1996).
33. Huang, M. *et al.* Cyclin D1 gene polymorphism as a risk factor for oral premalignant lesions. *Carcinogenesis* **27**, 2034–2037 (2006).
34. Díez-Pérez, R. *et al.* Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol. Rep.* **25**, 1203–1209 (2011).
35. Sidransky, D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 229–233 (1995).
36. Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963–968 (1953).
37. Bedi, G. C., Westra, W. H., Gabrielson, E., Koch, W. & Sidransky, D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res.* **56**, 2484–2487 (1996).
38. Braakhuis, B. J. M., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R. & Brakenhoff, R. H. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* **63**, 1727–1730 (2003).
39. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
40. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
41. Fouad, Y. A. & Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 1016–1036 (2017).
42. Shin, J. M., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H. & Kapila, Y. L. Metabolomics of Head and Neck Cancer: A Mini-Review. *Front. Physiol.* **7**, 526

- (2016).
43. Nabi, K. & Le, A. The Intratumoral Heterogeneity of Cancer Metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1063**, 131–145 (2018).
  44. Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168**, 657–669 (2017).
  45. Faubert, B. & DeBerardinis, R. J. Analyzing Tumor Metabolism In Vivo. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **1**, 99–117 (2017).
  46. Dong, W., Keibler, M. A. & Stephanopoulos, G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis. *Metab. Eng.* **43**, 113–124 (2017).
  47. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
  48. Ogawa, T., Washio, J., Takahashi, T., Echigo, S. & Takahashi, N. Glucose and glutamine metabolism in oral squamous cell carcinoma: insight from a quantitative metabolomic approach. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **118**, 218–225 (2014).
  49. Musharraf, S. G. *et al.* Metabolite Profiling of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of Oral Cavity Tissue Samples Revealed a Biomarker Pattern. *Sci. Rep.* **6**, 38985 (2016).
  50. Sant’Anna-Silva, A. C. B. *et al.* Metabolic Profile of Oral Squamous Carcinoma Cell Lines Relies on a Higher Demand of Lipid Metabolism in Metastatic Cells. *Front. Oncol.* **8**, 13 (2018).
  51. Cramer, J. D., Burtneess, B., Le, Q. T. & Ferris, R. L. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 669–683 (2019).
  52. Marsh, D. *et al.* Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J. Pathol.* **223**, 470–481 (2011).
  53. de Araújo, R. F. J., Barboza, C. A. G., Clebis, N. K., de Moura, S. A. B. & Lopes Costa, A. de L. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **13**, E344-7 (2008).
  54. Hill, B. T. & Price, L. A. Lack of survival advantage in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oral cavity receiving neoadjuvant chemotherapy prior to local therapy, despite achieving an initial high clinical complete remission rate. *Am. J. Clin. Oncol.* **17**, 1–5 (1994).

55. Zini, A., Czerninski, R. & Sgan-Cohen, H. D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **39**, 299–305 (2010).
56. Shah, J. P. & Gil, Z. Current concepts in management of oral cancer – surgery. *Oral Oncol.* **45**, 394–401 (2009).
57. Specenier, P. M. & Vermorken, J. B. Current concepts for the management of head and neck cancer: chemotherapy. *Oral Oncol.* **45**, 409–415 (2009).
58. Hamakawa, H. *et al.* Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer. *Head Neck* **30**, 800–809 (2008).
59. Ishida, K. *et al.* Current mouse models of oral squamous cell carcinoma: Genetic and chemically induced models. *Oral Oncol.* **73**, 16–20 (2017).
60. Frese, K. K. & Tuveson, D. A. Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 645–658 (2007).
61. Li, Q. *et al.* Mouse Tumor-Bearing Models as Preclinical Study Platforms for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 212 (2020).
62. Chodroff, L., Bendele, M., Valenzuela, V., Henry, M. & Ruparel, S. EXPRESS: BDNF Signaling Contributes to Oral Cancer Pain in a Preclinical Orthotopic Rodent Model. *Mol. Pain* **12**, 1744806916666841 (2016).
63. Kilian, M. *et al.* The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br. Dent. J.* **221**, 657–666 (2016).
64. Scotti, E. *et al.* Exploring the microbiome in health and disease: Implications for toxicology. *Toxicol. Res. Appl.* **1**, 2397847317741884 (2017).
65. Gao, L. *et al.* Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* **9**, 488–500 (2018).
66. Zaura, E., Nicu, E. A., Krom, B. P. & Keijser, B. J. F. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 85 (2014).
67. Zhao, H. *et al.* Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci. Rep.* **7**, 11773 (2017).
68. Dewhirst, F. E. *et al.* The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* **192**, 5002–5017 (2010).
69. Lim, Y., Totsika, M., Morrison, M. & Punyadeera, C. Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics* **7**, 4313–

- 4321 (2017).
70. Marsh, P. D. Role of the oral microflora in health. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**, 130–137 (2000).
  71. Sampaio-Maia, B. & Monteiro-Silva, F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. **11**, 291–301 (2014).
  72. Marsh, P. D. Role of the Oral Microflora in Health. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**, 130–137 (2000).
  73. Patil, S., Rao, R., Amrutha, N. & Ds, S. Oral Microbial Flora in Health. *World J. Dent.* **4**, (2013).
  74. Demmitt, B. A. *et al.* Genetic influences on the human oral microbiome. *BMC Genomics* **18**, 659 (2017).
  75. Benn, A., Heng, N., Broadbent, J. M. & Thomson, W. M. Studying the human oral microbiome: challenges and the evolution of solutions. *Aust. Dent. J.* **63**, 14–24 (2018).
  76. Perera, M., Al-Hebshi, N. N., Speicher, D. J., Perera, I. & Johnson, N. W. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to perio-pathogenic bacteria. *J. Oral Microbiol.* **8**, 32762 (2016).
  77. Sultan, A. S., Kong, E. F., Rizk, A. M. & Jabra-Rizk, M. A. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS Pathog.* **14**, e1006719 (2018).
  78. Bik, E. M. *et al.* Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **4**, 962–974 (2010).
  79. Avila, M., Ojcius, D. M. & Yilmaz, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**, 405–411 (2009).
  80. Wang, J., Gao, Y. & Zhao, F. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ. Microbiol.* **18**, 2143–2158 (2016).
  81. Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W. & He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 362–374 (2017).
  82. Wahida, A., Ritter, K. & Horz, H.-P. The Janus-Face of Bacteriophages across Human Body Habitats. *PLoS Pathog.* **12**, e1005634 (2016).
  83. Ly, M. *et al.* Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *MBio* **5**, e01133-14 (2014).
  84. Arduino, P. G. & Porter, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int.*

- Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **37**, 107–121 (2008).
85. Löning, T. *et al.* Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 417–420 (1985).
  86. Kumaraswamy, K. L. & Vidhya, M. Human papilloma virus and oral infections: an update. *J. Cancer Res. Ther.* **7**, 120–127 (2011).
  87. Rizzetto, L., De Filippo, C. & Cavalieri, D. Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3166–3181 (2014).
  88. Ghannoum, M. A. *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* **6**, e1000713 (2010).
  89. Monteiro-da-Silva, F., Araujo, R. & Sampaio-Maia, B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med. Mycol.* **52**, 498–505 (2014).
  90. Baumgardner, D. J. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. *J. Patient Cent. Res. Rev.* **6**, 252–261 (2019).
  91. Xu, H. & Dongari-Bagtzoglou, A. Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **26**, 65–70 (2015).
  92. Cassone, A. & Cauda, R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS* **26**, 1457–1472 (2012).
  93. Soysa, N. S. & Ellepola, A. N. B. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis.* **11**, 268–273 (2005).
  94. Feller, L., Khammissa, R. A. G., Chandran, R., Altini, M. & Lemmer, J. Oral candidosis in relation to oral immunity. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **43**, 563–569 (2014).
  95. Millsop, J. W. & Fazel, N. Oral candidiasis. *Clin. Dermatol.* **34**, 487–494 (2016).
  96. Silk, H. Diseases of the mouth. *Prim. Care* **41**, 75–90 (2014).
  97. Stoopler, E. T. & Sollecito, T. P. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med. Clin. North Am.* **98**, 1323–1352 (2014).
  98. Muzyka, B. C. & Epifanio, R. N. Update on oral fungal infections. *Dent. Clin. North Am.* **57**, 561–581 (2013).
  99. Al Groosh, D. *et al.* The prevalence of opportunistic pathogens associated with

- intraoral implants. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 501–505 (2011).
100. Shenoy, M. P. *et al.* A comparative study of oral candidal species carriage in patients with type1 and type2 diabetes mellitus. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **18**, S60-5 (2014).
  101. Meira, H. C. *et al.* Oral candidiasis: A retrospective study of 276 Brazilian patients. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **21**, 351–355 (2017).
  102. O'Donnell, L. E. *et al.* The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One* **10**, e0137717 (2015).
  103. Spampinato, C. & Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res. Int.* **2013**, 204237 (2013).
  104. Pappas, P. G. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **48**, 503–535 (2009).
  105. Pierce, C. G. & Lopez-Ribot, J. L. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **8**, 1117–1126 (2013).
  106. Arendrup, M. C. & Perlin, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **27**, 484–492 (2014).
  107. Quindós, G. *et al.* Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **24**, e172–e180 (2019).
  108. Sultan, A. S. *et al.* Digital Design of a Universal Rat Intraoral Device for Therapeutic Evaluation of a Topical Formulation against *Candida*-Associated Denture Stomatitis. *Infect. Immun.* **87**, (2019).
  109. Szabo, E. K. & MacCallum, D. M. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol. Lett.* **320**, 1–8 (2011).
  110. Kong, E. F. *et al.* Development and *In Vivo* Evaluation of a Novel Histatin-5 Bioadhesive Hydrogel Formulation against Oral Candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 881–889 (2016).
  111. Jabra-Rizk, M. A. *et al.* *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infect. Immun.* **84**, 2724–2739 (2016).
  112. Nett, J. E. & R Andes, D. Fungal Biofilms: *In Vivo* Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. *Microbiol. Spectr.* **3**, E30 (2015).
  113. Segal, E. & Frenkel, M. Experimental in Vivo Models of Candidiasis. *J. Fungi*



- (*Basel, Switzerland*) **4**, (2018).
114. Naglik, J. R., Fidel, P. L. J. & Odds, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**, 129–139 (2008).
  115. Conti, H. R., Huppler, A. R., Whibley, N. & Gaffen, S. L. Animal models for candidiasis. *Curr. Protoc. Immunol.* **105**, 19.6.1-19.6.17 (2014).
  116. Costa, A. C. B. P., Pereira, C. A., Junqueira, J. C. & Jorge, A. O. C. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence* **4**, 391–399 (2013).
  117. Solis, N. V & Filler, S. G. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. *Nat. Protoc.* **7**, 637–642 (2012).
  118. Mosci, P. *et al.* A novel bioluminescence mouse model for monitoring oropharyngeal candidiasis in mice. *Virulence* **4**, 250–254 (2013).
  119. Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D. & Jabra-Rizk, M. A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J. Fungi (Basel, Switzerland)* **6**, (2020).
  120. Salzman, N. H., Underwood, M. A. & Bevins, C. L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin. Immunol.* **19**, 70–83 (2007).
  121. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 679–691 (2009).
  122. Sudhakara, P., Gupta, A., Bhardwaj, A. & Wilson, A. Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent. J.* **6**, (2018).
  123. Fox, J. G. & Wang, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 60–69 (2007).
  124. Peek, R. M. J. & Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 28–37 (2002).
  125. Islami, F. & Kamangar, F. *Helicobacter pylori* and esophageal cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Prev. Res. (Phila).* **1**, 329–338 (2008).
  126. Caygill, C. P., Hill, M. J., Braddick, M. & Sharp, J. C. Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers. *Lancet (London, England)* **343**, 83–84 (1994).
  127. Welton, J. C., Marr, J. S. & Friedman, S. M. Association between hepatobiliary cancer and typhoid carrier state. *Lancet (London, England)* **1**, 791–794 (1979).
  128. Belstrøm, D. *et al.* Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *J. Clin. Periodontol.* **41**, 104–112 (2014).

129. Offenbacher, S. *et al.* Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann. Periodontol.* **3**, 233–250 (1998).
130. Beck, J. D. & Offenbacher, S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J. Periodontol.* **76**, 2089–2100 (2005).
131. Beck, J. D., Slade, G. & Offenbacher, S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontol. 2000* **23**, 110–120 (2000).
132. Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F. & Murayama, Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J. Periodontol.* **76**, 2075–2084 (2005).
133. Kaźmierczak-Siedlecka, K. *et al.* Fungal Gut Microbiota Dysbiosis and Its Role in Colorectal, Oral, and Pancreatic Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. **12**, (2020).
134. Rivera, R. E. *et al.* Characterization of oral yeasts isolated from healthy individuals attended in different Colombian dental clinics. *J. Biomed. Res.* **33**, 333–342 (2019).
135. Deo, P. N. & Deshmukh, R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **23**, 122–128 (2019).
136. Xu, J. & Mitchell, T. G. Geographical differences in human oral yeast flora. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **36**, 221–224 (2003).
137. Cannon, R. D., Holmes, A. R., Mason, A. B. & Monk, B. C. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *J. Dent. Res.* **74**, 1152–1161 (1995).
138. Berkovits, C. *et al.* Analysis of oral yeast microflora in patients with oral squamous cell carcinoma. *Springerplus* **5**, 1257 (2016).
139. Sanketh, D. S., Patil, S. & Rao, R. S. Estimating the frequency of *Candida* in oral squamous cell carcinoma using Calcofluor White fluorescent stain. *J. Investig. Clin. Dent.* **7**, 304–307 (2016).
140. Aslani, N. *et al.* Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Infect. Dis.* **18**, 24 (2018).
141. Jepsen, A. & Winther, J. E. Mycotic infection in oral leukoplakia. *Acta Odontol. Scand.* **23**, 239–256 (1965).
142. Kharadi, U., Parkarwar, P., Khairnar, S., Reddy, S. & Arur, P. Clinics in Oncology Oral Candidiasis Turns to Oral Cancer - A Rare Clinical. *Clin. Oncol.* **1**, 8–10 (2016).
143. Sitheeque, M. A. M. & Samaranayake, L. P. Chronic hyperplastic

- candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Crit. Rev. oral Biol. Med. an Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **14**, 253–267 (2003).
144. Sanjaya, P. R., Gokul, S., Gururaj Patil, B. & Raju, R. Candida in oral pre-cancer and oral cancer. *Med. Hypotheses* **77**, 1125–1128 (2011).
  145. Barrett, A. W., Kingsmill, V. J. & Speight, P. M. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis.* **4**, 26–31 (1998).
  146. Alnuaimi, A. D., Wiesenfeld, D., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C. & McCullough, M. J. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.* **51**, 139–145 (2015).
  147. Arzmi, M. H., Dashper, S. & McCullough, M. Polymicrobial interactions of *Candida albicans* and its role in oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **48**, 546–551 (2019).
  148. Canković, M. & Bokor-Bratić, M. [Candida albicans infection in patients with oral squamous cell carcinoma]. *Vojnosanit. Pregl.* **67**, 766–770 (2010).
  149. Rebolledo Cobos, M. & Molina, M. Oral pathogen Candida in patients under antineoplastic therapies. *Revista Facultad de Odontología* vol. 30 (2018).
  150. Minhas, S., Kashif, M., Altaf, W. & Nagi, A. Oral Candidiasis: Complication of Concomitant Chemo-radiotherapy in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Br. Microbiol. Res. J.* **11**, 1–11 (2016).
  151. Minhas, S., Kashif, M., Altaf, W., Afzal, N. & Nagi, A. H. Concomitant-chemoradiotherapy-associated oral lesions in patients with oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Biol. Med.* **14**, 176–182 (2017).
  152. Jain, M. *et al.* The Oral Carriage of *Candida* in Oral Cancer Patients of Indian Origin Undergoing Radiotherapy and/or Chemotherapy. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**, ZC17-20 (2016).
  153. Sankari, S. L., Mahalakshmi, K. & Kumar, V. N. A comparative study of Candida species diversity among patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *BMC Res. Notes* **13**, 488 (2020).
  154. Mäkinen, A., Nawaz, A., Mäkitie, A. & Meurman, J. H. Role of Non-*Albicans* *Candida* and *Candida Albicans* in Oral Squamous Cell Cancer Patients. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **76**, 2564–2571 (2018).
  155. Al-Hebshi, N. N., Borgnakke, W. S. & Johnson, N. W. The Microbiome of Oral

- Squamous Cell Carcinomas: a Functional Perspective. *Curr. Oral Heal. Reports* **6**, 145–160 (2019).
156. Ognjenović, M. *et al.* Mucositis grades and yeast species. *Coll. Antropol.* **37**, 443–447 (2013).
  157. Reynolds, M. A. *et al.* Periodontal disease and oral microbial successions during myelosuppressive cancer chemotherapy. *J. Clin. Periodontol.* **16**, 185–189 (1989).
  158. Paula, C. R., Sampaio, M. C., Birman, E. G. & Siqueira, A. M. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. *Mycopathologia* **112**, 119–124 (1990).
  159. Epstein, J. B. *et al.* Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA. Cancer J. Clin.* **62**, 400–422 (2012).
  160. Ser, Z., Liu, X., Tang, N. N. & Locasale, J. W. Extraction parameters for metabolomics from cultured cells. *Anal. Biochem.* **475**, 22–28 (2015).
  161. Dettmer, K. *et al.* Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1127–1139 (2011).
  162. Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606–625 (2008).
  163. Lu, Y., Su, C. & Liu, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends Microbiol.* **22**, 707–714 (2014).
  164. Klimek-Ochab, M., Brzezińska-Rodak, M., Zymańczyk-Duda, E., Lejczak, B. & Kafarski, P. Comparative study of fungal cell disruption—scope and limitations of the methods. *Folia Microbiol. (Praha)*. **56**, 469–475 (2011).
  165. Kaetzel, C. S. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* **206**, 83–99 (2005).
  166. Krämer, A., Green, J., Pollard, J. J. & Tugendreich, S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* **30**, 523–530 (2014).
  167. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 415–433 (2000).
  168. Wei, Q., Qian, Y., Yu, J. & Wong, C. C. Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene* **39**, 6139–6156 (2020).

169. Ye, M., Gu, X., Han, Y., Jin, M. & Ren, T. Gram-negative bacteria facilitate tumor outgrowth and metastasis by promoting lipid synthesis in lung cancer patients. *J. Thorac. Dis.* **8**, 1943–1955 (2016).
170. Vargas, G. *et al.* Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* **17**, 389–407 (2015).
171. Westermarck, J. & Kähäri, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 781–792 (1999).
172. Tretter, L., Patocs, A. & Chinopoulos, C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1086–1101 (2016).
173. Wu, J.-Y. *et al.* Cancer-Derived Succinate Promotes Macrophage Polarization and Cancer Metastasis via Succinate Receptor. *Mol. Cell* **77**, 213–227.e5 (2020).
174. Garcia-Bermudez, J. *et al.* Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat. Cell Biol.* **20**, 775–781 (2018).
175. Liu, K. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *Int. J. Oncol.* **50**, 252–262 (2017).
176. Puram, S. V. *et al.* Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* **171**, 1611–1624.e24 (2017).
177. Hasegawa, K. *et al.* YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *J. Pathol.* **253**, 80–93 (2021).
178. Zhang, X. *et al.* Systematic analysis of genes involved in oral cancer metastasis to lymph nodes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **23**, 53 (2018).
179. Sasahira, T. & Kirita, T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2413 (2018).
180. Kidacki, M., Lehman, H. L., Warrick, J. I., Stairs, D. B. Signaling Pathways Supporting Tumor Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Clin. Exp. Pathol.* **5**, (2015).
181. Lo Muzio, L. *et al.* p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **36**, 187–194 (2005).
182. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 9–22 (2011).

183. Rondon, A. M. R., Kroone, C., Kapteijn, M. Y., Versteeg, H. H. & Buijs, J. T. Role of Tissue Factor in Tumor Progression and Cancer-Associated Thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* **45**, 396–412 (2019).
184. Lo Muzio, L. *et al.* Effect of p63 expression on survival in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Invest.* **25**, 464–469 (2007).
185. Goto, Y. *et al.* Possible involvement of  $\Delta$ Np63 downregulation in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma via induction of a mesenchymal phenotype. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 293–306 (2014).
186. Liu, S. *et al.* High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci. Rep.* **6**, 38834 (2016).
187. Liu, L.-K. *et al.* Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod. Pathol. an Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 213–224 (2010).
188. Zhou, J., Tao, D., Xu, Q., Gao, Z. & Tang, D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 3150–3154 (2015).
189. Sawant, S. S. *et al.* Clinical significance of aberrant vimentin expression in oral premalignant lesions and carcinomas. *Oral Dis.* **20**, 453–465 (2014).
190. Williams, H. K., Sanders, D. S., Jankowski, J. A., Landini, G. & Brown, A. M. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **27**, 308–317 (1998).
191. Kushwaha, S. S. *et al.* Correlation of E-cadherin Immunohistochemical Expression with Histopathological Grading of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Contemp. Clin. Dent.* **10**, 232–238 (2019).
192. Cobos, M. R. & Molina, M. S. Oral pathogen *Candida* in patients under antineoplastic therapies. *Rev. Fac. Odontol. Univ. Antioquia* **30**, (2018).
193. Hooper, S. J., Wilson, M. J. & Crean, S. J. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck* **31**, 1228–1239 (2009).
194. Mohd Bakri, M., Mohd Hussaini, H., Rachel Holmes, A., David Cannon, R. & Mary Rich, A. Revisiting the association between candidal infection and

- carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Microbiol.* **2**, (2010).
195. Meurman, J., Marttila, E., Richardson, M. & Rautemaa, R. Non-*Candida albicans* *Candida* yeasts of the oral cavity. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* **1**, (2007).
  196. Weems, J. J. J. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **14**, 756–766 (1992).
  197. Brandt, M. E. Candida and Candidiasis. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 876 (2002).
  198. Naglik, J. R., König, A., Hube, B. & Gaffen, S. L. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **40**, 104–112 (2017).
  199. Yamamoto, T. *et al.* BRD4 promotes metastatic potential in oral squamous cell carcinoma through the epigenetic regulation of the MMP2 gene. *Br. J. Cancer* **123**, 580–590 (2020).
  200. Vincent-Chong, V. K. *et al.* Genome wide profiling in oral squamous cell carcinoma identifies a four genetic marker signature of prognostic significance. *PLoS One* **12**, e0174865 (2017).
  201. Schmalbach, C. E. *et al.* Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **130**, 295–302 (2004).
  202. Bhosale, P. G. *et al.* Chromosomal Alterations and Gene Expression Changes Associated with the Progression of Leukoplakia to Advanced Gingivobuccal Cancer. *Transl. Oncol.* **10**, 396–409 (2017).
  203. Jinno, T. *et al.* Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **33**, 2161–2168 (2015).
  204. Lim, Y. C. *et al.* Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma. *Oral Oncol.* **48**, 1114–1119 (2012).
  205. Ren, Z.-H., Wu, K., Yang, R., Liu, Z.-Q. & Cao, W. Differential expression of matrix metalloproteinases and miRNAs in the metastasis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* **20**, 24 (2020).
  206. Chang, K.-P. *et al.* Serum levels of chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with

- oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **49**, 802–807 (2013).
207. Fujita, Y. *et al.* Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* **9**, e110378 (2014).
  208. Maruse, Y. *et al.* Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **47**, 836–845 (2018).
  209. Luo, S.-L., Xie, Y.-G., Li, Z., Ma, J.-H. & Xu, X. E-cadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 5533–5537 (2014).
  210. Li, H.-X. *et al.* Expression of  $\alpha\text{v}\beta 6$  integrin and collagen fibre in oral squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes and prognostic implications. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **42**, 547–556 (2013).
  211. Pu, Y. *et al.* High MMP-21 expression in metastatic lymph nodes predicts unfavorable overall survival for oral squamous cell carcinoma patients with lymphatic metastasis. *Oncol. Rep.* **31**, 2644–2650 (2014).
  212. Vincent-Chong, V. K. *et al.* Overexpression of MMP13 is associated with clinical outcomes and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Sci. World J.* **2014**, 897523 (2014).
  213. Hsin, C.-H. *et al.* MMP-11 promoted the oral cancer migration and Fak/Src activation. *Oncotarget* **8**, 32783–32793 (2017).
  214. Lu, J. *et al.* Clinical Significance and Prognostic Value of the Expression of LAMP3 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Dis. Markers* **2017**, 1218254 (2017).
  215. Ma, H. *et al.* POM121 is identified as a novel prognostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J. Cancer* **10**, 4473–4480 (2019).
  216. Natarajan, J., Hunter, K., Mutalik, V. S. & Radhakrishnan, R. Overexpression of S100A4 as a biomarker of metastasis and recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J. Appl. Oral Sci.* **22**, 426–433 (2014).
  217. Fan, H.-X. *et al.* Expression of MMP-1/PAR-1 and patterns of invasion in oral squamous cell carcinoma as potential prognostic markers. *Onco. Targets. Ther.* **8**, 1619–1626 (2015).
  218. Ohnishi, Y., Inoue, H., Furukawa, M., Kakudo, K. & Nozaki, M. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is a potent regulator of



- invasion activity in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **27**, 954–958 (2012).
219. Saito, T. *et al.* Semaphorin7A Promotion of Tumoral Growth and Metastasis in Human Oral Cancer by Regulation of G1 Cell Cycle and Matrix Metalloproteases: Possible Contribution to Tumoral Angiogenesis. *PLoS One* **10**, e0137923 (2015).
220. Magnussen, S. N. *et al.* Cleavage of the urokinase receptor (uPAR) on oral cancer cells: regulation by transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and potential effects on migration and invasion. *BMC Cancer* **17**, 350 (2017).
221. Coutinho-Camillo, C. M. *et al.* Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch.* **463**, 31–39 (2013).

## 10 TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### A dolgozat alapját képező publikáció

**Máté Vadovics**, Jemima Ho, Nóra Igaz, Róbert Alföldi, Dávid Rakk, Eva Veres, Balázs Szűcs, Márton Horváth, Renáta Tóth, Attila Szűcs, Andrea Csibi, Péter Horváth, László Tiszlavicz, Csaba Vágvölgyi, Joshua D. Nosanchuk, András Szekeres, Mónika Kiricsi, Rhonda Henley-Smith, David L. Moyes, Selvam Thavaraj, Rhys Brown, László G. Puskás, Julian R. Naglik, Attila Gácsér. *Candida albicans Enhances the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo*. mBio. 2022; 13(1): e03144-21

### Egyéb publikáció

Katalin Csonka, **Máté Vadovics**, Annamária Marton, Csaba Vágvölgyi, Erik Zajta, Adél Tóth, Renáta Tóth, Csaba Vizler, László Tiszlavicz, Héctor M. Mora-Montes, Attila Gácsér. *Investigation of OCH1 in the Virulence of Candida parapsilosis Using a New Neonatal Mouse Model*. Frontiers in Microbiology. 2017; 8:1197.

## 11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy PhD munkámat a tanszéken végezzem.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Gácsér Attilának, amiért az elmúlt öt évben irányította és támogatta munkámat. Szeretném megköszönni az évek során kapott rengeteg segítséget, tanácsot és biztatást, valamint, hogy általa megismerhettem a szakterület nemzetközi tudományos közösségét is. Köszönöm belém fektetett bizalmát, és hogy minden segítséget megadott szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom továbbá a témavezetőm által irányított kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak: Dr. Németh Tibornak, Szenzenstein Juditnak, Dr. Tóth Renátának, Dr. Csonka Katalinnak, Dr. Papp Csabának, Dr. Zajta Eriknek, Dr. Tanmoy Chakrabortynak, Dr. Dhirendra N. Singh-nek, Pál Sárának, Bohner Flórának, Takács Tamásnak, Novák Ádámnak, Drabbant Gergőnek, Horváth Mártonnak, Szilovics Zórának, Halmos Emesének, Csikós Máténak, Tasi Zsoltnak, akik támogatták, segítették munkámat és ezáltal egy igazán remek, összetartó és lelkes csapat része lehettem. Külön szeretném megköszönni a kutatócsoport azon tagjainak a segítséget, akik ebben a témában dolgoztak velem együtt: Veres Évának, Csibi Andreának és Szücs Balázsnak.

Köszönettel tartozom kooperációs partnereinknek is. Elsőként szeretném megköszönni Dr. Kiricsi Mónikának, Dr. Igaz Nórának és Dr. Kovács Dávidnak a doktori témám elindításához szükséges rengeteg technikai és elméleti segítséget, útmutatást, tanácsot, közös szakmai megbeszéléseket. Hálával és köszönettel tartozom Dr. Puskás Lászlónak, Alföldi Róbertnek és Dr. Nagy Lajosnak, akik az *in vitro* technikai segítség mellett biztosították az állatkísérletekhez szükséges feltételeket, valamint hasznos szakmai tanácsokkal láttak el. Továbbá köszönöm Prof. Dr. Tiszlavicz Lászlónak és Daru Krisztiánnak a hisztopatológiai munkákban nyújtott segítségüket. Köszönöm Dr. Szekeres Andrásnak és Rakk Dávidnak a HPLC-HRMS mérésekben nyújtott segítséget. Külön köszönettel tartozom Dr. Szücs Attilának és Horváth Mártonnak a bioinformatikai analízisekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm a segítséget az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának.

Köszönöm korábbi témavezetőimnek Dr. Somogyvári Ferencnek és Dr. Horváth Ádámnak, hogy elindítottak a tudomány útján.

Legnagyobb hálával szüleimnek, testvéreimnek és Kosztolányi Mihálynak tartozom, a mentális és anyagi támogatásért. Nélkülük biztosan nem jutottam volna el idáig.

Szeretnék köszönetet mondani a rengeteg támogatásért, barátaimnak és barátnőmnek. Köszönöm nektek, hogy a kritikus helyzetekben meghallgattatok, és érzelmi támaszt nyújtottatok.

Munkámat az LP2018-15/2018 projekt támogatta.

## 12 MELLÉKLETEK

**1. melléklet:** A HPLC-HRMS vizsgálatok során vizsgált prekursorok tömege, fragmens ionok tömege, az adott átmenetre jellemző polaritás, az adott komponens retenciós ideje, fragmentációs energiája, illetve az adott komponensre jellemző kimutatási alsó határ (LLOQ)

Név	Prekursor tömeg [ $m/z$ ]	Kvantifikáló ion	Konfirmáló ion	Polaritás	Retenciós idő [perc]	Fragmentációs energia (NCE)
3-Foszfoglicerát	184,98566	78,9588	-	Negatív	3,39	50
Akonitát	173,00916	85,0295	-	Negatív	4,46	10
$\alpha$ -Ketoglutarát	145,01425	101,0244	-	Negatív	3,75	10
Aszpartát	134,04478	74,0238	88,0398	Pozitív	3,18	30
Citrát	191,01971	87,0087	-	Negatív	3,98	50
Eritróz-4-foszfát	199,00132	96,9695	78,9589	Negatív	3,09	10
Fumarát	115,00376	71,0136	-	Negatív	4,45	10
Glicerinaldehyd-3-foszfát	168,99072	96,9696	-	Negatív	3,07	10
Glicin	76,03930	76,0393	-	Pozitív	3,16	30
Glukóz-6-foszfát, Fruktóz-6-foszfát	259,02244	168,9908	-	Negatív	3,02	10
Glutamát	148,06048	84,0448	102,557	Pozitív	3,25	30
Izo-citrát	191,01971	73,0292	117,0193	Negatív	3,98	50
Malát	133,01425	115,0037	71,0136	Negatív	3,70	10
Metionin	150,05833	104,0537	133,0317	Pozitív	4,00	30
Oxálacetát	130,99860	87,0088	-	Negatív	3,58	10
Foszfoenolpiruvát	166,97510	79,9588	-	Negatív	3,55	50
Prolin	116,04988	70,0653	116,071	Pozitív	3,37	30
Piruvát	87,00877	87,0088	-	Negatív	3,53	10
Szukcinát	117,01930	73,0292	99,0087	Negatív	4,88	10
Tienil-alanin	170,02826	153,0015	109,0117	Negatív	5,20	50

## 2. melléklet: A qPCR során felhasznált primerek

Primer	irány	szekvencia
GOT1	forward	5'-GGAGCATATCGCACGGATGA-3'
	reverse	5'-AAGACGAGAAGCACAGCTCC-3'
ASNSD1	forward	5'-CACTGGAATTGGTGCAGATG-3'
	reverse	5'-GTTTGCTTTTTCCCAAATCG-3'
DLST	forward	5'-ACCTACAGCAGCGGCAGT-3'
	reverse	5'-CTCCTGGCTCAGCTAGTGGT-3'
SUCLA2	forward	5'-TGCTAAGGCACTGATAGCGG-3'
	reverse	5'-TGTGCTTGCTTCGCTAAGGT-3'
JUN	forward	5'-GGAGCGCCTGATAATCCAGT-3'
	reverse	5'-ATCTGTCACGTTCTTGGGGC-3'
TIMP1	forward	5'-TCCAAGGCTCTGAAAAGGGC-3'
	reverse	5'-ATTCAGGCTATCTGGGACCG-3'
CDH11	forward	5'-CCACCGTACAGTTGGTGGAA-3'
	reverse	5'-CCTCCTTGCCCTTCTCATGG-3'
LAMC2	forward	5'-AACACATTAGACGGCCTCCTG-3'
	reverse	5'-CTGTTGATCTGGGTCTTGGCT-3'
EIF5A2	forward	5'-ACCAAGTGAGGTCAAGTGCC-3'
	reverse	5'-CTAGCAGGTGAAAGCCTGGT-3'
INHBA	forward	5'-GTGCCAATACCATGAAGAGGA-3'
	reverse	5'-CTCTTTCTGGTCCCCACTCTT-3'
WNT9A	forward	5'-CGGCAAGATGCTGGATGGG-3'
	reverse	5'-TCAGCGGGAGGATGGTCAG-3'
FOXC2	forward	5'-CGGCGGCGCTTCAAAAAGA-3'
	reverse	5'-CGCTCTTGATCACACCTTCTTC-3'
TGIF1	forward	5'-AATTCCACCCAAGGAGCGG-3'
	reverse	5'-AGCGAACGTCTCCTTCACAG-3'
TGFB1	forward	5'-TATTGAGCACCTTGGGCACTG-3'
	reverse	5'-TGGGCTTGTTTCCTCACCTTT-3'
TGFB2	forward	5'-CTCCGAAAATGCCATCCCGC-3'
	reverse	5'-TCCGTTGTTTCAGGCACTCTG-3'
TGFB1R1	forward	5'-AAGTCATCACCTGGCCTTGG-3'
	reverse	5'-ATGGTGAATGACAGTGCAGG-3'
TGFB1R2	forward	5'-ACTCCTGTGCAGCTTCCCTC-3'
	reverse	5'-AGATGTGCGGGCCAGATG-3'
TGFB1R3	forward	5'-TGGTAGGGTGAGTGTTTCCAC-3'
	reverse	5'-GAGACCGACAGGATTTGCCA-3'
SMAD2	forward	5'-ATCCCATCGGAAGAGGAAGGA-3'
	reverse	5'-CGTGAATGGCAAGATGGACG-3'
SMAD3	forward	5'-CCGGGGGTTGGACTTTTCTTC-3'
	reverse	5'-CTCCAAGTGGCAGCAGAAGTT-3'
SMAD4	forward	5'-GCCATGTACACCCACCGTAA-3'
	reverse	5'-ATCCACGATCTACTCCCCG-3'
TP63	forward	5'-AAGAGGGGAGGGAAGGGAAA-3'
	reverse	5'-GCTGCATGCTTGTTGCAGAA-3'
TP63 (NH <sub>2</sub> -terminálisban)	forward	5'-TGAAACTTCACGGTGTGCCA-3'
	reverse	5'-GGGACATGGTGGATCGGTAA-3'

B2MG	forward	5'-CCGTGTGAACCATGTGACTTTGTC-3'
	reverse	5'-GCTGCTTACATGTCTCGATCCC-3'
CSNK1	forward	5'-GAGCTACGTGTGGGGAACAA-3'
	reverse	5'-TTGATGGCGACTTCCTCACC-3'
ITGA2	forward	5'-GCAACATCCCAGACATCCCA-3'
	reverse	5'-CTTTCGTAGCACTTCGTGCGC-3'
ITGA5	forward	5'-TCAACTTAGACGCGGAGGC-3'
	reverse	5'-CACACTGACCCCGTCTGTTC-3'
ITGA6	forward	5'-ACACAGCATTGTATATGTGAAGCA-3'
	reverse	5'-CCGAATCCCATTGCTTTGGC-3'
MMP1	forward	5'-CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC-3'
	reverse	5'-GGGGTATCCGTGTAGCACAT-3'
MMP10	forward	5'-GCTCTGCCTATCCTCTGAGTG-3'
	reverse	5'-CAACGTCAGGAATCCACACC-3'
MMP9	forward	5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3'
	reverse	5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'
MMP3	forward	5'-TTCCGCCTGTCTCAAGATGATAT-3'
	reverse	5'-AAAGGACAAAGCAGGATCACAGTT-3'
MMP16	forward	5'-AATCTCCTCAGGGAGCATTGTGA-3'
	reverse	5'-TCCAGGTTCTACCTTGAGTATCTG-3'
MMP13	forward	5'-ACTGAGAGGCTCCGAGAAATG-3'
	reverse	5'-GAACCCCGCATCTTGCTT-3'
MMP2	forward	5'-CCTGCAAGTTTCCATTCCGC-3'
	reverse	5'-CTTCTTGTCGCGGTCGTAGT-3'

**3. melléklet:** Szakirodalmi adatok alapján kigyűjtött OSCC progresszióban szerepet játszó gének listája.

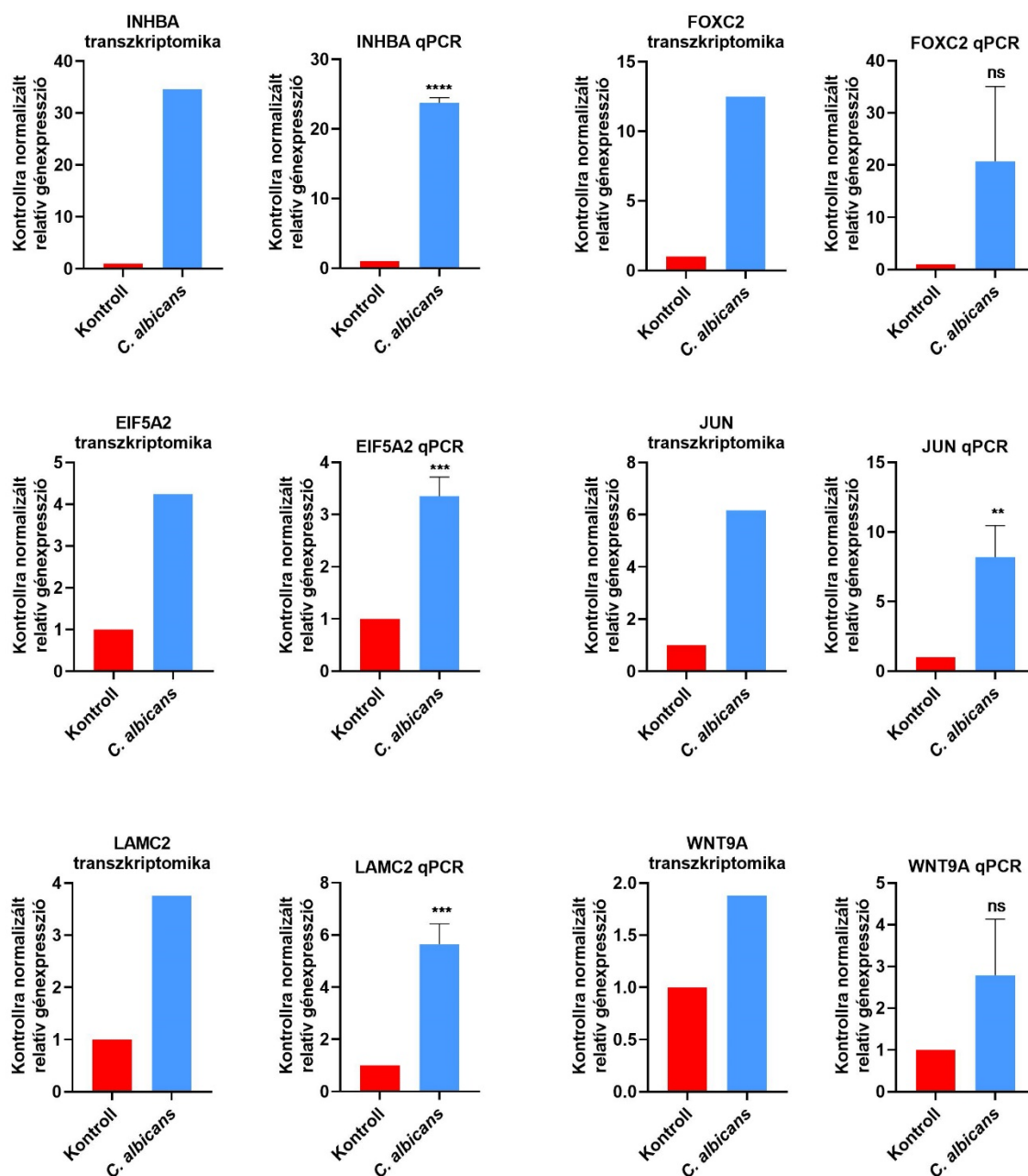
OSCC progresszió markergénjei	Tanulmány alapján up/downreguláció
BRD4	up <sup>199</sup>
MMP2	up <sup>199</sup>
SPP1	up <sup>178</sup>
SERPINE1	up <sup>178</sup>
MMP13	up <sup>178</sup>
LIF	up <sup>178</sup>
CDA	up <sup>178</sup>
SERPINB7	up <sup>178</sup>
SEMA3C	up <sup>178</sup>
FOS	up <sup>178</sup>
KLRC2	down <sup>178</sup>
GFPT2	up <sup>178</sup>
CCND1	up <sup>178</sup>
CACNA2D3	down <sup>178</sup>
ATF3	up <sup>178</sup>
FAT1	up <sup>178</sup>
JUN	up <sup>178</sup>
COL16A1	up <sup>178</sup>
TRIM9	down <sup>178</sup>
PMEPA1	up <sup>178</sup>
MSR1	up <sup>178</sup>
MSH4	up <sup>178</sup>
NKX25	down <sup>178</sup>
INSR	up <sup>178</sup>
CTSB	up <sup>178</sup>
FHL2	up <sup>178</sup>
FOXC1	up <sup>178</sup>
ZNF302	down <sup>178</sup>
PRG2	up <sup>178</sup>
UBA3	down <sup>178</sup>
CCND1	up <sup>200</sup>
EGFR	up <sup>200</sup>
TPM2	up <sup>200</sup>
LRP12	up <sup>200</sup>
TIMP-1	up <sup>201</sup>
NINJ1	up <sup>201</sup>
CSPG2	up <sup>201</sup>
OSF-2	up <sup>201</sup>
CDH11	up <sup>201</sup>
PARD3	down <sup>201</sup>
SFRP4	up <sup>201</sup>
C1QB	up <sup>201</sup>
FCGR3B	up <sup>201</sup>
SERPINB4	down <sup>201</sup>



PLA2G4A	down <sup>201</sup>
IL1RN	down <sup>201</sup>
CRABP2	down <sup>201</sup>
TCEA2	up <sup>201</sup>
ECM1	down <sup>201</sup>
EIF5A2	up <sup>202</sup>
HOXC9	up <sup>202</sup>
MFAP5	up <sup>202</sup>
LY6K	up <sup>202</sup>
INHBA	up <sup>202</sup>
DVL1	up <sup>202</sup>
IL6	up <sup>203</sup>
MMP1	up <sup>204</sup>
MMP2	up <sup>204</sup>
MMP9	up <sup>204</sup>
MET	up <sup>204</sup>
MMP7	up <sup>205</sup>
MMP13	up <sup>205</sup>
MMP10	up <sup>205</sup>
MMP12	down <sup>205</sup>
MMP9	down <sup>205</sup>
CXCL9	up <sup>206</sup>
IL8	up <sup>207</sup>
PDL1	up <sup>208</sup>
PD1	up <sup>208</sup>
CDH1	down <sup>209</sup>
ITGB6	up <sup>210</sup>
MMP3	up <sup>210</sup>
MMP21	up <sup>211</sup>
MMP13	up <sup>212</sup>
MMP11	up <sup>213</sup>
TGFβ	up <sup>179</sup>
EGF	up <sup>179</sup>
PDGF	up <sup>179</sup>
ZO-1	down <sup>179</sup>
OCLN	down <sup>179</sup>
ACTA2	up <sup>179</sup>
VIM	up <sup>179</sup>
CDH2	up <sup>179</sup>
DES	up <sup>179</sup>
SNAI	up <sup>179</sup>
SLUG	up <sup>179</sup>
TWIST	up <sup>179</sup>
ZEB1	up <sup>179</sup>
ZEB2	up <sup>179</sup>
COX2	up <sup>179</sup>
TRF2	up <sup>179</sup>
MVD	up <sup>179</sup>

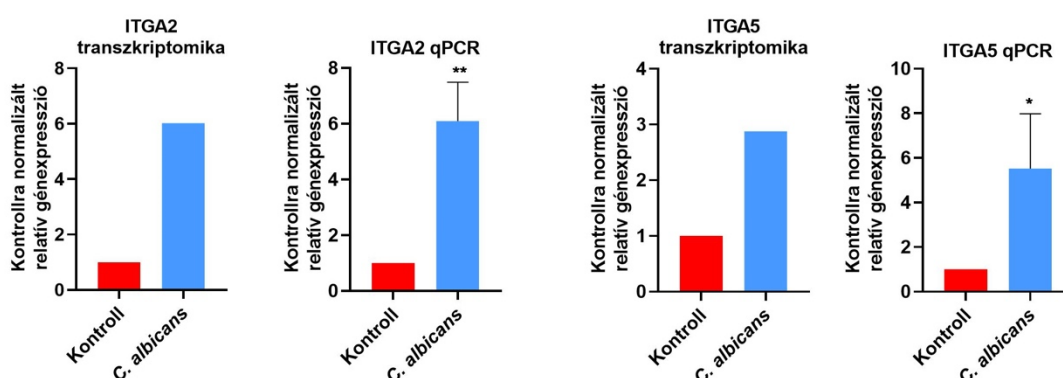
LVD	up <sup>179</sup>
VEGFA	up <sup>179</sup>
VEGFC	up <sup>179</sup>
VEGFD	up <sup>179</sup>
BCL2	up <sup>179</sup>
GLUT1	up <sup>179</sup>
HIF1 $\alpha$	up <sup>179</sup>
FOXC2	up <sup>179</sup>
PROX1	up <sup>179</sup>
MIA	up <sup>179</sup>
MIA2	up <sup>179</sup>
TANGO	up <sup>179</sup>
ELAVL4	up <sup>179</sup>
STOX2	up <sup>179</sup>
N4BP2L1	up <sup>179</sup>
ZFAND4	up <sup>179</sup>
NIPAL1	up <sup>179</sup>
LEMD1	up <sup>179</sup>
PAUF	up <sup>179</sup>
ME1	up <sup>179</sup>
LAMP3	up <sup>214</sup>
POM121	up <sup>215</sup>
S100A4	up <sup>216</sup>
MMP1	up <sup>217</sup>
HBEGF	up <sup>218</sup>
SEMA7A	up <sup>219</sup>
PLAUR	up <sup>220</sup>
PHLDA1	up <sup>221</sup>

**4. melléklet:** A transzkriptomikai eredmények validálása qPCR-rel. HSC-2 sejtvonal, élő *C. albicans* kezelés. n=3, párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns. INHBA - inhibin béta-alegység A; FOXC2 - C2-es doboz; EIF5A - eukarióta transzláció iniciációs faktor 5A2; JUN - jun proto-onkogén; LAMC2 - laminin gamma 2 alegység; WNT9A – wnt család 9A tagja.

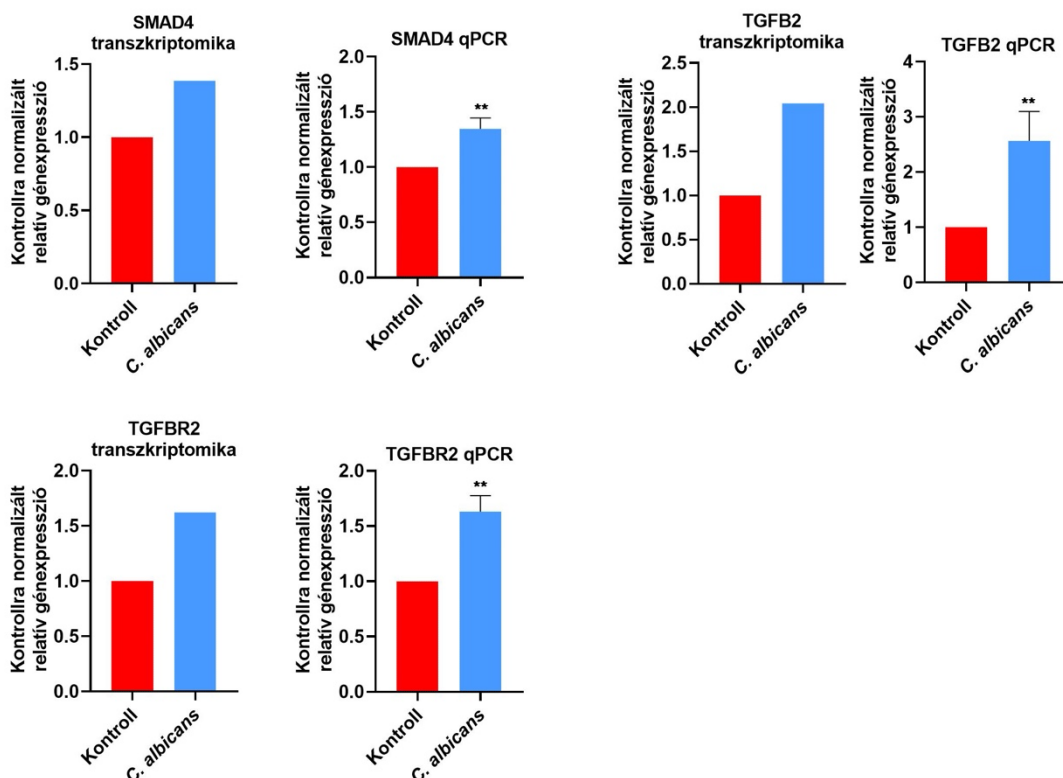


**5. melléklet:** A transzkriptomikai adatok alapján *C. albicans* jelenlétében aktiválódott szignalizációs útvonal néhány komponensének validálása qPCR-rel. n=3, párosítatlan t-próba,  $p \leq 0,05$  (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ), ns=nem szignifikáns. ITGA2 - integrin alfa 2 alegység; ITGA5 - integrin alfa 5 alegység; SMAD4 – MAD család 4-es tagja; TGFB2 - transzformáló növekedési faktor béte 2; TGFB2 – transzformáló növekedési faktor receptor 2; TGIF1 – TGFB indukáló faktor homeobox 1

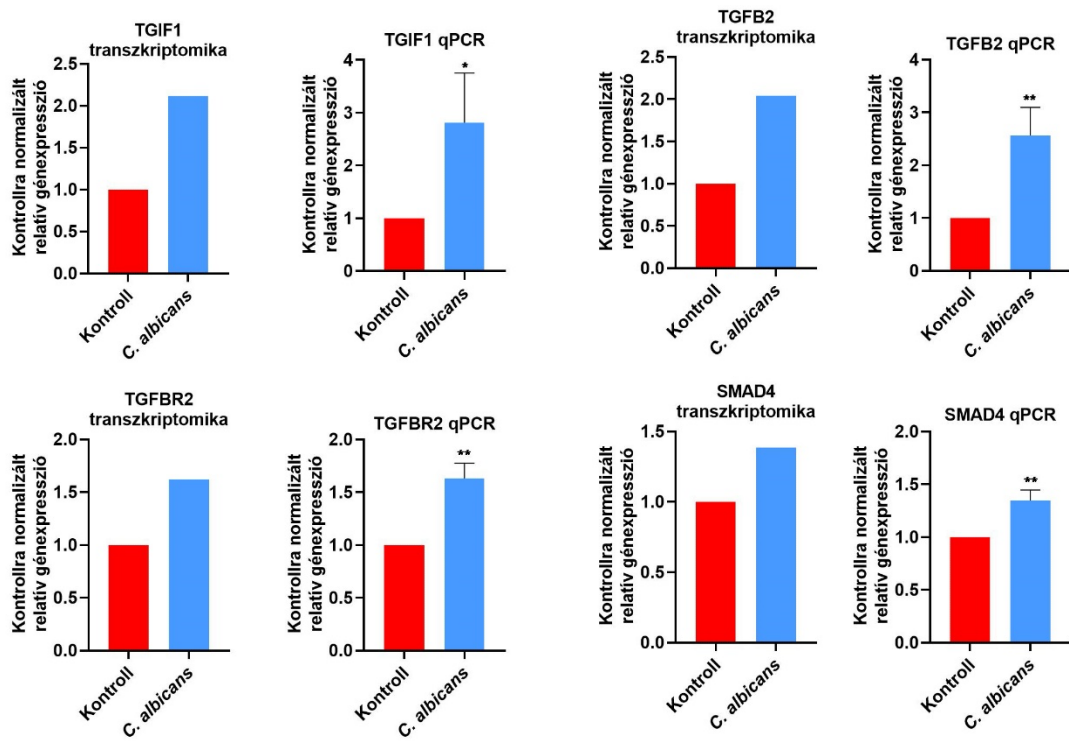
#### PI3K-Akt útvonal



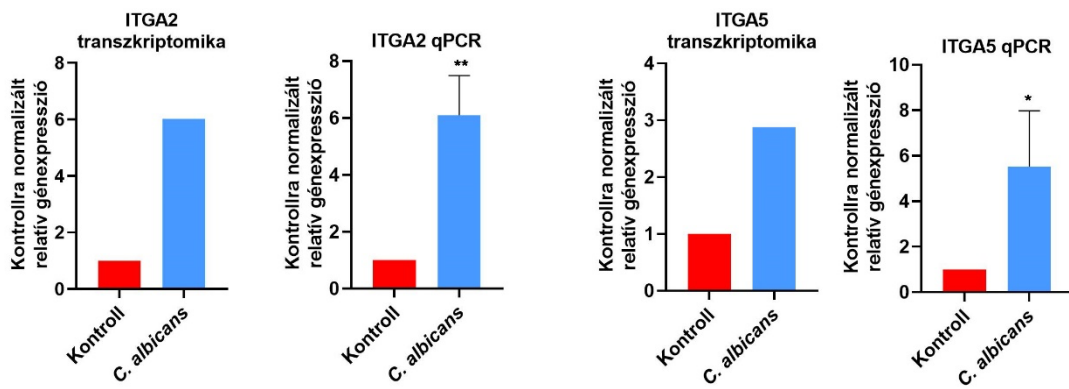
#### TGFB/SMAD útvonal



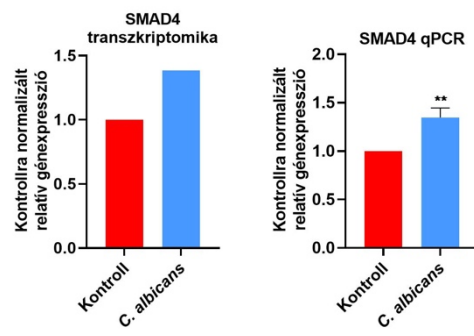
## Hippo útvonal



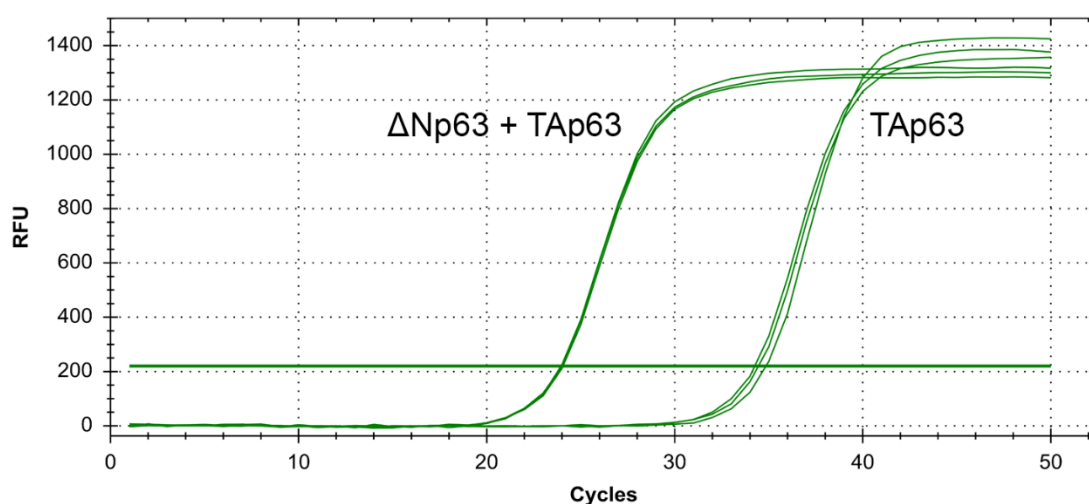
## Focal adhesion útvonal



## Wnt útvonal



**6. melléklet:** p63 splice variánsának vizsgálata. Két primert terveztünk. Az egyiket az NH<sub>2</sub>-terminális transzaktivációs domén szekvenciájába (csak a TAp63 splice variáns jelenlétében van termék), a másikat pedig a fehérje C-terminális végéhez közel terveztük (a TAp63 és  $\Delta$ Np63 jelenlétében is ad terméket), így a kettő különbségéből megállapítható, hogy melyik splice variáns van nagyobb számban jelen a HSC-2 sejtvonalban. Mivel a TAp63 termék átlagban 10 ciklussal később érte el a küszöbértéket, elmondható, hogy az NH<sub>2</sub> transzaktivációs domént nem tartalmazó splice variáns van jelen a HSC-2 sejtvonalban.



	qC
$\Delta$ Np63+TAp63	24.02
$\Delta$ Np63+TAp63	23.96
$\Delta$ Np63+TAp63	24.06
TAp63	34.45
TAp63	34.26
TAp63	34.85