

**HUMÁN KERATINOCITÁK ÉS *CANDIDA* FAJOK
INTERAKCIÓJÁBÓL EREDŐ IMMUNOLÓGIAI
FUNKCIÓK VIZSGÁLATA**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NOVÁK ÁDÁM

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. GÁCSEI ATTILA

EGYETEMI TANÁR



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2025

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Bevezetés	7
III. Irodalmi áttekintés	9
III.1. A gombás fertőzések (mikózisok)	9
III.2. A humánpatogén <i>Candidák</i>	11
III.3. A <i>Candida parapsilosis</i> és <i>Candida albicans</i> taxonómiai, filogenetikai és morfológiai jellemzése	12
III.4. A humánpatogén <i>Candida</i> fajok virulencia faktorai	14
III.5. A <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> által okozott kórképek	15
III.6. Az invazív kandidiázisok epidemiológiája	16
III.7. A <i>C. parapsilosis</i> és <i>C. albicans</i> előfordulása az emberi bőrön, a után kandidiázisok	17
III.8. A humán bőr anatómiai struktúrája	19
III.9. Az egészséges humán bőr mikrobiom	20
III.10. Keratinociták és az immunválaszban betöltött szerepük	21
III.11. A gombák ellen irányuló adaptív immunválasz	23
III.12. Patogén felismerő receptorok (PRR) az antifungális immunitásban	26
III.13. Keratinociták válasza a <i>Candida</i> fertőzésekre	29
III.14. Humán bőrkeratinociták által szekretált antimikrobiális fehérjék	30
IV. Célkitűzések	34
V. Anyagok és módszerek	35
V.1. Táptalajok, tápoldatok, pufferek és egyéb reagensek	35
V.2. <i>Candida</i> törzsek	36

V.3. Alkalmazott keratinocita sejtvonalak	38
V.4. A sejtek fertőzésének folyamata	39
V.5. A sejtkárosodás vizsgálata laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás méréssel	39
V.6. Gomba RNS izolálás	40
V.7. Citokintermelés mérése enzimmötött immunoszorbens (ELISA) módszerrel ...	41
V.8. Keratinocita sejtek és <i>Candida</i> gombák közötti adhézio	41
V.9. A <i>Candida</i> sejtek fagocitózisa a keratinociták által	42
V.10. Bőrhámsejtek metabolomikai elemzése	43
V.11. Diagramok szerkesztése és statisztikai kiértékelés	44
VI. Eredmények és értékelésük	45
VI.1. Keratinociták károsodásának mértéke <i>Candida</i> fertőzést követően	45
VI.2. Keratinociták károsodási vizsgálata felkészített immunitás szempontjából	50
VI.3. Keratinociták citokin illetve kemokin termelése <i>Candida</i> stimulusra	54
VI.4. Keratinociták citokin/kemokin termelése felkészített immunitású körülmények között	58
VI.5. <i>Candida</i> sejtek kitapadása keratinocitákhoz	61
VI.6. <i>Candida</i> sejtek adhézioja keratinocitákhoz felkészített immunitású állapotban	65
VI.7. Keratinociták fagocitáló képessége <i>Candidákkal</i> szemben	68
VI.8. Bőrhámsejtek internalizációs kapacitása felkészített immunitású körülményben	72
VI.9. <i>ECE1</i> génexpressziós szintek a <i>C. albicans</i> SC5314 és WO-1 törzsekben	73
VI.10. A gomba-sejt kölcsönhatás következtében végbemenő génexpressziós és biokémiai változások	75
VI.11. A keratinocita sejtek antimikrobiális peptid válasza <i>Candida</i> gombafertőzést követően	76

VI.12. A keratinociták metabolomikája <i>Candida</i> fertőzés után	76
VI.13. Keratinocita metabolomika felkészített immunitású állapotban	81
VII. Összefoglalás	85
VIII. Summary	90
IX. Irodalomjegyzék	95
X. Köszönetnyilvánítás	114
XI. Függelék	116

I. Rövidítések jegyzéke

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Szerzett Immunhiányos Szindróma)

AMP: Anti Microbial Peptide (Antimikrobiális Peptid)

AP-1: Activator Protein 1 (Aktivátor Fehérje 1)

APC: Antigen Presenting Cell (Antigén Prezentáló Sejt)

ASC: Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD (Apoptózis-asszociált Speck-szerű CARD-ot Tartalmazó Fehérje)

CARD: Caspase-Recruitment Domain (Kaspáz-Felvevő Domén)

CLR: C-type Lectin Receptor (C-típusú Lektin Receptor)

CMC: Chronic Mucocutaneous Candidiasis (Krónikus Mukokután Kandidiázis)

CXCL: CXC Chemokine Ligand (CXC Kemokin Ligand)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco által módosított Eagle-féle tápoldat)

DMSO: Dimetil-Szulfoxid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzim Kötött Immunsorbens Próba)

ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase (Extracelluláris Szignál-Szabályozott Kináz)

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting (Fluoreszcencia Aktivált Sejtválogatás és Analízis)

FBS: Fetal Bovine Serum (Magzati Borjú Szérum)

FC: Flow Cytometry (Áramlási Citometria)

GFP: Green Fluorescent Protein (Zöld Fluoreszcens Fehérje)

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granulocita-Makrofág Kolónia Stimuláló Faktor)

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis (Génkészlet-gazdagodás Elemzés)

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution (Hank-féle Pufferelt Sóoldat)

HIV: Human Immunodeficiency Virus (Humán Immundeficiencia Vírus)

IFN- γ : Interferon- γ

IL-: Interleukin-

IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (Interleukin-1 Receptor Asszociált Kináz)

JNK: c-Jun N-terminal Kinase (c-Jun N-terminális Kináz)

KC: Keratinocyte Chemoattractant (Keratinocita Kemoattraktáns)

KcMR: Keratinocyte Mannose Receptor (Keratinociták Mannóz-Kötő Receptora)

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Gének és Genomok Kiotói Enciklopédiája)

K-SFM: Keratinocyte-Serum Free Medium (Keratinocita Szérum-Mentes Médium)

LDH: Lactate-Dehydrogenase (Laktát-Dehidrogenáz)

LPS: Lipopolysaccharide (Lipopoliszacharid)

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitogén-Aktivált Protein Kináz)

MHC: Major Histocompatibility Complex (Fő Hisztokompatibilitási Komplex)

MOI: Multiplicity Of Infection (Fertőzési Arányszám)

MYD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88 (Mieloid Differenciációs Elsődleges Válasz Gén 88)

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B (Nukleáris Faktor- κ B)

NLR: NOD-like Receptor (NOD-szerű Receptor)

NLRC4: NLR Family CARD Domain-Containing Protein 4 (NLR Család CARD Domén-Tartalmú Fehérje 4)

NLRP3: NLR Family Pyrin Domain-Containing Protein 3 (NLR Család Pirin Domén-Tartalmú Fehérje 3)

NOD: Nucleotide Oligomerization Domain (Nukleotid Oligomerizációs Domén)

NTC: Nourseothricin (Nourseothricin)

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern (Patogén Asszociált Molekuláris Mintázat)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Foszfát Pufferelt Sóoldat)

qRT-PCR: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Kvantitatív Valós-Idejű Polimeráz Láncreakció)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeráz Láncreakció)

PRR: Pathogen Recognition Receptor (Patogén Felismerő Receptor)

RIG-I: Retinoic Acid-Inducible Gene-I (Retinosavval-Indukálható Gén-I)

ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktív Oxigéngyökök)

spp.: species pluralis (fajok)

Syk: Spleen tyrosine kinase (Lép tirozin kináz)

SZMC: Szeged Microbiology Collection (Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény)

TCR: T-cell Receptor (T-sejt Receptor)

Th: T-helper (Segítő T-sejt)

TIR: Toll/Interleukin-1 Receptor (Toll/Interleukin-1 Receptor)

TLR: Toll-Like Receptor (Toll-Szerű Receptor)

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha (Tumor Nekrózis Faktor Alfa)

Treg: Regulatory T-cell (Regulátor T-sejt)

Wt: Wild type (Vad típus)

YPD: Yeast Extract-Peptide-Dextrose (Élesztő Kivonat-Pepton-Dextróz)

II. Bevezetés

Az 1980-as évektől kezdődően egyre jelentősebb a gombák által okozott súlyos megbetegedések száma (Trofa és mtsai., 2008). A legnagyobb veszélynek a legyengült vagy nem megfelelően működő immunrendszerrel rendelkező egyének vannak kitéve (pl. csecsemők, idősök, glükokortikoszteroidokkal vagy kemoterápiás szerekkel kezelt páciensek), mivel náluk magas arányban alakulnak ki szisztémás mikózisok (Brown és mtsai., 2012; Trofa és mtsai., 2008). Szisztémás mikózis esetén a patogén gomba szétterjed a szervezetben és különböző belső szerveket támad meg. Ezek még megfelelő antifungális gyógyszeres kezelések mellett is jelentősen magas (20-90%) mortalitással járnak és évente kb. félmillió ember halálát okozzák (Gow és Netea, 2016; Brown és mtsai., 2012). Ilyen betegségeket főként *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* fajok, valamint a *Mucoromycotina* altörzsbe tartozó gombák okozzák (Brown és mtsai., 2012). A mikózisok zöme azonban felületi fertőzés, melyek a bőrt és részeit, valamint a nyálkahártyák felszínét érintik és általában kevésbé veszélyesek (Brown és mtsai., 2012). A gombás bőrbetegségek jelenleg legalább 1 milliárd embert érintenek (Gow és Netea, 2016). Ezeket leggyakrabban dermatofiták okozzák (Guégan és mtsai., 2016; Brown és mtsai., 2012), azonban *Candida* fajok is képesek a kialakításukra (Havlickova és mtsai., 2008). Az opportunista humánpatogén gombák között a *Candida* nemzetség tagjai évente kiemelkedő számú szisztémás megbetegedést okoznak magas (46–75%) mortalitási aránnyal (Brown és mtsai., 2012). Pfaller és Diekema (2007) szerint az USA-ban 100.000 főre átlagosan 0,4 halálesetet okoztak az ilyen betegségek egy évben. A *Candida* fajok a negyedik leggyakoribb okozói a nozokomiális véráram fertőzéseknek (Brown és mtsai., 2012). Több mint egy tucat *Candida* faj képes fertőzést okozni emberben (Turner és Butler, 2014), ezek közül a *C. parapsilosis* az egészséges emberi bőr gyakori kommenzalistájaként ismert (Trofa és mtsai., 2008). Alkalmanként azonban ez a faj is képes bőrbetegségek, főleg körömgombásodás kialakítására (Odds, 1994; Havlickova és mtsai., 2008; Trofa és mtsai., 2008). A bőr kandidás megbetegedéseit (után kandidiázisok) leggyakrabban a *C. albicans* okozza (Odds, 1994; Dismukes és mtsai., 2003; Lima-Neto és mtsai., 2010). A *C. albicans* felnőtt egészséges egyének bőrén általában nem fordul elő, onnan csak ritkán izolálható, nem része az emberi bőr normál flórájának (Rippon, 1974; Szalka, 2000; Dismukes és mtsai., 2003).

A mikroorganizmusok és gombák elleni hatékony védekezéshez a kórokozókat a gazdaszervezet immunrendszerének fel kell ismernie a hatékony válaszreakció kiváltásához. A

gerincesek immunrendszerének két összetevője van: a veleszületett és a szerzett immunitás. A bőr az emberi test legnagyobb tömegű szerve. A hám és a nyálkahártya felszínein található hámsejtek állandó kapcsolatban vannak a mikrobákkal. Az epidermisz, a legkülső bőrréteg, a külső környezettel szembeni első védelmi vonalat képezi. Szerkezeti és barrier funkciói mellett a bőrben sajátos immunológiai környezetet alakít ki. A keratinociták, amelyek az epidermisz fő alkotóelemei, már bizonyítottan fontos szabályozó szerepet játszanak a bőr gyulladásos folyamataiban és immunválaszában, különböző citokinek/kemokinek termelése által (Barker és mtsai., 1991). A keratinocitákból származó citokinek/kemokinek kulcsfontosságúak a leukociták vérből történő mobilizálásában és a jelátvitelben más sejtek felé (Svanborg és mtsai., 1999).

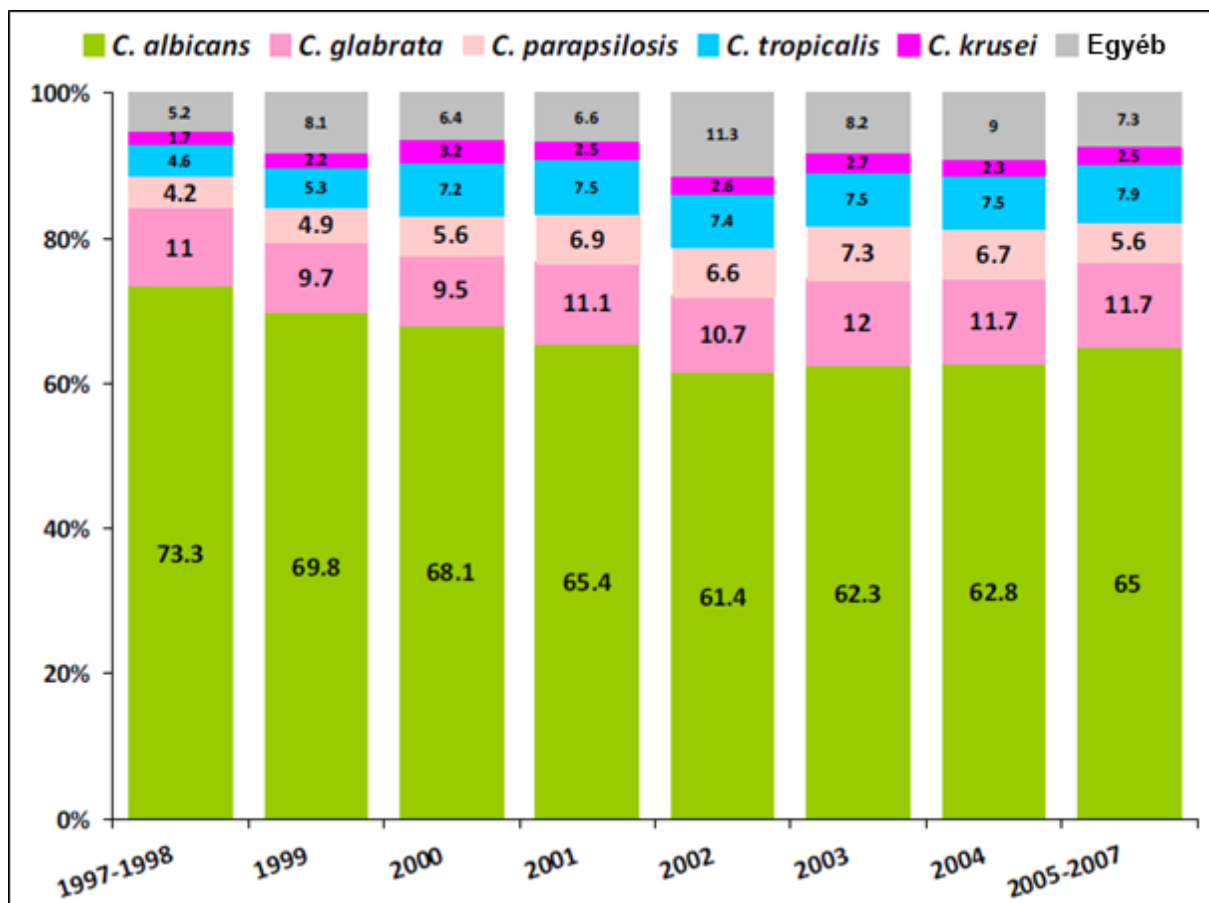
Ezen diplomamunka fő célja a gazdaszervezet bőrhámsejtjei és kommenzalista illetve patogén *Candida* gombák között végbemenő interakciók behatóbb tanulmányozása. Ennek folyamata során célunk volt megvizsgálni a gomba által okozott károsodást a bőrhámsejteken, a fertőzés hatására bekövetkező citokin/kemokin termelődést a hámsejtek részéről, a gomba kapcsolódását a sejtekhez. Továbbá vizsgáltuk a keratinociták fagocitózis képességét, antimikrobiális peptid és metabolit szekrécióját fertőzést követően.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. A gombás fertőzések (mikózisok)

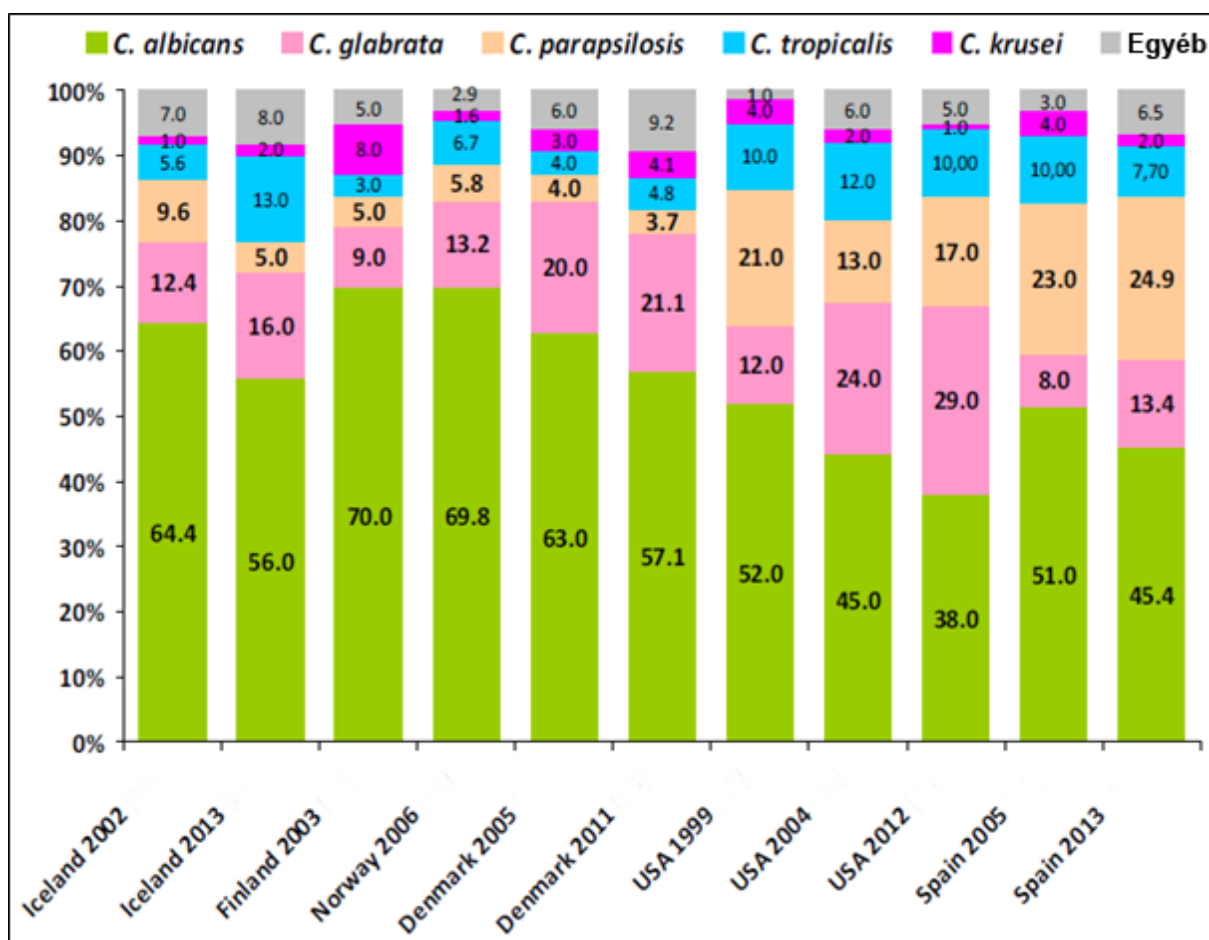
Napjainkban a humán gombás fertőzések igen elterjedtek globális szinten. Ezek a mikózisok általában a bőrt vagy a nyálkahártyát érintik nagyobb számban, de könnyedén kialakulhat az egész szervezetet érintő szisztémás mikózis, mely esetben a gomba kolonizálja a belső szerveket (Dismukes és mtsai., 2003). Ezen gombafajok egy része opportunistá patogén, túlnyomórészt a szervezet immunhiányos állapotában képes súlyos megbetegedést okozni (Köhler és mtsai., 2017). Ezzel szemben a valódi patogének az immunrendszer teljes működése mellett is tudnak súlyos betegségeket kialakítani. Ezen invazív mikózisok csaknem annyi halálos esetet okoznak, mint a tuberkulózis vagy a malária (Casadevall és Pirofski, 2003; Gow és Netea, 2016). A legtöbb haláleset az opportunistá patogén gombák körében jellemző, amikor az immunrendszer alulműködött vagy nem kifejezett állapotban van pl. csecsemők, idősek esetében. A gyakori előfordulás kapcsolatba hozható az immunrendszert érintő rendellenességekkel is pl. leukémia, AIDS (Brown és mtsai., 2012). Az immunszuppresszív terápia, cukorbetegség, szervátültetés, valamint a széles spektrumú antibiotikumok szintén nagyban hozzájárulnak az esetszámok növekedéséhez (Higa, 2008; Silva, 2010).

Az invazív gombás fertőzések jelentős hányada (90%) a *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Pneumocystis* fajokhoz kapcsolható (Brown és mtsai., 2012). Ezen gombafajok okozta életveszélyes vagy súlyos fertőzések száma Magyarországon eléri az évi 30.000-es esetszámot. Újabb epidemiológiai kutatások alátámasztják, hogy a gombás invazív fertőzések mintegy 80%-át *Candida* fajok okozzák (Bassetti és mtsai., 2017). Bár a gombaellenes szerek fejlesztése folyamatos és a diagnosztika is fejlődik az invazív *Candida* fertőzések esetszáma növekedő tendenciát mutat (McCarty és Pappas, 2016). A nyálkahártyát érintő *Candida* fertőzések szintén súlyos problémát ölelnek fel mivel orális kandidiázisban világszerte majdnem 10 millió ember szenved, míg a *Candida* által okozott hüvelygyulladásban évente ~75 millió beteg érintett (Matee és mtsai., 2000; Sobel, 2007). Az invazív *Candida* izolátumok szempontjából a *C. albicans* kimagasló a betegségeket okozó fajok közül (1. ábra).



1. ábra. Az ARTEMIS DISK nyilvántartásból származó adatok az invazív *Candida* izolátumok fajmegoszlásának időbeli változásáról 1997 és 2007 között (J. Guinea, 2014).

A legtöbb esetben használt diagnosztikai eljárás pl. gomba-antigén kimutatás, PCR technika, röntgenfelvétel nem mindig minősíthetők pontosnak és specifikusnak, sok esetben nem is kellően érzékeny tesztekéről beszélünk, valamint általában csak a fejlett országokban elérhetőek ezek a metódusok (Brown és mtsai., 2012) (2. ábra).



2. ábra. A legjelentősebb *Candida* fajok aránya a különböző országok kandidémiájáról beszámolt tanulmányokból (J. Guinea, 2014).

III.2. A humánpatogén *Candidák*

A *Candida* fajok egy része általában megtalálhatóak a normál humán flóra tagjaiként és egészséges egyéneknél nem okoznak megbetegedéseket. Azonban, ha az immunrendszer legyengült állapotban működik pl. immunszuppresszálo terápia, AIDS, daganatos megbetegedés, cukorbetegség, az invazív kandidiázis kialakulásának nagyobb esélye áll fenn (Köhler és mtsai., 2017). Az invazív kandidiázis akkor alakul ki, amikor a kórokozó bejut a véráramba és ezen keresztül terjed szét az egész szervezetben szisztémás fertőzést okozva, amely számos szervet érinthet, és súlyos kórképet okozhat (Brown és mtsai., 2012; Gow és Netea, 2016). Az invazív kandidiázis okozhat szívbélhártya-gyulladást, agyhártyagyulladást, hashártyagyulladást vagy akár csontgyulladást is.

Az invazív kandidiázis általában nozokomiális fertőzésként jelenik meg, mely fertőzések 10%-át *Candida* fajok okozzák. A legtöbb nozokomiális *Candida* véráram fertőzést az intenzív osztályokon ápoltság betegei esetén írták le. A szisztémás *Candida* fertőzések által veszélyeztetett korcsoportok az újszülöttek és idősek csoportja, mivel esetükben az immunrendszer alulműködik (Hof, 2009; Brown és mtsai., 2012; Gow és Netea, 2016).

Manapság körülbelül 400 *Candida* fajt ismerünk, melyek közül nagyjából 15-20 fajnak lehet szerepe a kandidiázis kialakításában (Williams és mtsai., 2013; Daniel és mtsai., 2014). A szakirodalomban is sokat tárgyalt *Candida albicans* az egyik legismertebb faj mind közül, azonban a nem-*albicans* fajok is hozzájárulhatnak a különböző megbetegedésekhez, mint pl. a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és újabban a *C. auris*. Elterjedésük legjellemzőbb oka az azol típusú (pl. vorikonazol, flukonazol, posakonazol) antifungális szerek egyre szélesebb körben történő alkalmazása és ezzel a rezisztens fajok kialakulása (Guinea, 2014; Yapar, 2014). Továbbá az intravénás katéterek használata is nagyban hozzájárul terjedésükhöz, mivel ezek a fajok könnyen képesek megtapadni ezen eszközök felületén.

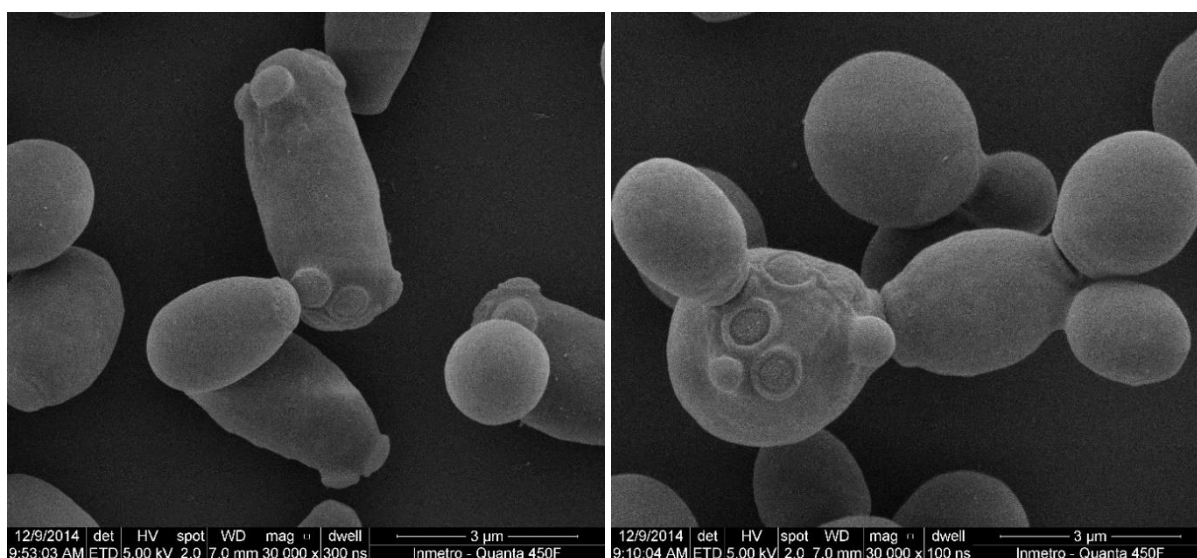
III.3. A *Candida parapsilosis* és *Candida albicans* taxonómiai, filogenetikai és morfológiai jellemzése

A *Candida* fajok sarjadzógombák melyek kerek, ovoid vagy hosszúkas formába is megjelenhetnek (Larone, 1987; Moris és mtsai., 2008; Cooper, 2011; Daniel és mtsai., 2014). Bizonyos fajok képesek pszeudohifa vagy valódi hifa képzésre is. Egy *Candida* sejt sejtfa 3 rétegből áll. A plazmamembránhoz legközelebb eső része kitint tartalmaz majd egy β -D glükánokból álló réteg következik, melyet egy vastagabb mannán réteg borít kívülről (Brown és mtsai., 2014; Gow és mtsai., 2017). A sejtfalban számos fehérje megtalálható, mint pl. az adhezinek, amelyek elősegítik a gombasejtek megtapadását (Netea és mtsai., 2015).

A *C. parapsilosis* napjaink egyik fontos kórokozójává vált és a második vagy harmadik leggyakrabban izolált *Candida* fajnak minősül. A *C. parapsilosis* diploid, nukleáris genomja 8 pár kromoszómából áll, ahol 1 kromoszómaszerelvény ~13,1 megabázispár nagyságú és génjeinek száma ~5700 (Butler és mtsai., 2009). A kromoszómái között alacsony heterozigotizáció figyelhető meg. A sejtfal N-mannozilációja befolyásolni tudja a gazda-patogén interakciót, illetve a patogénitást. A sejtfal N-mannozilációját α -1,6-mannozil-transzferáz enzim katalizálja mely az *OCH1* gén által kódolt (Bates és mtsai., 2006). A *C. parapsilosis* a természetben széles körben elterjedt faj (Nosek és mtsai., 2009). Byrd és mtsai. (2018) a *C.*

parapsilosist az egészséges száraz bőrfelületek 10 leggyakoribb eukarióta kolonizálója közé sorolja. Jelenléte kisebb gyakorisággal, de kimutatható különböző nyálkahártya felszínekről is (pl. szájüreg, vagina, bél).

A *C. albicans* a *Candida* nemzetség egyik legismertebb tagjának számít és az egyik legintenzívebben kutatott fajba tartozik. Morfológiai szempontból megjelenhet élesztő, pszeudohifa vagy hifa formában (Butler és mtsai., 2009) (3. ábra). Az SC5314-es jelzésű törzs genomja 14,3 Mbp nagyságú és 6107 gént tartalmaz (Butler és mtsai., 2009). A *Candida* sejtek mérete átlagosan 2-7 μm közé esik és morfológiailag enyhén megnyúlt vagy kerek forma jellemző rájuk. Agar lemezre szélesztve a gombasejtek sima vagy gyűrött felszínű fehér színű kerek alakú telepeket alkotnak. A nemzetségben jellemző a dimorfizmus tehát bizonyos környezeti körülmények megváltozása esetén (pl. tápanyag- vagy oxigénellátottság) morfológiai változásra képesek és hifát vagy pszeudohifát képesek létrehozni (Lo és mtsai., 1997). A sejtfal elektronmikroszkóppal is jól elkülöníthető rétegekre osztható: vékonyabb belső β -glükánt és kitint tartalmazó rétegre, valamint külső vastagabb mannoproteinekből álló rétegre (Netea és mtsai., 2008). A sejtfal száraz tömegének 60%-át alkotja a β -1,3- és β -1,6-glükánból álló β -glükán réteg (Ruiz-Herrera és mtsai., 2006). Ezek egymáshoz is és a kitinhez is kovalens kötésen keresztül tudnak kapcsolódni (Netea és mtsai., 2008). A mannoprotein réteg glikozilált fehérjékből áll (Gantner és mtsai., 2005). A sejtfalban kis mennyiségben megtalálhatóak lipidek is (Ruiz-Herrera és mtsai., 2006). A *C. albicans* opportunistá patogén, mivel egészséges egyénekben kommenzalistaként él - pl. bélrendszerben - és csak a gazdaszervezet immunitásának csökkenése esetén válik komoly patogénné (Turner és Butler, 2014; Brown és mtsai., 2012).



3. ábra. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* elektronmikroszkópos felvétele. Forrás: Dr. Papp Csaba Gergő.

III.4. A humánpatogén *Candida* fajok virulencia faktorai

- A *C. parapsilosis* és *C. albicans* is különböző virulencia faktorok segítik fertőzési képességük kiteljesedésében (Wellington és mtsai., 2014). Egyik legismertebb és legjobban kutatott virulencia faktor a biofilm képzés képessége. Főleg a *C. parapsilosis* esetén jellemző, hogy műanyag orvosi eszközökön (pl. katétereken) biofilm réteget képez, amely megnöveli a gomba ellenálló képességét különböző antimikotikumokkal szemben (Trofa és mtsai., 2008).
- A szövetek és sejtek felszínén történő megtapadás képességét segítik elő a gomba által szekretált adhezin fehérjék (Silva és mtsai., 2012; Mayer és mtsai., 2013; Gácser, 2015; Höfs és mtsai., 2016; Tóth és mtsai., 2017b).
- A foszfolipázok a foszfolipidek bontását katalizáló enzimek, és elősegítik a gazdaszervezetben fellelhető lipidek szénforrásként történő hasznosítását, valamint különböző gyulladásos folyamatok modulálásában vesznek részt.
- Egy nemrégiben felfedezett gombatoxin peptidről, a kandidalizinről, mint a *C. albicans* fertőzés általi epitel-károsodásban és a gazdaszervezet felismerésében szerepet játszó alapvető molekuláról számoltak be (Moyes és mtsai., 2016). A kandidalizin egyértelmű szerepet játszik az inflammaszóma aktiválásában és a sejtkárosodás indukciójában. Ezen

folyamatok során számos gyulladásos molekula, mint például az IL-6, IL-17, NLRP3 és GM-CSF, szintje emelkedik meg. Ezek a molekulák gyulladásos válaszokat váltanak ki, és krónikus jelenlétük összefüggésbe hozható a karcinogenezissel. A kandidalizint az *ECE1* gén kódolja, amelyet a *C. albicans* virulenciafaktoraihoz, például az adhézióhoz és a hifaképző tulajdonságokhoz kapcsolnak (Engku és mtsai., 2020). Expresszióján keresztül hozzájárul a kandidalizin pórusképző toxin szekretálódásához, melynek segítségével a sejthez kapcsolódó *Candida* képes az adott sejt sejtfalában pórusokat képezni és ezzel károsítani, illetve elpusztítani az adott sejtet (Wilson és mtsai., 2016). Elsősorban epitéliális sejt felszíneken megtalálható sejtek károsítását idézi elő a kandidalizin pórusképző toxin (Cota és Hoyer, 2015).

- A *C. albicans* fajok esetén jellemző a valódi hifaképző képesség (Butler és mtsai., 2009). A gombasejtek hifáik segítségével be tudnak hatolni a gazdasejtekbe és képesek a gazdasejt pusztulását előidézni (Köhler és mtsai., 2014).

III.5. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* által okozott kórképek

A *C. parapsilosis* a humán bőrfelszín gyakori kommenzalistája és a bőrfelszín több területéről is gyakran izolálható (Trofa és mtsai., 2008). Egy tanulmány során egyik esetben a vizsgált személyek bőrének 14%-áról (Marples és Somerville, 1968), másik esetben 25,5%-áról (Rafat és mtsai., 2018) sikerült *C. parapsilosis* törzs kitenyésztése. Ennélfogva a nozokomiális fertőzések megnövekedett terjedéséhez is hozzájárul katétereken és más orvosi eszközökön történő biofilmképző tulajdonságán keresztül (Nosek és mtsai., 2009; Trofa és mtsai., 2008). Elterjedése főleg a csecsemők és újszülöttek körében emelkedett pl. Észak-Amerikában a szisztémás fertőzések negyedéért felelősek.

A fertőzés helye szerint különböző *Candida* által okozott betegségeket különböztetünk meg (Odds, 1998):

- Invazív kandidiázis: Belső szerveket érintő szisztémás fertőzés, ami súlyos megbetegedést okozhat. A *Candida* gomba a véráramba történő bejutás után disszeminál és több szervet vagy szervrendszert érintő fertőzést alakít ki. Ezen szisztémás vagy disszeminált *Candida* fertőzés az egyik legsúlyosabb kategóriába sorolható és legfőképp immunszuppresszált immunrendszerrel rendelkező személyeket érint, mint például az időseket vagy krónikus megbetegedésben szenvedőket. A fertőzés

által kialakulhat hepatitisz, endokarditisz, meningitisz stb. Ilyen súlyos invazív fertőzések főleg a *C. albicans* által alakulnak ki.

- Felszíni kandidiázis:
 - Nyálkahártyát érintő kandidiázis: Leggyakoribb előfordulása a csecsemők körében megjelenő szájpenész, krónikus betegek esetén (pl. AIDS-es beteg) nyelőcsövet érintő kandidiázis vagy a nők esetében gyakran előforduló vulvovaginális kandidiázis.
 - Bőrt érintő kután kandidiázisok: A körömgombásodás, körömágy gyulladás, mint jellegzetes kórképek sorolhatók ebbe a kategóriába, valamint a csecsemőket érintő dermatitisz.
 - Krónikus mukokután kandidiázisok (CMC): Immunelegtelenségben szenvedő páciensek esetén alakulhat ki és hosszabb távon okozhat tüneteket. Nyálkahártyát, bőrfelületet vagy körömfelületet érintő kandidiázisokról beszélhetünk. *C. parapsilosis* fertőzések esetén általában körömgombásodás, húgyúti fertőzés, artritisz, vulvovaginitisz stb. kialakulása jellemző (Trofa és mtsai., 2008).

III.6. Az invazív kandidiázisok epidemiológiája

A *Candida* fajok (köztük a *C. parapsilosis* is) a klinikumban egyre nagyobb problémákat okoznak (Pfaller és mtsai., 2010b; Pfaller és mtsai., 2011; Pfaller és Diekema, 2007). Több tanulmányt összesítő elemzésben a csecsemőket érintő kandidiázisokban a *C. parapsilosis* az esetek több mint 33%-áért felelős (Pammi és mtsai., 2013). A *C. parapsilosis* által kiváltott megbetegedések egyre növekvő tendenciát mutatnak, amely már kezd vetekedni a *C. albicans* által kiváltott betegségek előfordulási gyakoriságával (Peman és mtsai., 2011). Egy Észak-Amerikában folytatott kutatás szerint a *C. albicans* izolátumok aránya az 1990-es években Kanadában 64%, az USA-ban 48,9% volt. Ez az arány a 2008-2011 közötti időszakban 38%-ra csökkent és fokozatosan nőtt a *C. tropicalis*, a *C. parapsilosis* és a *C. glabrata* aránya (Lass-Flör, 2009; Zilderberg és mtsai., 2008).

Az invazív *Candida* fertőzések gyakran magas morbiditással és mortalitással, valamint a kórházi tartózkodás hosszának növekedésével járnak. A CDC (Centers for Disease Control and Prevention - Betegségellenőrzési és megelőzési központ-USA) adatai azt mutatják, hogy a kórházi mortalitás a kandidás betegek körében körülbelül 25% (Pappas, 2006; Sievert és mtsai.,

2013). Mivel azonban az invazív kandidiázisban szenvedő embereknek jellemzően már más alapbetegségük is van, nehéz lehet meghatározni a közvetlenül a fertőzésnek tulajdonítható halálozások arányát (Wisplinghoff és mtsai., 2004). Egy tanulmány 19-24%-ra becsülte a kandidémiának tulajdonítható halálozást (Pfaller és mtsai., 2007; Morgan és mtsai., 2005).

A *Candida* fertőzések gyakran előfordulnak a rákos betegek körében, és ezen fertőzések 49%-át a *C. albicans*, míg 11%-át, 10%-át, 9%-át és 11%-át a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis* okozza (Viscoli és mtsai., 1999). Ugyanez a tanulmány arról is beszámolt, hogy a rosszindulatú hematológiai elváltozásban szenvedő betegeknél a *C. albicans* előfordulása 36%-ra csökkent, míg a *C. tropicalis* az említett betegek 14%-ánál fordult elő, a *C. parapsilosis*, a *C. glabrata* és a *C. krusei* pedig 13%-on osztozott (Viscoli és mtsai., 1999).

A *C. albicans* legmagasabb előfordulását a vulvovaginális kandidiázisban Brazíliában végzett epidemiológiai tanulmányok 92,3%-kal (Dias és mtsai., 2011), Argentínában 85,95%-kal (Gamarrá és mtsai., 2014) és Pakisztánban 47,7%-kal (Khan és mtsai., 2018) jelentették. 898 szexuálisan aktív, 16 és 30 év közötti, nem terhes nő részvételével végzett vizsgálat eredménye szerint a Mysore (India) környéki közösségekben a vulvovaginális kandidiázis pozitív diagnózisa, valamint a tünetek megjelenésének esetszáma alacsony értéket mutatott (<19%) (Rathod és mtsai., 2012).

Magyarországon is vizsgálták a kandidémiáért felelős fajok relatív gyakoriságát. A vizsgálat célja a Szegedi Egyetemi Kórház különböző klinikai osztályairól 1996 és 2000 között kapott vértényészetekből származó különböző *Candida* fajok előfordulásának ok-okozati összefüggéseinek, valamint a fertőzésre hajlamosító tényezőknek az értékelése volt. A betegek 73,5%-ánál a fertőzés *C. albicans*, 7,3%-ánál *C. parapsilosis*, 5,9%-ánál *C. krusei*, 4,4%-ánál *C. tropicalis* és 3%-ánál *C. glabrata* által alakult ki, a többi esetben egyéb *Candida* faj és a *Cryptococcus neoformans* volt a fertőzésért felelős mikroba (Dóczi és mtsai., 2002).

III.7. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* előfordulása az emberi bőrön, a kután kandidiázisok

A *C. parapsilosis* az egészséges humán bőrfelületek gyakori kommenzalistájaként ismert (Trofa és mtsai., 2008) és időközönként ez az élesztő is képes bőrbetegségek kialakítására (Odds, 1994; Havlickova és mtsai., 2008; Trofa és mtsai., 2008).

A bőr kandidás megbetegedéseit (kután kandidiázisok) leggyakrabban a *C. albicans* okozza (Odds, 1994; Dismukes és mtsai., 2003; Lima-Neto és mtsai., 2010). Több tanulmány

beszámol róla, hogy a *C. albicans* felnőtt egészséges egyének bőrén csak ritkán vagy nem is fordul elő nem képezi részét az emberi bőr normál flórájának (Rippon, 1974; Szalka, 2000; Dismukes és mtsai., 2003). Ezen vizsgálatokban az izolálási arány 0% és 17,4% között mozgott és a közölt értékek átlaga 4,82% volt (Odds, 1988).

Ezekon a vizsgálatokon túl más tanulmányok a humán bőr kommenzalistájaként említik a *C. albicans*-t (Kashem és Kaplan, 2016). Egy frissebb metagenomikai vizsgálat bőrről származó *Candidákat* azonosított, de csak nemzetségi szinten (Han és mtsai., 2018). Egy Iránban készült tanulmány a *C. parapsilosis* dominanciáját mutatta ki egészséges bőrfelületen, azonban a vizsgált egyének 16%-áról izoláltak *C. albicans*-t (Rafat és mtsai., 2018). A bőr kandidás megbetegedéseit mutatja be az 1. táblázat Odds (1988) és Rippon (1974) alapján:

1. táblázat. Kután kandidiázisok típusai és általuk okozott tünetek.

Betegség neve:	Tünetek:
<i>Candida</i> intertrigo	A testhajlatok, bőrredők, ujjközök betegsége. Viszketéssel, bőrpírral, kiütésekkel, szabálytalan szélű piros foltok megjelenésével jár.
Pelenka dermatitisz	Tipikusan újszülötteknél, illetve pelenkát viselő felnőtteknél alakul ki. Jellemző a kiütések megjelenése a fenéken, valamint a perianális tájékon (4. ábra).
<i>Candida</i> paronychia	A körömágy jellemző megbetegedése, gennyes duzzanat és fájdalom jellemző rá (4. ábra).
<i>Candida</i> granuloma	Főleg gyermekeknél kialakuló, igen ritka kórkép. Vaszkuarizált papulák jellemzik, melyeket vastag sárgásbarna kéreg fed. Ezek szarvszerűen akár 2 cm-re is kiemelkedhetnek a bőrből (4. ábra).
<i>Candida</i> onychia	A köröm <i>Candida</i> okozta fertőzése. A köröm disztrófiáját okozza és a dermatofiták okozta körömgombásodással ellentétben komoly fájdalommal járhat.

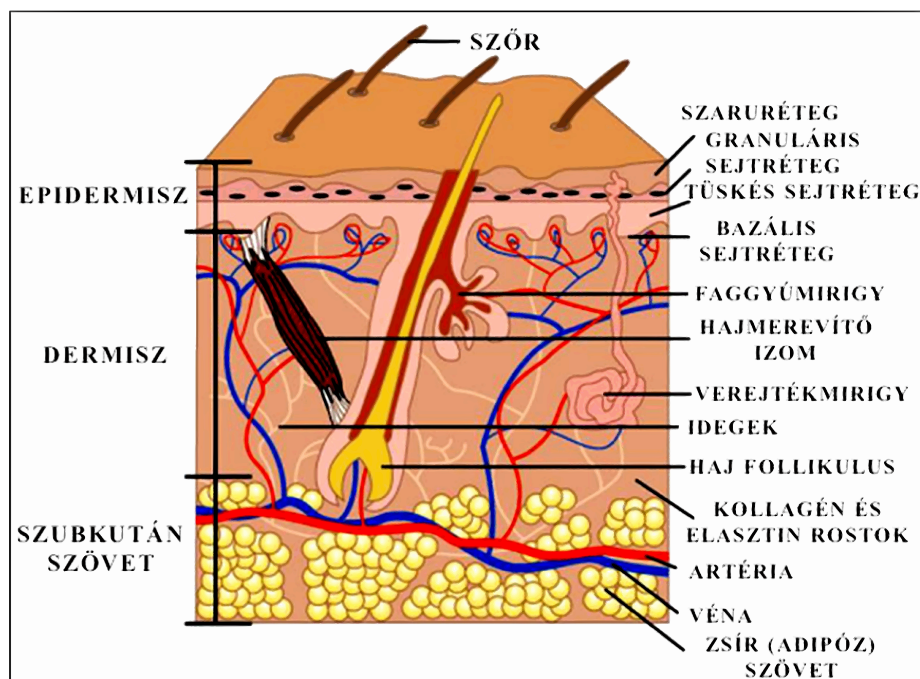
Krónikus mukokután kandidiázis	A bőr és a nyálkahártyák krónikus kandidás fertőzése, melyek főként immunológiailag legyengült egyéneknél fordulnak elő.
---------------------------------------	--



4. ábra. A bőr kandidás megbetegedésének néhány klinikai megjelenése. Pelenka dermatitisz (Klunk és mtsai., 2014); *Candida* paronychia (<https://dermnetnz.org/topics/paronychia>); *Candida* granuloma (<https://www.altmeyers.org/en/dermatology/candida-granuloma-121901>).

III.8. A humán bőr anatómiai struktúrája

Az emberi bőr három különböző rétegből áll: az epidermiszből, a dermiszből és a hipodermiszből (szubkután szövet), amelyek mindegyike különböző funkciókat lát el a testünkben (5. ábra.). A bőr legkülső rétege az epidermisz, amelyet keratinociták építenek fel. Különböző rétegei vannak, a sejtek differenciálódási állapotától függően. Az első réteg az alapmembrán felett helyezkedik el, az úgynevezett stratum basale (bazális sejtréteg). Biológiailag aktív, proliferálódó sejteket tartalmaz, amelyek folyamatosan osztódnak, hogy új sejtekkel lássák el a felsőbb rétegeket és segítsék a szövetek fiatalodását és regenerálódását. A következő réteg a stratum spinosum (tüskés sejtréteg), ahol a keratinociták differenciálódni kezdenek. Ezen réteg fölött található a stratum granulosum (granuláris sejtréteg), ahol a sejtek tovább differenciálódnak, ami a sejtek alakjának kifejezett megváltozásához vezet (Yokouchi és mtsai., 2016). A hám legfelső rétege a stratum corneum (szaruréteg). Ez a struktúra elhalt, ellaposodott sejtekből áll, amelyek mechanikai érintkezés hatására folyamatosan leválnak. Fontos fizikai és mechanikai védelmet nyújt, és a sejtleválás a különböző mikrobák megtelepedésének szabályozásában is segít azáltal, hogy eltávolítja őket a bőrfelszínről (Yokouchi és mtsai., 2018).



5. ábra. A bőr anatómiai struktúrája (<https://aminoacidstudies.org/skin-and-hair/>) alapján.

Az epidermisz alatt található a dermisz réteg. Ez a szövet fibroblasztokból áll és két regionálisan elkülönülő területet tartalmaz, a felszíni papilláris és a mélyebb retikuláris dermiszt. Míg a felső rész szoros kölcsönhatásban áll a felhámmal, addig a retikuláris dermisz a mélyebb bőrrétegekkel áll kapcsolatban. Fontos funkciói vannak nemcsak az epidermisz tápanyagellátásában, hanem a különböző bőrfüggelégeket is tartalmazza, beleértve a szőrtüszőket, az ekrin és az apokrin mirigyeket (Yokouchi és mtsai., 2018).

A legbelső rész a hipodermisz, amely laza kötő- és zsírszövetekből áll, különböző sejttípusokkal, például fibroblasztokkal, zsírsejtekkel és makrofágokkal együtt. Ez a régió nemcsak a mechanikai stressztől véd, hanem a hőszabályozásban is szerepet játszik, főként hideghatás és testmozgás során (Paris és mtsai., 2008).

III.9. Az egészséges humán bőr mikrobiom

Születésünk óta fogva mikroorganizmusok széles skálájának vagyunk kitéve, beleértve a baktériumokat, gombákat és vírusokat (Grice és mtsai., 2011). Ezek közül néhány képes megtelepedni a bőrünkön és a különböző emberi sejtekkel együtt egy összetett ökoszisztémát alkotnak. Ennek a közösségnek a fő alkotóelemei a különböző baktériumfajok. Bőrünkön 19

törzsbe tartozó, mintegy 1000 baktérium fajt mutattak ki, melyek leginkább az epidermiszben találhatók (Grice és mtsai., 2009). A négy domináns baktériumtörzs és leggyakoribb képviselőik, amelyek az emberi bőrt kolonizálják, az *Actinobacteria* (*Propionibacterium* és *Corynebacterium* fajok), a *Proteobacteria*, a *Firmicutes* (*Staphylococcus* fajok) és a *Bacteroidetes*. A pontos összetétel egyéni különbségein kívül regionális eltérések is léteznek, mivel a környezeti paraméterek, köztük a pH, a hőmérséklet, a nedvesség és a bőr finom anatómiai szerkezete is változik (Grice és mtsai., 2011 és 2014). A mikrobiom pontos funkciója az egészséges bőrben illetve a patogenitás kialakításához alkalmas körülmények között jelenleg nem tisztázott (Gallo és mtsai., 2011; Littman és mtsai., 2011). A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a normál bőr mikrobiom képes megvédeni minket a patogén vagy káros behatolókkal szemben azáltal, hogy a rendelkezésre álló táplálékforrások felhasználásával gátolja a kolonizációjukat, valamint aktívan termel antimikrobiális tulajdonságokkal rendelkező molekulákat (antimikrobiális peptidek) (Gallo és mtsai., 2011; Iwase és mtsai., 2010). Ezen funkciók mellett jótékonyan modulálhatják immunrendszerünket is (Gallo és mtsai., 2011; Lai és mtsai., 2009). Ezek az ismeretek arra utalnak, hogy ez a komplex ökoszisztéma fontos szerepet játszik a bőr homeosztázisának fenntartásában (Zeeuwen és mtsai., 2013).

III.10. Keratinociták és az immunválaszban betöltött szerepük

Bőrünk nemcsak mechanikai, hanem immunológiai védelemmel is szolgál szervezetünk számára. Ezt főként a benne elhelyezkedő sokféle immunsejt teszi lehetővé, melyek mind az adaptív, mind a természetes immunválaszokban részt vesznek. Ilyenek például az epidermiszben megtalálható Langerhans-sejtek és CD8⁺ T-sejtek, de főképp a dermiszben lokalizálódó makrofágok, dendritikus sejtek, neutrofil granulociták, hízósejtek, CD4⁺ T-sejtek, γδ T-sejtek és természetes ölő sejtek (Nestle és mtsai., 2009). Egyre több kutatás igazolja, hogy az epidermiszben található keratinociták (hámsejtek) is rendelkeznek immunológiai jellegű funkciókkal.

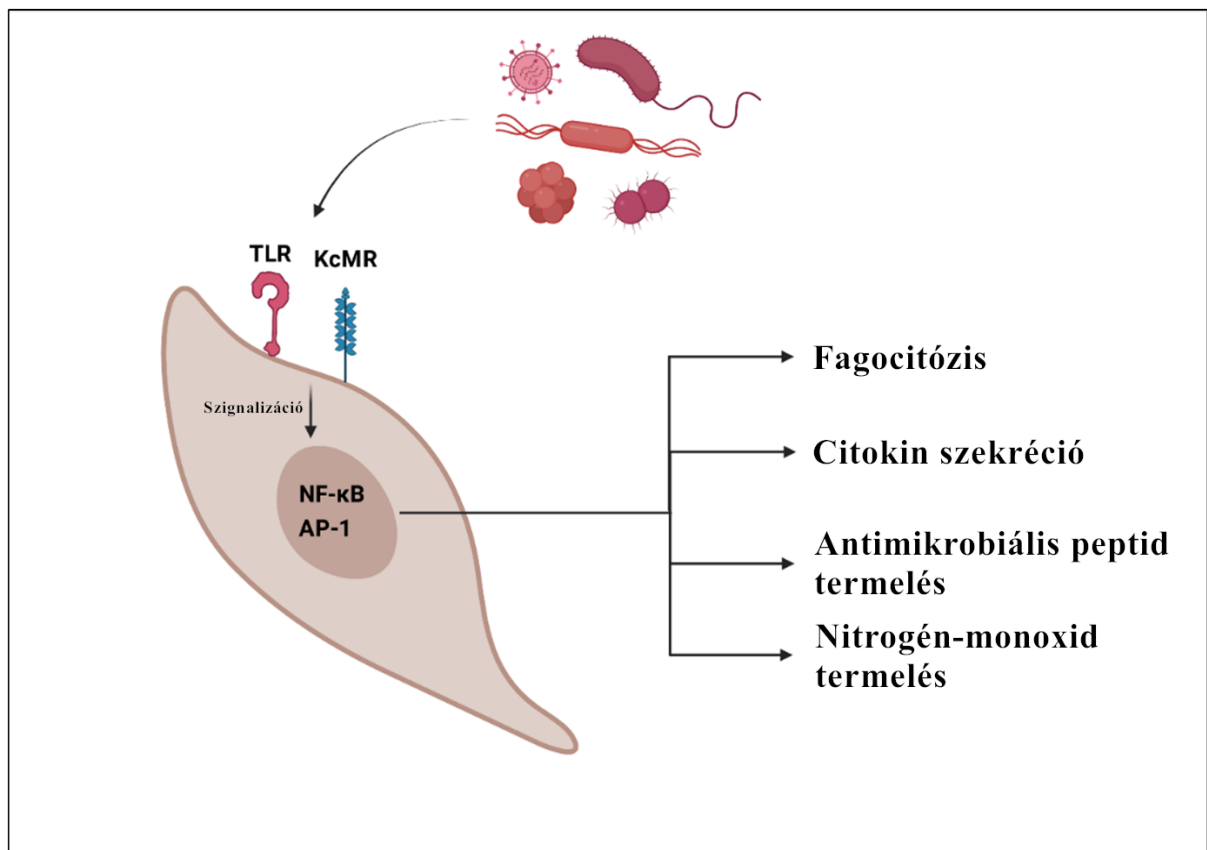
A bőr hámsejtjei képesek felismerni patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP, pathogen associated molecular pattern). Ezt a patogén felismerő receptorok (PRR, pathogen recognition receptor) segítségével teszik, melyek különböző transzkripciós faktorok (pl. Nuclear Factor-κB, azaz NF-κB; Activator Protein-1, azaz AP-1) aktiválásán keresztül

vezetnek válaszreakciókhoz (Pivarcsi és mtsai., 2005; Pivarcsi és mtsai., 2004; Nestle és mtsai., 2009).

A 11 humán Toll-szerű receptor (Toll-like receptor, TLR) közül humán keratinocitákban a plazmamembránban a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6, illetve endoszómákban a TLR3 és TLR9 expresszióját már kimutatták. Ezek mind különböző mikrobiális PAMP-okat ismernek fel (pl. a TLR5 a flagellint, a TLR4 bakteriális lipopoliszacharidot, a TLR2/TLR6 pedig többek közt a gomba eredetű zimoszánt) (Pivarcsi és mtsai., 2005; Nestle és mtsai., 2009). Egy Magyarországon zajlott kutatás kimutatta a bőr keratinocitákban egy mannózeceptor jelenlétét, mely mannánt képes felismerni. Ez a receptor a KcMR elnevezést kapta (Szolnoky és mtsai., 2001; Pivarcsi és mtsai., 2004).

Az intracelluláris NOD-szerű receptorok (NOD-like receptor, NLR) közül az NLRP3 fehérjéről már igazolták, hogy keratinocitákban szerepet játszhat gyulladásos folyamatokban, például allergiás folyamatokban vagy UV fény hatására. Ilyenkor az NLRP3 inflammaszóma multiprotein komplexekbe rendeződik, melyek IL-1 β és IL-18 gyulladásos citokinek termelését okozzák (Nestle és mtsai., 2009).

A bőr hámsejtjei effektor funkciókkal válaszolnak a mikrobák érzékelését követően (Pivarcsi és mtsai., 2005; Pivarcsi és mtsai., 2004; Nestle és mtsai., 2009). Antimikrobiális peptidek termelésével (pl. β -defenzinek) a mikroorganizmusok közvetlen elpusztítását és az immunsejtek sérülés/fertőzés helyére való toborzását segítik. Citokinek szekréciója segítségével szabályozhatják a gyulladásos választ (pl. IL-6, IL-1 β , IL-10) és kemotaktikusak lehetnek egyes immunsejtekre nézve (pl. IL-8, CCL5). Nitrogén-monoxid (NO) termelésével, mely során a képződő NO antimikrobiális hatású mind vírusok, baktériumok és gombák ellen. Fagocitózis által a keratinociták kis mértékben képesek lehetnek mikrobák bekebelezésére (Csató és mtsai., 1986) (6. ábra).



6. ábra. A keratinociták mikróbak elleni válasza Pivarcsi és mtsai. (2004 és 2005) nyomán. Az ábra a BioRender.com segítségével készült.

III.11. A gombák ellen irányuló adaptív immunválasz

A természetes immunitással szoros összefüggésbe hozható a gombafertőzések során kiváltott adaptív immunválasz. Legfontosabb effektorai közé sorolhatjuk a B- illetve T-limfocitákat, melyek a humorális vagy celluláris immunitásért felelősek (Luckheeram és mtsai., 2012). A T-limfociták esetén beszélhetünk $CD4^+$ Th és $CD8^+$ citotoxikus T-sejtekről (7. ábra). A $CD8^+$ T-sejtek a vírus által fertőzött vagy tumoros sejtek direkt eliminációjában vesznek részt (Kaech és Cui, 2012), a $CD4^+$ limfociták egyéb immunsejtek (pl. $CD8^+$ T-sejtek, B-limfociták, stb.) aktivációját és effektor funkcióit regulálják (Luckheeram és mtsai., 2012). A CD^+ Th sejteket funkciók és citokin profil alapján több populációra tudjuk felosztani. Eleinte a Th sejtek két nagyobb csoportja volt ismert, a Th1 és a Th2 (Mosmann és Coffman, 1989), majd később fedezték fel a regulátoros T-sejteket (Treg sejtek) (Shevach, 2001) és a Th17 populációt (Park és mtsai., 2005). A naiv T-limfociták effektor sejtekké történő differenciálódásának kezdő lépése a T-sejt receptor (TCR) aktiváció APC (Antigén prezentáló sejt) segítségével MHCI

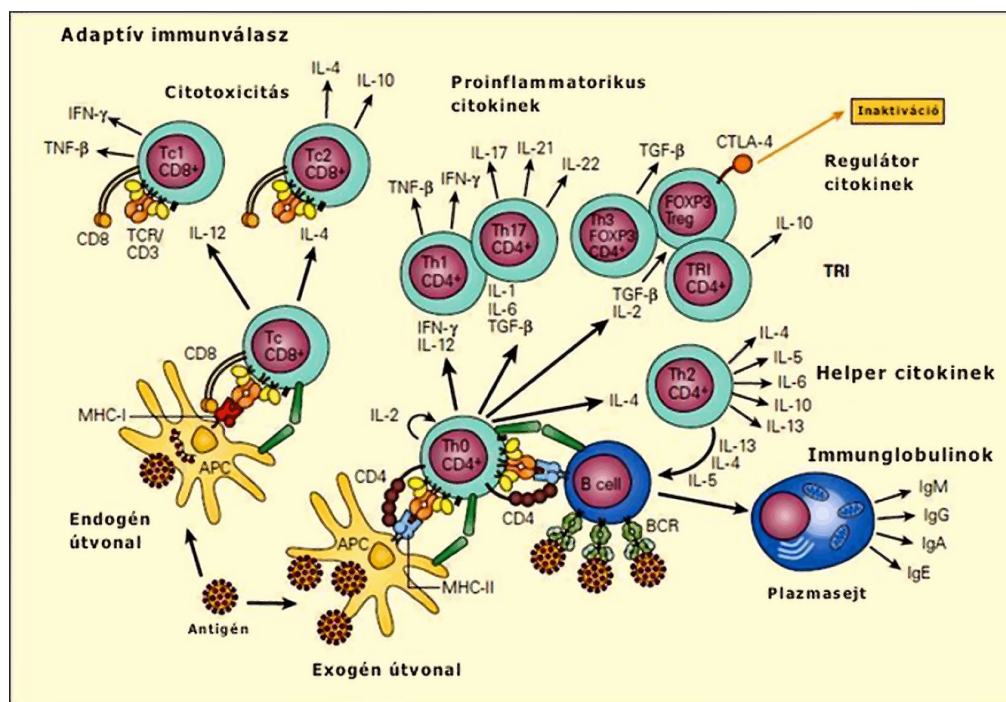
vagy MHCII molekulán prezentált antigénnel történő interakción át (Luckheeram és mtsai., 2012). A Th sejtek polarizációját több tényező határozza meg, ilyen például a citokin környezet, az APC típusa vagy az antigén koncentrációja. A PRR aktiváció meghatározza az APC segítségével szekretált citokin spektrumot, így a Th sejtek differenciációjának szabályozásában fontos szerepet kapnak a receptorok (Romani, 2011). Amennyiben az antigén stimulus megszűnik, az effektor T-sejtek elpusztulnak, és egy kisebb részük hosszabb élettartamú memóriasejtté differenciál (Sallusto és mtsai., 2004).

A Th1 sejt differenciálódásához szükséges legfontosabb citokin az APC által termelődő IL-12 (Luckheeram és mtsai., 2012). A Th1 sejtek nagyobb mennyiségben képesek IFN γ -t termelni, ami a fagociták aktivációjának növekedésén keresztül segít az intracelluláris patogének eliminálásában (Luckheeram és mtsai., 2012). A hatékony fagocitózishoz hozzájárul az opszonizáló antitestek termelődése, amely a Th1 sejtek által indukált (Borghi és mtsai., 2014). A Th1 differenciálódást transzkripciós faktorok is szabályozzák, mint a T-bet. A T-bet expresszió növekedés fokozza az IFN γ termelést, de gátló hatással bír a Th2 és Th17 vonalak fejlődésére (Romani, 2011). A Th1 sejtek gombaellenes hatása kisebb mértékben a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) és a GM-CSF citokinek termelésén keresztül valósul meg. A TNF- α a makrofágok aktivációján keresztül ér el hatást, míg a GM-CSF a neutrofil granulociták aktivációján át, és a makrofágok reaktív oxigén gyök (ROS) termelésének fokozásával járul hozzá a gombaellenes válaszhoz (Romani 2011; Brown 2011; Verma és mtsai., 2014; Netea és mtsai., 2015; Lionakis és mtsai., 2017; Dambuza és mtsai., 2017; Dambuza és mtsai., 2018).

A Th2 sejtek extracelluláris parazitákkal szemben hatékonyak, illetve allergiás folyamatokban kapnak szerepet (Luckheeram és mtsai., 2012). A Th2 sejtek által termelt legfontosabb citokinek az IL-4, IL-5, IL-10 és IL-13 (Luckheeram és mtsai., 2012). A Th2 sejtes válasz a gombás fertőzések esetén általában kedvezőtlen, csökkentik a Th1 sejtek által kialakított antimikrobiális effektor funkciókat, valamint alternatív makrofág aktivációhoz járulnak hozzá, ami a patogén perzisztenciáját növeli (Romani, 2011) (7. ábra).

A gombafertőzésekben kiemelkedően magas szerepet kap a Th17 populáció, amiről az évek során jelentős ismeretanyag halmozódott fel (Hernandez-Santos és Gaffen, 2012). A Th17 sejtek legfontosabb effektor citokinjei az IL-17, IL-21 és IL-22 (Luckheeram és mtsai., 2012) (7. ábra). Az IL-17 intenzív gyulladásos választ generál, elősegíti az IL-6 és GM-CSF citokin, valamint a KC, IL-8 és CCL-5 kemokin termelését (Shen és Gaffen, 2008). Hozzájárul a neutrofilek fertőzés helyére történő vándorlásához. Az IL-22 gyulladásos hatással bír, és

elősegíti a citokinek, valamint kemokinek szintézisét (Ouyang és mtsai., 2008). Antimikrobiális peptid termelő tulajdonságán keresztül csökkenti a gyulladásos folyamatokat a mukóza védelme érdekében (Romani, 2011).



7. ábra. A T-sejtek differenciálódásának két fő útvonalának sematikus ábrázolása. (Bellanti JA, 2012, Immunology IV: *Clinical Applications in Health and Disease*. I Care Press, Bethesda, MD).

A regulátoros T-sejtek (Treg sejtek) a gyulladásos válasz szabályozásában kapnak fontos szerepet anti-inflammatorikus hatásuk révén. IL-10 és TGF- β termelésükön keresztül a gyulladásos folyamatok gátlásában vesznek részt, ilyen módon a szöveti destruktivitást csökkentik és előzik meg (Luckheeram és mtsai., 2012). A Treg sejtek által termelt IL-10 szükséges a normál mikrobiális egyensúly és tolerancia kialakításához és fenntartásához (Romani, 2011). Treg hiányos egerekben a *Candida* elleni rezisztencia emelkedik disszeminált kandidiázis fertőzés során (Netea és mtsai., 2004; Kroetz és Deepe, 2010).

A citotoxikus T-limfocitáknak a gombák elleni védekezésben kisebb szerepet tanúsítanak, azonban a gombaellenes immunválaszhoz hozzájárulnak, mivel képesek gátolni a *C. albicans* hifák növekedését *in vitro* (Beno és mtsai., 1995). HIV fertőzött orális

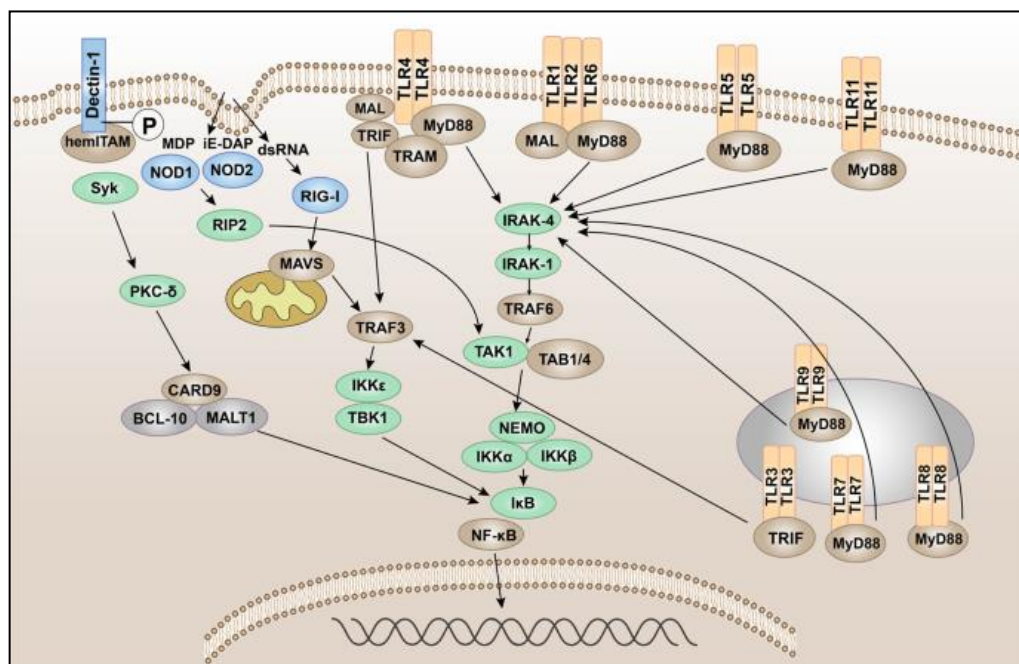
kandidiázisban szenvedő betegek esetén mutatták ki a száj nyálkahártyájában a CD8⁺ sejtek infiltrációját (Myers és mtsai., 2003).

III.12. Patogén felismerő receptorok (PRR) az antifungális immunitásban

A mikrobiális és gomba eredetű patogén asszociált molekuláris mintázatokat a patogén felismerő receptorok segítségével képesek felismerni a sejtek. Jelenleg legalább 36 olyan receptort ismerünk, amely ebbe a csoportba tartozik. A PRR-ek fogalmát 1989-ben Janeway vezette be (Janeway, 1989). Evolúciósan konzervált receptorok csoportjáról beszélhetünk. Janeway elmondása szerint a PRR-ek evolúciós szempontból megelőzték a B- és T-limfociták specifikus antigénkötő receptorainak kialakulását. Az immunválasz kialakulásának szempontjából összetett szerep kapcsolható a PRR-ekhez és napjainkra egy intenzíven kutatott területté is vált. Négy nagy csoportját különböztetjük meg a PRR-eknek: Toll-szerű receptorok (TLR-ek), C-típusú lektin receptorok (CLR-ek), NOD-szerű receptorok (NLR-ek) és RIG-I-szerű receptorok (RLR-ek) (Plato és mtsai., 2015). Munkánk szempontjából a TLR receptorok kapnak fontosabb szerepet ezen csoportok közül.

A TLR-ek I-es típusú transzmembrán fehérjék, extracelluláris doménjük leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmaz, a citoplazmatikus régióban a TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) domén található meg (Kumar és mtsai., 2011). A leucin-gazdag ismétlődés specifikus PAMP-ok felismerésében, a TIR domén a szignalizáció elindításában játszik fontos szerepet. Elhelyezkedésük szerint a TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 és TLR10 a sejtfelszínen találhatóak, míg a TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 és TLR13 endoszómáisan lokalizálódik. Mikrobiális sejtfal és membrán komponensek (lipopoliszacharid, mannán, peptidoglikán, lipopeptid, flagellin) felismerésében nélkülözhetetlenek a sejtfelszínen lokalizálódó TLR-ek. Ezzel szemben az intracelluláris lokalizációt mutató TLR-ek a virális és bakteriális nukleinsavak felismerésére képesek. A TLR receptorok képesek homo- vagy heterodimert képezni a ligand kötéséhez, ez a folyamat az adaptor fehérjék, például a MyD88 (Mieloid differenciáció elsődleges válasz 88) és a TRIF (TIR domént tartalmazó adapter-indukáló interferon-béta) kötődéséhez vezet (Kawai és Akira, 2006). A TLR jelátvitel MyD88 és TRIF függő úton valósulhat meg (8. ábra). A MyD88 fehérje komplexet formál az interleukin-1 receptor asszociált kinázokkal (IRAK1 és 4). Az IRAK1 kötődik a TRAF6-hoz (Tumor nekrosis faktor receptor-asszociált faktor 6) (Takeda és mtsai., 2003). A TRAF6 hozzájárul a TAK1 (Transzformáló növekedési faktor béta-aktivált fehérje kináz 1) és az IKK

(I κ B-kináz) komplex kialakulásához és ilyen módon az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódásához (Kawai és Akira, 2006). A TAK1 képes aktiválni a MAP kináz család egyes tagjait úgy, mint az ERK1/2-t (Extracelluláris szignál-regulált kináz), JNK-t (c-Jun N-terminális kináz) és p38-at (Mitogén aktivált fehérje kináz) és ilyen módon az AP-1 (Aktivátor fehérje 1) transzkripciós faktor szabályozásában vesznek részt. Az AP-1 aktivációján keresztül növekedési faktorok, citokinek és kemokinek szekréciója indukálódik (Hess és mtsai., 2004). A TLR2 és TLR6 heterodimert alkothat és képes a *C. albicans* foszfolipomannánjának felismerésére vagy gyulladásos mediátorok termelésére (Gantner és mtsai., 2003; Jouault és mtsai., 2003).



8. ábra. Mintázat felismerő receptorok által közvetített NF- κ B jelátvitel. Az NF- κ B fehérje szabályozhatja a génexpressziót és befolyásolhatja a különböző biológiai folyamatokat, beleértve a veleszületett és adaptív immunitást, a gyulladást, a stresszválaszt, a B-sejtek fejlődését és a nyirokszervek kialakulását (Danyang Li és Minghua Wu, 2021).

Az intracelluláris NOD-szerű receptorok (NLR) egy része inflammaszóma fehérjekomplexek részeként működik. Az inflammaszómák aktiválódhatnak az ASC fehérjén keresztül, ahol is a pro-kaspáz-1 érett kaspáz-1-gyé történő hasítását végzik. A kaspáz-1 a pro-interleukin-1 β , valamint a pro-interleukin-18 proteolízisét katalizálja érett formává (Martinon és mtsai., 2009). A kaspáz-1 mindemellett szerepet kaphat a programozott sejthalál iniciációjában is (Zhong és mtsai., 2013). Emberekben az NLR mutációkat és

polimorfizmusokat nem hozták összefüggésbe mukokután kandidiázissal, de az NLRP3 hibás aktivációja növeli a *C. albicans* kolonizációját a bélben és az NLRP3 polimorfizmus hajlamosít a visszatérő vulvovaginális kandidiázisra (RVVC) (Rehaume és mtsai., 2010; Lev-Sagie és mtsai., 2009). Egerekben a makrofág-eredetű NLRP3 felismeri a *C. albicans* hifa formáit és az ASC, az NLRP3 vagy az IL-1R hiánya csökkent *C. albicans* rezisztenciához vezet a *C. albicans* fertőzés intravénás és orális útjain (Vanaja és mtsai., 2015). Az NLRP10 a *C. albicans* elleni védekezésben is szerepet játszik a dendritikus sejtek migrációjának és a T-helper sejtek differenciálódásának indukciója révén. A strómaszövetekből származó NLRC4-ről is bebizonyosodott, hogy döntő szerepet játszik az orális kandidiázis elleni immunitás közvetítésében (Tomalka és mtsai., 2011; Tsuchiya és Hara, 2014).

A C-típusú lektinek a receptorok nagy családját alkotják, amelyek extracelluláris szénhidrátfelismerő doménjükön keresztül glikánokhoz kötődnek és különböző citoplazmatikus doméneken keresztül intracelluláris jelátvitelt közvetítenek (Zelensky és Gready, 2005). A dektin-1 az egyik leggyakrabban vizsgált C-típusú lektin. A Dektin-1 a legtöbb gombafaj, köztük a *C. albicans* sejtfalán található β -glükánt ismeri fel (Hardison és Brown, 2012). A Dektin-1 jelátvitel Syk-függő úton aktiválja a sejteket, ami a CARD9-BCL10-MALT1 trimer kialakulásához és az NF- κ B aktiválásához vezet, ami a proinflammatorikus citokinek, például az IL-1 β , IL-6 és IL-12 transzkripciójához vezet (Plato és mtsai., 2015; Hardison és Brown, 2012).

A humán bőr keratinocitákban található KcMR (Keratinocita mannóz-kötő receptor) képes mannánt kötni és felelős a *Candida*-ellenes válasz kezdeti szakaszáért. A mannán és a mannán-BSA komplex gátolta a keratinociták *Candida*-ölő aktivitását azáltal, hogy gátolja a gombák tapadását a keratinocitákhoz (Szolnoky és mtsai., 2001; Pivarsci és mtsai., 2004). Szolnoky és munkatársai sikeresen izoláltak egy mannóz-kötő receptort keratinocita kivonatokból mannóz-affinitás kromatográfiával, ezt a receptort keratinocita mannózkötő receptornak (KcMR) nevezték el (Szolnoky és mtsai., 2001). A KcMR hasonlít a makrofág mannózureceptorhoz (MMR) néhány biokémiai tulajdonságában, mint például a Ca-dependencia, a proteolízisre való érzékenység, de a makrofág receptorral ellentétben nem internalizálja hatékonyan a mannózt. *In vivo* a KcMR expresszióját az epidermisz szuprabazális rétegeiben mutatták ki, ami a KcMR fontos védőfunkciójára utal a bőr gombaellenes immunválaszában (Szolnoky és mtsai., 2001). Különböző effektormechanismusok korlátozhatják a *Candida* növekedését a fertőzött gazdaszervezetekben. A közelmúltban kimutatták, hogy a nitrogén-oxid (NO) döntő szerepet játszik a keratinociták *Candida*-ölő

mechanizmusában (Fierro és mtsai., 1996; Liew és Cox, 1991). A *Candida* sejtek KcMR-hez való tapadása NO-termelést indukálhat. Az NO-szintézis a különböző baktériumok, vírusok és gombák elleni nem-specifikus védekező mechanizmusok szükséges összetevője.

III.13. Keratinociták válasza a *Candida* fertőzésekre

A humán bőr keratinociták és a *Candida* között zajló interakciókról kísérletes munkák területén eddig csak a *C. albicans* kapcsán lelhetőek fel információk a szakirodalomban. Általánosságban ismert, hogy a bőr hámsejtjei a TLR receptorok és KcMR receptor segítségével képesek felismerni a gombát és hatékony effektor funkciókkal lépéseket tenni a fertőzéssel szemben (Pivarcsi és mtsai., 2004). A keratinocita sejt több mechanizmuson keresztül tesz lépéseket a gombás fertőzés ellen:

- Adhézió: A szakirodalomból már ismert, hogy a *C. albicans*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* képesek kapcsolódni és hozzátapadni a humán keratinocita sejtek felszínén megtalálható receptorokhoz (Ullmann és Berdicevsky, 2011; Gácsér és mtsai., 2007), főleg a *C. albicans* valódi hifaképző tulajdonságának köszönhetően. Egy korábbi vizsgálatban az elektronmikroszkópos megfigyelések azt mutatták, hogy mindhárom vizsgált élesztő megtapadt a bőrön, de a *C. albicans* nagyobb mértékben fedte be a teljes bőrmódellet, mint a *C. tropicalis* vagy *C. parapsilosis* (Ullmann és Berdicevsky, 2011). A blasztokonídiumokat elsősorban a *C. albicans* esetében mucinszerű anyag borította. Valamennyi *Candida* faj mutatott biofilmképződésre jellemző tulajdonságokat (Trofa és mtsai., 2008). Az emberi bőr, mint modell használata a különböző élesztőgombák tapadásának *ex vivo* vizsgálatára magyarázatot adhat, illetve a *C. albicans* dominanciájára a bőr patogenitásában.
- Elimináció: A bőr keratinocitái képesek a *C. albicans* elpusztítására (Csátó és mtsai., 1990). Ebben a folyamatban kulcsszerepet kapnak a TLR receptorok (pl. TLR2, TLR4) illetve a KcMR receptor is (Kenderessy és mtsai., 1996; Szolnoky és mtsai., 2001; Pivarcsi és mtsai., 2004; Pivarcsi és mtsai., 2005). Az NF- κ B magi transzlokáción át történő szignalizáció és nitrogén-oxid (NO) termelés szintén nagymértékben hozzájárulnak a patogén gomba eliminálásához.
- Citokinek és kemokinek termelése: Korábbi vizsgálatban leírták, hogy a *C. albicans* foszfolipomannánja megemelte az IL-6 és IL-8 citokin, illetve a kemokin mRNS mennyiségét primer bőr keratinociták esetében (Li és mtsai., 2008). Megállapítható,

hogy a *C. albicans* natív foszfolipomannán gyulladásos választ indít el, amelyet citokin és kemokin (IL-6 és IL-8) termelődése, valamint a TLR2, NF- κ B és p38 MAPK jelátviteli útvonalak aktiválása jellemez. A gomba által termelt és még pontosan azonosításra nem került szolubilis faktorok IL-6 és IL-8 szekréciót váltottak ki HaCaT keratinocitákból (Wollina és mtsai., 2004).

- Fagocitózis: Magyar kutatócsoportnak sikerült bizonyítani, hogy bár kismértékben, de a keratinociták is képesek a *C. albicans* gomba bekebelezésére és eliminálására (Csátó és mtsai., 1986). Kután kandidiázisból vett szövetminták esetében megfigyelték az epidermisz hámsejtjeiben a *C. albicans* élesztősejtjeit és hifaelemeit (Scherwitz, 1981).

III.14. Humán bőrkeratinociták által szekretált antimikrobiális fehérjék

A bőr azon tulajdonságát, hogy elpusztítja a behatoló mikroorganizmusokat, számos antimikrobiális hatóanyagnak tulajdonítják, beleértve az endogén antimikrobiális peptideket is. Az emberekben több ilyen peptidet azonosítottak; ezek a következők: hisztatinok, granulizin, laktoferrin, az alfa- és béta-defenzinek, valamint az LL-37 (katelicidin) (Lehrer és mtsai., 1999). A protegrinek kisméretű (~2 kDa) széles spektrumú antimikrobiális peptidek, amelyek sertés neutrofilekben találhatók, ahol katelin-tartalmú prekursorokként tárolódnak. A granulizin, a szapoinszerű fehérjecsaldába tartozó peptid, a humán citolitikus T-limfociták és természetes ölüsejt sejtjeiben található. A laktoferrin egy 80 kDa tömegű vaskötő fehérje, amelynek antimikrobiális amino-terminális doménje (laktoferricin) pepszin indukálta hasítással szabadul fel. Az alfa- és béta-defenzinek a jellegzetes hat cisztein-aminosavuk távolsága és összekapcsolhatósága tekintetében különböznek egymástól (Valore és mtsai., 1998). Ezenkívül a humán alfa-defenzinek a neutrofilekben, valamint a vékonybél Paneth-sejtjeiben találhatók meg, míg a béta-defenzinek (hBD) a hámszövetek termékei (Harder és mtsai., 1997). Eddig hat hBD-t, a hBD-1-től hBD-6-ig, azonosítottak emberi szövetekben, de a hBD-5 és -6-ról még csak kevés ismeret áll rendelkezésre.

A hBD-1 az első izolált humán béta-defenzin, folyamatosan expresszálódik az epidermális keratinocitákban és antimikrobiális aktivitást mutat elsősorban Gram-negatív baktériumokkal szemben, mint például az *Escherichia coli* és *Pseudomonas aeruginosa* (Fulton és mtsai., 1997; Ali és mtsai., 2001). A hBD-1 folyamatos expressziója az epidermisz szuprabazális rétegeiben arra utal, hogy hozzájárul a bőr Gram-negatív fertőzésekkel szembeni

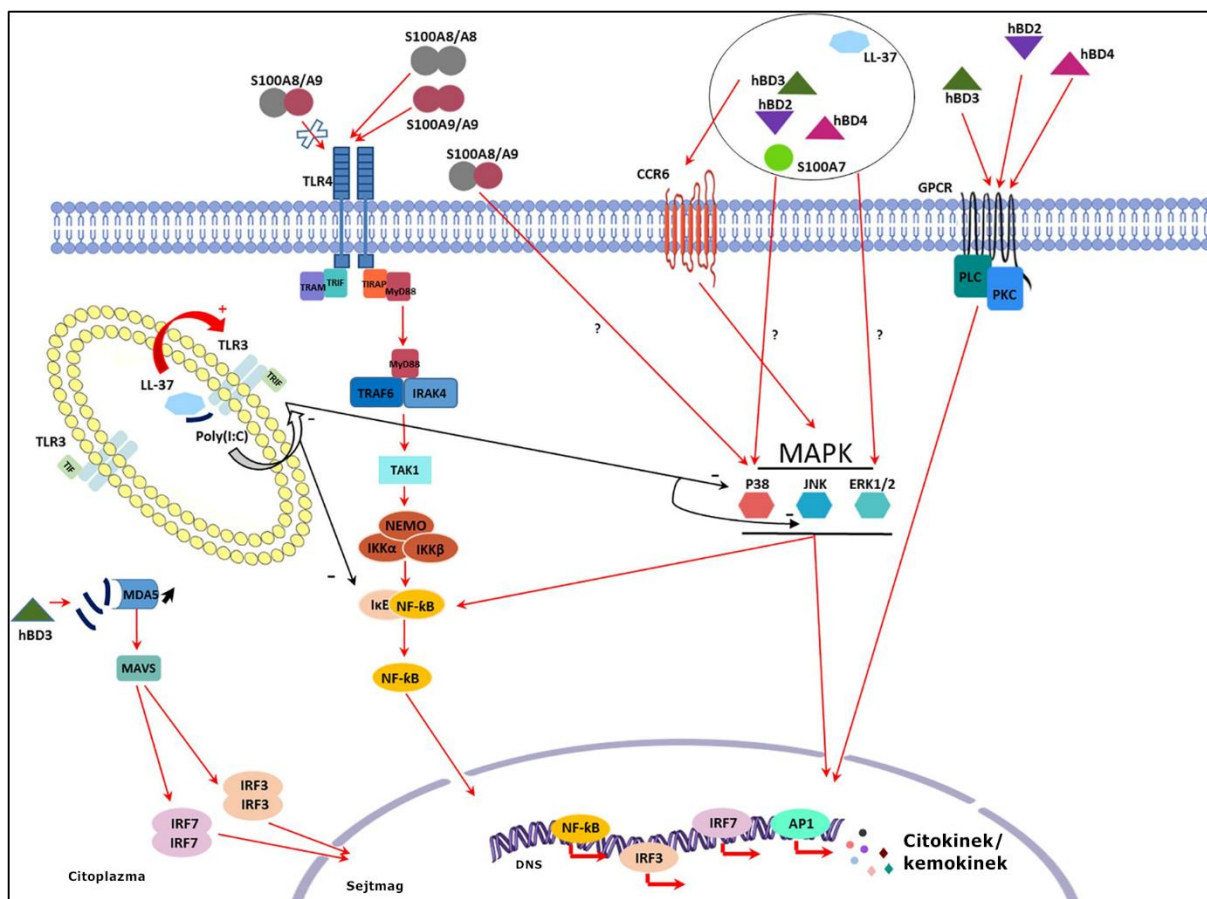
veleszületett rezisztenciájához. A hBD-1-et folyamatosan termelik a különböző hámszövetek, beleértve az urogenitális és légzőszervi traktusokat és a bőrt.

A hBD-2-t eredetileg pikkelysömörös bőrből izolálták, ami arra utal, hogy ez a defenzin részt vehet a bőr védelmében és gyulladásában (Harder és mtsai., 1997). *In vivo* a hBD-2 expressziója az epidermisz felső Malphigian rétegében és a stratum corneumban lokalizálódik, amely a gazdaszervezet fertőzések elleni védekezésének kezdeti fázisában aktív (Ali és mtsai., 2001; Krisanaprakornkit és mtsai., 2000; Oren és mtsai., 2003). hBD-2-t mutattak ki a stimulált keratinociták lamelláris testeiben, a hám spinális rétegében, valamint az intercelluláris térben is, ami arra utal, hogy a bőr lipid "permeabilitási" gátja antimikrobiális anyagokat tartalmaz.

A hBD-3-at keratinocitákból klónozták, ami széles spektrumú antimikrobiális aktivitást mutat Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal szemben, beleértve a multirezisztens baktériumokat is. A keratinocitákban való expresszióját PAMP-ok és gyulladásos mediátorok, mint a TNF- α , IL-1 β , IFN- γ és a differenciálódás állapota indukálja (Harder és mtsai., 2001 és 2004).

A hBD-4-et a humán genom adatbázisok analízisével fedezték fel (Garcia és mtsai., 2001). A hBD-2 és hBD-3-hoz hasonlóan a hBD-4 termelése gyulladásos ingerek, PAMP-ok és differenciálódás hatására indukálható a keratinocitákban (Harder és mtsai., 2004). A szintetikus hBD-4 antimikrobiális aktivitást mutat mikromoláris koncentrációban a *P. aeruginosa* és *Staphylococcus carnosus* ellen, ami arra utal, hogy ez a peptid szerepet játszik a veleszületett epidermális védelmi rendszerben a bakteriális fertőzések ellen.

Az LL-37 (CAP18) katelicidin-származék peptid, az egyetlen humán antimikrobiális peptid, amelyet a katelicidin géncsaládban azonosítottak, neutrofilekben termelődik és gyulladásos bőrbetegségek során a keratinocitákban is indukálódik (Frohm és mtsai., 1997; Larrick és mtsai., 1995). *In vivo* az LL-37 védelmet nyújt az A-csoportú *Streptococcus* okozta nekrotikus bőrfertőzéssel szemben, ami arra utal, hogy az LL-37 a bőr védelmének egyik kulcskomponense (Nizet és mtsai., 2001). További előnye más antimikrobiális peptidekkel, például béta-defenzinekkel való szinergikus hatásból származik (Carretero és mtsai., 2004). A katelicidinek a bőr veleszületett immunitásának fontos elemét képviselik, mivel antimikrobiális aktivitást mutatnak nemcsak az A-csoportú *Streptococcus*okkal szemben, hanem a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok széles skálájával szemben is (Murakami és mtsai., 2002).



9. ábra. Az LL-37 és a humán β -defenzinek (hBD-k) gyulladásokeltő tulajdonságaiban szerepet játszó ismert mechanizmusok sematikus ábrázolása. Az AMP-k közvetlen proinflammatorikus hatást fejtenek ki a C-C kemokin receptor 6 (CCR6) vagy G-fehérje kapcsolt receptor (GPCR) receptorhoz való kötődés után számos jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül, amelyekben a p38 mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK); az extracelluláris jel szabályozott kinázok (ERK); a c-Jun N-terminális kinázok (JNK); a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B), interferon szabályozó faktor 3 és 7 valamint aktivátor fehérje 1 (AP1); foszfolipáz C (PLC)/fehérje kináz C (PKC) vesz részt, amelyek citokinek és kemokinek termeléséhez vezetnek. Az AMP-k végül modulálhatják a kórokozóval társított molekuláris mintákat (PAMP) vagy a gyulladásos választ (Chessa és mtsai., 2020).

Bár a hBD-1, -2, -3 és -4, valamint az LL-37 számos hámszövetben, köztük a bőrben is kifejeződik, a hámsejtekben, például a keratinocitákban kifejtett aktivitásuk nem jól ismert. Mivel a hBD-1, -2, -3 -4 és az LL-37-et a keratinociták termelik és részt vesznek olyan bőrbetegségekben, mint a pikkelysömör és a krónikus atópiás dermatitisz, valamint mivel az IL-18, amely számos sejt, köztük a keratinociták terméke, döntő szerepet játszik a fent említett

bőrbetegségekben, feltételezhető, hogy a hBD-k és az LL-37 aktiválhatják a humán keratinocitákat az IL-18 szekréción keresztül (Niyonsaba és mtsai., 2005). Tekintettel a MAPK kulcsszerepére a citokinek és/vagy kemokinek termelésében (9. ábra), Niyonsaba és munkatársai (2005) megvizsgálták a MAPK-gátlók hatását az IL-18 szekrécióra és feltárták a p38, ERK1/2 és JNK aktiválódását a hBD-1, -2, -3 -4 és az LL-37 által. Eredményeik arra utalnak, hogy az antimikrobiális és kemotaktikus hatásuk mellett a hBD-k és az LL-37 hámsejtekből származó antimikrobiális peptidek hozzájárulhatnak a veleszületett vagy adaptív immunitáshoz is a keratinociták aktiválásán és az IL-18 proinflammatorikus citokin szekrécióján keresztül.

IV. Célkitűzések

A bőr kandidás megbetegedéseit leggyakrabban a *C. albicans* okozza, azonban ez a faj csak ritkán izolálható egészséges humán bőrfelületekről. A *C. parapsilosis* az egészséges humán bőrfelületeken gyakran megtalálható kommenzalista és csak ritkán okoz kóros tüneteket. Kevés ismeretanyag áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a humán bőr keratinociták eltérő módon reagálnak-e patogén és kommenzalista jellegű gombás fertőzésekre.

Ezen információk fényében ebben a projektben célul tűztük ki, hogy humán bőr keratinocita sejtvonalakon (HaCaT, HPV-KER sejtvonal), *C. parapsilosis* valamint *C. albicans* fajokkal történő fertőzést követően vizsgáljuk a keratinocita sejtek és gombák között végbemenő interakciókat. Munkánk során a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Meghatározni, hogy a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fajok milyen mértékben károsítják a humán bőr keratinocitákat egyszerű fertőzés és felkészített fertőzés során.
2. Megvizsgálni a humán bőr keratinociták citokin és kemokin szekréciós profilját a *C. parapsilosis* és *C. albicans*sal történő egyszerű és felkészített fertőzést követően.
3. Felderíteni, hogy a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fajok képesek-e, és ha igen milyen mértékben asszociálnak (kapcsolódnak) a keratinocita sejtekhez egyszerű és felkészített fertőzés után.
4. Meghatározni, hogy a humán bőr keratinociták képesek-e internalizálni (fagocitálni) a *C. parapsilosis* és *C. albicans* gombafajokat egyszerű és felkészített fertőzés esetén.
5. Vizsgálni a keratinocita sejtek antimikrobiális peptid (AMP) termelésének képességét és felderíteni RNS szekvenálással a keratinocita-gomba interakció során bekövetkező génexpressziós és biológiai folyamatbeli változásokat.
6. Felderíteni a keratinocita sejtek metabolomjában történő változásokat egyszerű és felkészített *Candida* fertőzést követően.

V. Anyagok és módszerek

V.1. Táptalajok, tápoldatok, pufferek és egyéb reagensek

Kísérleteinkhez az alábbi tápoldatokat, táptalajokat, reagenseket és egyéb oldatokat használtuk fel:

- Alexa Fluor® 488 szukcinimidil észter: Invitrogen (katalógusszám: A20000) 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldata DMSO-ban.
- Dimetil-szulfoxid (DMSO): a Sigma-Aldrich D2650 katalógusszámú terméke.
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápoldat: a Lonza, BE12-604F katalógusszámú terméke.
- Kiegészített DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápoldat: gyári DMEM tápoldat (Lonza, katalógusszám: BE12-604F) kiegészítve 100 I.U./ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel (Lonza, katalógusszám: DE17-602E), 10% (hőinaktivált) FBS-sel (Euroclone, katalógusszám: ECS0180L) és 2 mM L-glutaminnal (Sigma-Aldrich, katalógusszám: G7513).
- Kiegészített K-SFM (keratinocyte-serum free medium) tápoldat: a Gibco (Life Technologies) 10724-011 katalógusszámú terméke kiegészítve 0,5 µg/100 ml epidermális növekedési faktorról (epidermal growth factor, Gibco, katalógusszám: 10450-013) és 5 mg/100 ml marha agyalapi mirigy kivonattal (bovine pituitary extract, Gibco, katalógusszám: 13028-014), 100 I.U./ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel (Lonza, katalógusszám: DE17-602E).
- Foszfát pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline, PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ vízben feloldva (pH 7,4).
- Borjú magzat szérum (fetal bovine serum, FBS): a Euroclone terméke (katalógusszám: ECS0180L). 56 °C-on 30 percig hőinaktiválva.
- FBS-PBS: PBS kiegészítve 10 V/V% FBS-el.
- Triton X-PBS: 0,3 V/V% Triton X-100 PBS-ben.
- Hank-féle pufferelt sóoldat (Hanks' balanced salt solution, HBSS) puffer: a Lonza terméke (katalógusszám: BE10-527F).
- YPD (yeast extract-peptone-dextrose) tápoldat/táptalaj: 0,5 m/V% élesztőkivonat, 1 m/V% pepton, 1 m/V% glükóz tartalmú tápoldat 100 I.U./ml penicillinnel és 100 µg/ml

sztreptomomicinnel (Lonza, katalógusszám: DE17-602E) kiegészítve. Táptalaj esetén 2 m/V% agarral kiegészítve.

- TrypLE™ Express Enzyme oldat: a Gibco (Life Technologies) 12604-013 katalógusszámú terméke.
- pHrodo™ Red festék: Invitrogen (katalógusszám: P3660) 1 mM-os koncentrációjú törzsoldata DMSO-ban.
- Krioprotektív médium: a Lonza cég 12-132A katalógusszámú terméke.
- Na₂CO₃ oldat: 1 M Na₂CO₃ vízben oldva, pH 10.
- Tripán kék oldat: 0,4 m/V% tripánkék festék PBS pufferben.
- HPLC-SG víz: a Merck cég 34877-M katalógusszámú terméke.
- MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide): a Merck cég 24589-78-4 katalógusszámú terméke.

V.2. *Candida* törzsek

Kísérleteinkben az SC5314 és a WO-1 jelölésű klinikai *C. albicans* izolátumokat használtuk steril körülmények között (2. táblázat). Genomjuk ismert (<http://www.candidagenome.org/Strains.shtml#albicans>). A *C. parapsilosis* esetében a GA1 és CLIB214 klinikai izolátumokat vontuk be a vizsgálatainkba. Genomszekvenciájuk szintén ismert (<http://www.candidagenome.org/Strains.shtml#parapsilosis>).

2. táblázat. A kutatásban felhasznált *Candida* törzsek.

Törzs	SZMC kód	Genotípus	Származási hely	Eredet	Hivatkozás
SC5314 <i>C. albicans</i>	SZMC 1523	vad típus	New York város, USA	Szisztémás kandidiázisban szenvedő páciens	Gillum és mtsai., 1984
GFP-SC5314 <i>C. albicans</i>	SZMC 28771	RPS1/RPS1::CI p10-pTDH3-GFP::SAT1	Létrehozás helye: Szeged, Magyarország	<i>C. albicans</i> SC5314 vad típusú törzs	Jelen PhD munka, Németh Tibor által
WO-1 <i>C. albicans</i>	SZMC 28773	vad típus	Iowa város, USA	Humán vér és tüdő	Slutsky és mtsai., 1987
GA1 <i>C. parapsilosis</i>	SZMC 8110	vad típus	Hamburg, Németország	Humán vér	Gácsér és mtsai., 2005
CLIB214 <i>C. parapsilosis</i>	SZMC 1560	vad típus	Puerto Rico	Humán széklet	Laffey és Butler, 2005
GFP-CLIB214 <i>C. parapsilosis</i>	SZMC 28772	CpNEUT5L/CpNEUT5L::pEX PR-PCaTDH3-GFP::SAT1	Létrehozás helye: Szeged, Magyarország	<i>C. parapsilosis</i> CLIB214 vad típusú törzs	Jelen PhD munka, Németh Tibor által

SZMC: Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjtemény (<http://szmc.hu/welcome/>).

Továbbá felhasználtuk a *C. albicans* SC5314 törzs vad típusának (SZMC 1523) nourseothricin (NTC) rezisztens változatát, melynek létrehozását Németh Tibor Mihály kollégám végezte el.

A *Candida* törzseket YPD táptalajon tartottuk fenn 4 °C-on és havonta frissítettük őket.

V.3. Alkalmazott keratinocita sejtvonalak

Kísérleteink során az MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport által rendelkezésünkre bocsátott HPV-KER és HaCaT humán keratinocita sejtvonalat használtuk.

A spontán immortalizálódott HaCaT sejtvonal 1988 óta széles körben alkalmazott keratinocita modell, amely több szempontból a primer keratinocitákhoz közeli fenotípust mutat (Boukamp és mtsai., 1988; Deyrieux és Wilson 2007). Azonban Lewis és mtsai. (2006) a primer sejtekhez képest konstitutív NF- κ B aktivációt mutatott ki ezen sejtvonalban.

A HPV-KER sejtvonalat Szegeden hozták létre a HPV (Humán Papillóma Vírus) E6/16 onkogénjével történő immortalizálás révén (Tax és mtsai., 2016), főleg hazai kutatók alkalmazták gyulladás és akné folyamatainak tanulmányozása kapcsán.

A sejteket hosszú távon krioprotektív médiumban tároltuk, folyékony nitrogénbe helyezett fiolákban. A HPV-KER sejteket kiegészített K-SFM médiumban, a HaCaT keratinocitákat kiegészített DMEM médiumban tartottuk fenn 75 ml-es sejtenyésző flaskákban 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában. A sejtekről kétnaponta eltávolítottuk a médiumot és 12 ml frisset mértünk rájuk. Amennyiben a keratinociták konfluens réteggé nőttek, a következő módon passzáltuk őket: eltávolítottuk róluk a médiumot, majd 5 ml PBS-sel mostuk őket, és 2 ml TrypLE™ Express Enzyme oldatot mértünk rájuk. Öt-tíz perc inkubáció után a kapcsolódó sejtek leváltak a flaskák aljáról. A sejteket további 4 ml FBS-PBS oldatban szuszpendáltuk (inaktiválva a TrypLE™ Express Enzyme oldatot), majd ebből 1 ml-t centrifugálással üleptettünk (200 G, 10 perc, 1-es gyorsulási és lassulási fokozat, Heraeus Multifuge 3 S-R centrifuga). A felülúszó eltávolítása után a sejteknek megfelelő friss tápoldatban (12 ml) szuszpendáltuk fel őket, majd a szuszpenziót új 75 ml-es flaskákba mértük.

A fertőzőes kísérletek előtt két nappal a keratinocitákat az előző bekezdésben leírtak szerint szuszpenzióba vittük, centrifugáltuk, majd 2 ml megfelelő tápoldatban szuszpendáltuk őket. Ezen szuszpenzió 50 μ l-jét 50 μ l tripán kék oldathoz kevertük, majd Bürker-kamra segítségével meghatároztuk az élő sejtek koncentrációját (a kéken festődő elpusztult sejteket, kizártuk a számolásból). Ezt követően a keratinocitákat $1,5 \times 10^5$ sejttszámmal mértük be a 24 mintahelyű sejtenyésző edények egy-egy tenyésztőlyukába 500 μ l végtérfogatban. A sejteken a következő napon tápoldatot cseréltünk. Másnap a konfluens sejtek készen álltak a fertőzőes kísérletekre.

V.4. A sejtek fertőzésének folyamata

A kísérletek előtt 2 nappal 2 ml YPD tápoldatba oltottuk a *Candida* törzseket, majd 30 °C-on rázattuk őket. Az így nyert szuszpenzióból a következő napon 200 µl-t újabb 2 ml YPD tápoldatba mértünk. A kísérletek napján a gombaszuszpenziókat centrifugáltuk (3000 RPM, 9-es gyorsulási és lassulási fokozat, 5 perc, Heraeus Multifuge 3 S-R centrifuga), majd a felülúszó eltávolítása után PBS-ben szuszpendáltuk az élesztősejteket. Ezt a mosási lépést még kétszer megismételtük. Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a szuszpenziók sejtkoncentrációját, majd azt a keratinocita sejtvonalnak megfelelő tápoldattal állítottuk a kívánt értékre. Ezt az értéket minden kísérletben az ún. MOI (multiplicity of infection, fertőzési arány) határozta meg, mely azt adja meg, hogy a fertőzés során hány élesztősejt jut egy keratinocitára. (Például MOI=5:1 esetén 5 gombasejt jut egy keratinocitára.) Végül 500 µl végtérfogatban 24 mintahelyű sejttenyésztő edényekben megfertőztük a hámsejtkultúrákat. Minden alkalommal fertőzetlen kontrollt is alkalmaztunk, amely esetben a hámsejteken csak tápoldatot cseréltünk.

A felkészített immunválaszra irányuló vizsgálataink során a keratinocita sejteket a megfelelő fertőzési dózisban megfertőztük a *C. parapsilosis* törzsek egyikével. 24 óra inkubációt követően a gombasejteket 1x-es hígítású PBS oldattal háromszor mostuk. A mosások között plate feltéttel rendelkező rázaton alacsony rázatási fokozaton mozgattuk át a felülúszót a hatékony lemosás érdekében. Ezt követően *C. albicans* adott törzsével megfelelő fertőzési dózisban fertőztük meg az immár *C. parapsilosis* adott törzsével előinkubált sejteket. Ezután a kísérletnek megfelelő inkubációs időt követően vizsgáltuk a sejteket a kérdéses vizsgálatra a felkészített immunválasz elemzésére (pl. károsodás, fagocitáló képesség, stb.). Az alkalmazott térfogat (µl) a használt plate egy mintahelyére vonatkozó átmérő függvényében került meghatározásra (pl. 24 mintahelyű plate esetén 500 µl volt a mosásnál és a fertőzésnél használt PBS/tápoldat).

V.5. A sejtkárosodás vizsgálata laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás méréssel

Az *Candida*val történő fertőzést követően elhalt keratinocitákból felszabaduló laktát-dehidrogenáz enzim relatív mennyiségét az LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche, katalógusszám: 11644793001) felhasználásával határoztuk meg a keratinocita-*Candida* kokultúrák sejtmentesre centrifugált (3000 RPM, 5 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga) felülúszóiból. A tízszeresen hígított felülúszókat 96 lyukú lemezek mintahelyeibe osztottuk szét (90 µl PBS + 10 µl felülúszó), és a gyártó utasításainak megfelelően 100 µl reakcióelegyet

adtunk a mintákhoz. Negatív kontrollként megfelelő steril tápoldatot, pozitív kontrollként (ez 100% LDH felszabadulást jelent) 1% Triton X-100-zal lizált sejtek felülúszóját használtuk. A lemezeket szobahőmérsékleten, fénytől védve 20 percig inkubáltuk, majd a SPECTROstar Nano Microplate Reader készülékkel (BMG Labtech) mértük a minták 492 nm hullámhosszon mutatott abszorbanciáját (optikai denzitását, OD-jét).

Az LDH aktivitás relatív mértékét x mintában ezen képlet segítségével adtuk meg százalékos értékben:

$$(OD_x - OD_{\text{negatív kontroll}}) / (OD_{\text{pozitív kontroll}} - OD_{\text{negatív kontroll}}) \times 100.$$

V.6. Gomba RNS izolálás

Az inkubációs idő letelte után a gombasejtek RNS kivonása RNeasy® Plus Mini Kit által (Qiagen, katalógusszám: 74134 és 74136) történt. A sejteket sejtkaparóval felkapartuk és 15 ml-es Falcon-csőbe pipettáztuk át, centrifugálást követően (5.000 RPM, 5 perc) a felülúszót leszívtuk és 500 µl RNáz-mentes desztillált vízben szuszpendáltuk fel. 29G tűvel 5 alkalommal átsuszpendáltuk a mintákat, majd centrifugáltuk (12.000 RPM, 3 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga). A felülúszó leszívását követően a pelletet folyékony nitrogén és melegvíz felváltva alkalmazott, 3 alkalommal történő belemerítése után 650 µl RLT plusz (+1 % Béta-merkaptó-etanol) pufferben vettük fel, átmértük üveggyöngyre és maximális fokozaton vortexeltük 10 percen át. Az üveggyöngyök leülepedését követően 370 µl felülúszót átpipettáztunk üres mikrocentrifuga csőbe. Centrifugálást követően (13.000 RPM, 2 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga) a felülúszót gDNS elimináló oszlopra transzferáltuk és centrifugálás után (13.000 RPM, 15 másodperc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga) a felülúszót 350 µl 70%-os etanolba mértük majd 2-3 alkalommal szuszpendáltuk és RNeasy Spin oszlopra vittük át a teljes mennyiséget. Centrifugálásokkal (13.000 RPM, 15 másodperc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga) 350 µl RW1 puffer mosás és két alkalommal 500 µl RPE puffer mosást követően a megkötött RNS mennyiségét 40 µl RNáz-mentes desztillált vízzel eluáltuk 3 percen át és centrifugáltuk (13.000 RPM, 15 másodperc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga). Az eluált RNS mennyiségére és minőségére vonatkozó adatokat a teljes mennyiség 1 µl-ét felhasználva Nanodrop (Bioanalyzer) spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A mintákat további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

V.7. Citokintermelés mérése enzimkött immunoszorbens (ELISA) módszerrel

Candida fajokkal történő fertőzést követően 24 órával Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük a sejt kultúrák felülúszóit, majd ezeket centrifugáltuk (3000 RPM, 5 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga). Az így nyert felülúszókat -80 °C-on tároltuk klasszikus ELISA módszerrel történő mérésükig. A mérés során targetált citokinek illetve kemokinek a TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL5, IL-36g, IL-12 p40, IL-12 p70 és IL-17a voltak. Az említett citokinek/kemokinek szekréciójának mértékét klasszikus szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg. Ehhez az alábbi ELISA kitéket alkalmaztuk a gyártók utasításait követve: Human IL-10 Uncoated ELISA (Invitrogen, katalógusszám: 88-7106), DuoSet ELISA Human IL-8 (R&D Systems, katalógusszám: DY208-05), DuoSet ELISA Human IL-6 (R&D Systems, katalógusszám: DY206-05), DuoSet ELISA Human IL-12/IL-23 p40 (R&D systems, katalógusszám: DY1240-05), DuoSet ELISA Human IL-36g/IL-1F9 (R&D systems, katalógusszám: DY2320-05), DuoSet ELISA Human TNF α (R&D Systems, katalógusszám: DY210-05), DuoSet ELISA Human IL-1 β (R&D Systems, katalógusszám: DY201-05) és DuoSet ELISA Human CCL5 (R&D Systems, katalógusszám: DY278-05). A módszert NUNC MaxiSorp 96 lyukú ELISA lemezekben kivitelezttük, és a 450 nm-en mutatott abszorbanciát SPECTROstar Nano Microplate Reader készülékkel (BMG Labtech) határoztuk meg. A nyers adatok elemzését a MARS Data Analysis szoftverrel végeztük. Négy analit mérésére (IL-6, IL-8, IL-12 p70 és IL-17a) Luminex vizsgálat segítségével is sor került kollaboráns partnerünknel.

V.8. Keratinocita sejtek és *Candida* gombák közötti adhézió

Ebben a kísérletben a szakirodalomnak megfelelően (Sheth és mtsai., 2011) az adhézió fogalom azt jelenti, hogy a gombasejt a keratinocita sejtek felszínéhez tapad (adhézió=sejtfelszínhez tapadás). Ehhez a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214, valamint a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzseket az ismert módon folyékony YPD tápoldatban felszaporítottuk, PBS-el mostuk, végül Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a sejtkoncentrációt. Ezt követően MOI=1:1 arányban megfertőztük a keratinocitákat 24 lyukú sejtenyésző edényben, illetve fertőzetlen kontrollt is használtunk, mely esetben a hámsejteken csak tápoldatot cseréltünk. 1 óra ko-inkubációt követően a kultúrákról eltávolítottuk a felülúszókat (500 μ l), és kétszer mostuk a sejteket PBS-sel (300 μ l + 200 μ l mennyiségben). A keratinocitákat mintahelyenként 300 μ l 1%-os TritonX-100 oldattal kezeltük 10 percig, majd felkaparásukat követően 500 μ l FBS-PBS és 200 μ l PBS hozzáadása után felmostuk őket és 1,5

ml-es Eppendorf-csövekbe mértük át. Ezeket 5 alkalommal 29G méretű tűvel átszuszpendáltuk az asszociátumok szétesése, valamint a megmaradt intakt sejtek dezintegrálása érdekében. Az így nyert szuszpenziót a megfelelő mértékben hígítottuk és YPD csészékre szélesztettük CFU meghatározásra. 2 napon át történő 30 °C-os inkubációt követően CFU számolással határoztuk meg az adhézió mértékét a felülúszókat tartalmazó, valamint a felkapart sejtek szuszpenzióját felhasználva. A következő képletet alkalmaztuk az adhézió hatékonyságának kiszámítására:

Adherált gombasejtekből származó CFU / Adherált és nem adherált gombasejtekből származó CFU * 100 (%).

V.9. A *Candida* sejtek fagocitózisa a keratinociták által

A fagocitózis egyértelmű megállapításához a keratinocitákat pHrodo™ Red fluoreszcens festékkel megjelölt *Candidákkal* fertőztük. Ez a festék megfelelő fényintenzitási beállítás mellett a sejteken kívüli kémhatáson (ez a detektálás során alkalmazott PBS pufferben pH=7,4) nem fluoreszkál, azonban a sejten belüli savas kémhatású fagolizoszómába kerülve igen (lásd: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P36600>). Az élesztőket a korábbiakban leírtaknak megfelelően YPD tápoldatban felszaporítottuk, kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd 500 µl HBSS-ben szuszpendáltuk. Ezen szuszpenzió 200 µl-éhez Eppendorf csőben 22 µl NaCO₃ oldatot (1 M), majd 10 µl pHrodo™ Red (1 mM) törzsoldatot kevertünk, melyet alapos rázatás és egy óras szobahőmérsékleten történő inkubáció követett fénytől elzárva. Ezen folyamatot 1 ml PBS-sel történő mosási lépés követte három alkalommal (3000 RPM, 5 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga). Végül a gombasejteket 200 µl PBS-ben szuszpendáltuk fel és Bürker-kamra segítségével határoztuk meg a sejtkoncentrációt. Ezt követően MOI=5:1 arányban fertőztük a keratinocitákat. A fertőzési időtartam *C. parapsilosis* esetén 3 óra, *C. albicans* esetén 1 óra volt. A koinkubációs idő lejárta után a felülúszókat eltávolítottuk és a sejteket két alkalommal mostuk PBS-sel 500 µl mennyiségben. A sejteket 300 µl TrypLE™ Express Enzyme oldattal kezeltük a sejtek felmosása céljából 10 percen át majd 400 µl FBS-PBS segítségével hatástalanítottuk. Az így nyert szuszpenziót 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe mértük át és centrifugáltuk őket (1000 RPM, 10 perc, Heraeus Pico 17 mikrocentrifuga). Az így nyert felülúszók leszívását követően 100 µl PBS-ben történő szuszpendálást követően a sejtek készen álltak a mérésre. A FlowSight® Imaging Flow Cytometer képalkotó áramlási citométerrel mikroszkópos fényképeket készítettünk fehér fény és 488 nm hullámhosszú lézer megvilágítása mellett. A készülék negyedik csatornáján (Ch04)

detektáltuk a festett élesztősejtekből származó emissziót. A képeket az IDEAS® 6.2 szoftverrel jelenítettük meg. Ennek során a fertőzetlen kontroll sejtek harmadik csatornán észlelt autofluoreszcenciájának tartományát tekintettük negatívnak, míg az ettől magasabb értékeket mutató hámsejteket vettük fagocitózis-pozitív sejteknek. A képalkotó áramlási citométer minden egyes sejtről világos látóteres és fluoreszcens mikroszkópos képeket is készít, melyeken látni, hogy a fagocitózis-pozitív keratinociták valóban fagocitálták-e a pHrodo™ Red festődést mutató gombasejteket.

V.10. Bőrhámsejtek metabolomikai elemzése

A keratinocitákról a *Candida* törzsekkel (*C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek esetén MOI=1:1, *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzseknél MOI=1:200 fertőzési dózisban) történő fertőzés után 24 órával a tápoldatot eltávolítottuk. A sejteket egyszer mostuk 1 ml, 37 °C-ra előmelegített, 0,9% NaCl-ot tartalmazó fiziológiás sóoldattal. Ezután a sejteket kétszer mostuk 1 ml 37 °C-ra előmelegített HPLC-SGG vízzel és 500 µl -20 °C-ra előhűtött HPLC-SGG vízzel, majd jégen tároltuk. 15 perces jégen történő inkubálás után a felülúszót leszívtuk és 10 percig centrifugáltuk 12.000 fordulat/perc fordulatszámra 4 °C-on. Végül ezen felülúszót speciális GC-MS-kompatibilis üvegekben tároltuk -80 °C-on. Az üvegek 100 µl standardot (Ribitol 50 µg/ml) is tartalmaztak.

A minták derivatizációjára 50 µl térfogatot használtunk. Az elegyeket 50 µl oxim oldattal inkubáltuk 90 percig 30 °C-on, majd 50 µl MSTFA-t adtunk hozzá és az inkubációt 30 percig 40 °C-on folytattuk. A kontroll keverékekhez 5 µl-t pipettáztunk üvegfiolákba és nitrogéngázzal szárazra evaporáltuk, majd a mintákhoz hasonló módon derivatizáltuk.

A GC-MS-QP2010 paraméterei:

- GC paraméterek:
 - Injektálás: splitless
 - Mintavételi idő: 1 perc
 - Injektor hőmérséklete: 280 °C
 - Fűtési program: 100 °C (4 perc) → 4 °C/perc → 320 °C (8 perc)
 - Vivőgáz: hélium
 - Vivőgáz-szabályozás: állandó lineáris sebesség (39,0 cm/s)
 - Szeptumöblítés: 5 ml/perc

- MS paraméterek:
 - Határfelületi hőmérséklet: 280 °C
 - Ionforrás hőmérséklete: 200 °C
 - Ionizációs feszültség: 70 eV
 - Mérési mód: SCAN
 - Tömegtartomány: 45-600 m/z
 - Időintervallum: 0,3 s
 - EI detektorfeszültség: automatikus beállítás -0,1 kV (relatív érték)
- Kapilláris oszlop: DB-5 (hossza: 30 m, belső átmérő: 0,25 mm, filmvastagság: 1,00 µm)

Az elemzést követően a GC-MS Browser az egyes metabolitok csúcsainak kézi beállítását és korrekcióját biztosította. A GC-MS Real Time Analysis szoftverben beállíthatók az injektálás paraméterei és kiírható az adatfájl. A GC-MS Postrun Analysis szoftver az injektálás utáni eredmények ellenőrzésére szolgál. A kapott értékeket a metabolitok nevével és a kezelés nevével együtt .csv fájlként mentettük el a Microsoft Excelben a MetaboAnalyst felületén történő statisztikai elemzéshez.

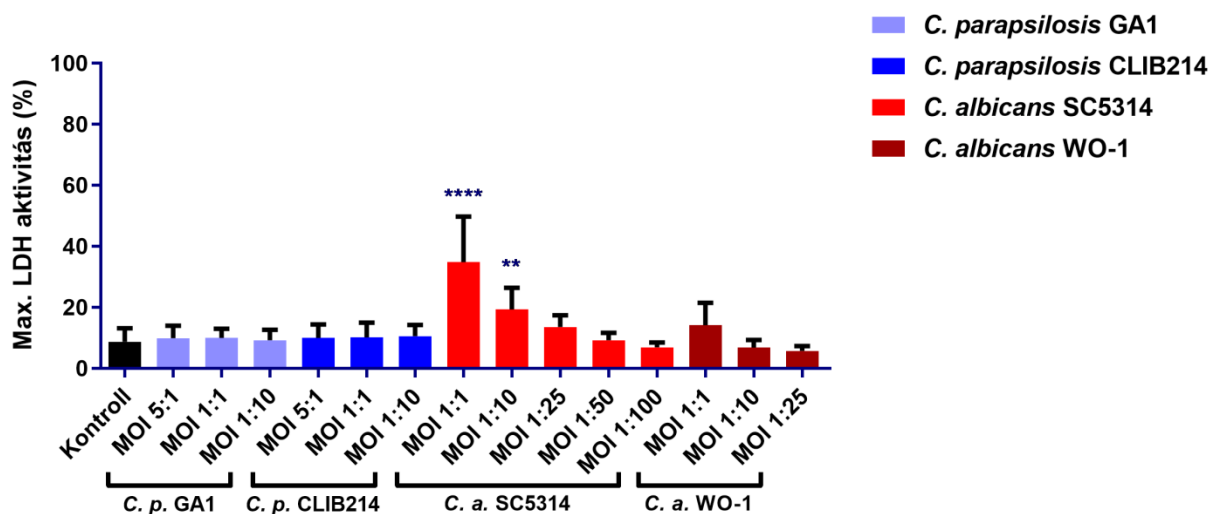
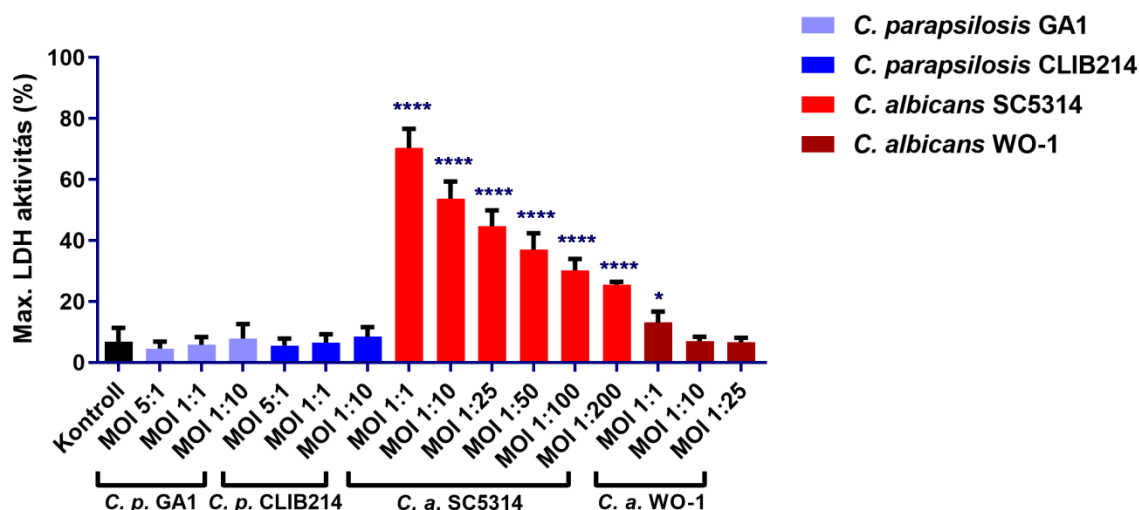
V.11. Diagramok szerkesztése és statisztikai kiértékelés

A diagramokat a GraphPad Prism 9 szoftverrel szerkesztettük. Ugyanezzel a programmal végeztük el a statisztikai elemzéseket. A statisztikai értékelések során párosítatlan t-próbát alkalmaztunk. A statisztikai adatok és tesztek megtalálhatóak az ábra aláírásokban.

VI. Eredmények és értékelésük

VI.1. Keratinociták károsodásának mértéke *Candida* fertőzést követően

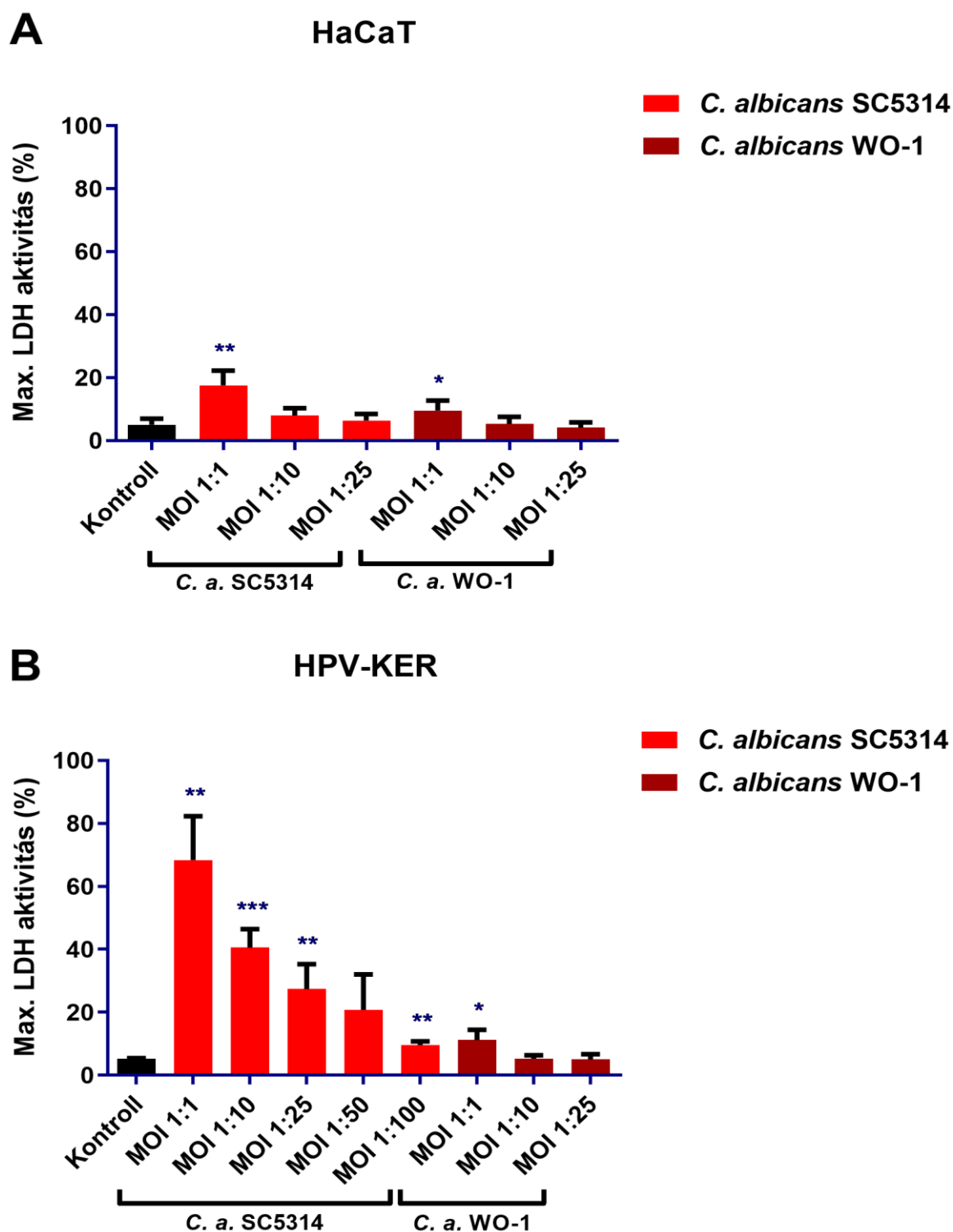
A *C. albicans* ritkán fordul elő az emberi bőrön, de komoly veszélyt jelenthet, különösen az immunszuppresszált egyének számára, valamint a kandidás bőrbetegségek jelentős hányadáért is felelős (Dismukes és mtsai., 2003). Ezzel szemben a *C. parapsilosis* a normál humán bőrflóra gyakori kommenzalistájaként található meg a bőrfelületeken (Trofa és mtsai., 2008; Byrd és mtsai., 2018) és kisebb mértékben felelős súlyosabb bőrbetegségek kialakításáért. A vizsgálat során összehasonlítottuk, hogy ezen két gombafaj milyen mértékben okoz károsodást humán keratinocita sejtvonalakon. Ennélfogva *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214, illetve *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsekkel fertőztünk humán HaCaT és HPV-KER keratinocitákat és a kokultúrák felülúszójából a károsodás hatására felszabaduló laktát-dehidrogenáz enzim aktivitását mértük le. A *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek esetén a 24 órás fertőzés hatására bekövetkező károsodás mértéke a kontroll, fertőzetlen sejtek esetén mért károsodás mértékével volt összemérhető mindkét alkalmazott sejtvonal esetében (10. ábra). A *C. parapsilosis* törzsek nem képesek valódi hifa képzésére, illetve kandidalizin termelés sem figyelhető meg esetükben, ami korrelál a kapott alacsony mértékű károsodás adataival. Ezzel szemben a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek esetében a sejtek károsodásának mértéke szignifikáns mértékben magasabb volt, legfőképp a magasabb MOI értékű fertőzési dózisok esetében, és kimondottan a HPV-KER sejtvonalnál.

A**HaCaT****B****HPV-KER**

10. ábra. *C. albicans* és *C. parapsilosis* által okozott sejtkárosodás (A) HaCaT és (B) HPV-KER keratinocitákban. A sejtkárosodás mértékét 24 órával a bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után a felülszoban mért LDH aktivitás alapján határoztuk meg. Az LDH aktivitást a pozitív kontrollhoz (100%-os sejtlízis) viszonyított LDH aktivitás %-ában (átlag $\pm$ standard hiba) ábrázoltuk. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek (világoskék és sötétkek), *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (párosítatlan t-próba), összehasonlítva a nem fertőzött kontroll sejtekkel, $n=6$.

Ezen eredményekből körvonalazódik, hogy a *C. albicans* WO-1 törzs bár valódi hifaképzésre képes, a kandidalizin termelő képessége nem szignifikáns a virulensebbnek mutató *C. albicans* SC5314-es törzshöz viszonyítva. A HPV-KER sejtek szignifikánsan érzékenyebbek a *C. albicans* SC5314 törzzsel szembeni fertőzésre. Mindkét sejtvonalnál jól megfigyelhető a *C. albicans* SC5314 törzzsel való fertőzésre a dózisfüggő módon történő sejthalál mértéke.

Megvizsgáltuk, hogy HaCaT és HPV-KER sejtek esetén hogyan változik a *C. albicans* törzsek sejtkárosító hatása 12 órával a fertőzést követően. A HaCaT sejtek esetén alacsonyabb mértékű károsodás volt megfigyelhető, de a dózisfüggés továbbra is fenn állt. A HPV-KER sejtek esetében szintén megfigyelhető a dózisfüggő károsodás, azonban a sejthalál mértéke csökkent a 24 órás fertőzésnél mért értékekhez képest (11. ábra).

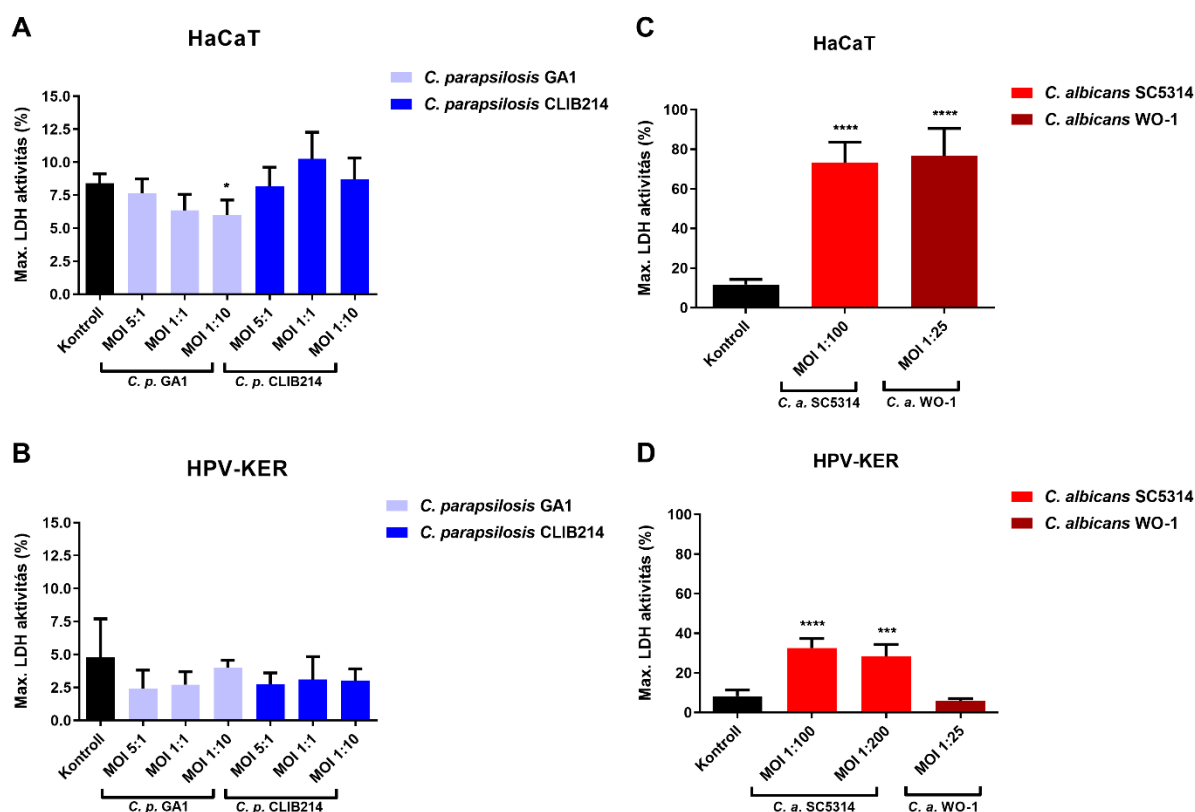


11. ábra. *C. albicans* által okozott sejtkárosodás (A) HaCaT és (B) HPV-KER keratinocitákban. A sejtkárosodás mértékét 12 órával a bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után a felülszóban mért LDH aktivitás alapján határoztuk meg. Az LDH aktivitást %-ban ábrázoltuk (átlag $\pm$ standard hiba) a pozitív kontrollhoz (100%-os sejtlyízis) képest. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 és

WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (párosítatlan t-próba), összehasonlítva a nem fertőzött kontroll sejtekkel, $n=3$.

Ezen túlmenően megmértük, hogy a *C. parapsilosis* törzsek által kiváltott károsodás változást mutat-e 48 órával a fertőzést követően. Sem a HaCaT, sem a HPV-KER sejtek esetén nem detektáltunk szignifikáns eltérést a kontroll csoportokban mért LDH felszabaduláshoz képest (12. ábra).

A következő lépésben a *C. albicans* törzsek által kiváltott károsító hatás mértékét vizsgáltuk 48 órával a fertőzést követően alacsony MOI értékű fertőzések esetén. HaCaT sejtvonalnál az okozott károsodás mértéke szignifikánsan megnőtt a korábbi mérési adatokhoz képest. Ezzel szemben a korábban érzékenyebbnek bizonyult HPV-KER sejtek esetében az LDH felszabadulás mértéke nem változott a korábbiakhoz képest (12. ábra).



12. ábra. A *C. parapsilosis* által okozott sejtkárosodás (A) HaCaT és (B) HPV-KER, valamint a *C. albicans* által okozott LDH felszabadulás (C) HaCaT és (D) HPV-KER keratinocitákban. A sejtkárosodás mértékét 48 órával a bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után a felülúszóban mért LDH aktivitás alapján határoztuk meg. Az LDH aktivitást %-ban ábrázoltuk (átlag $\pm$ standard

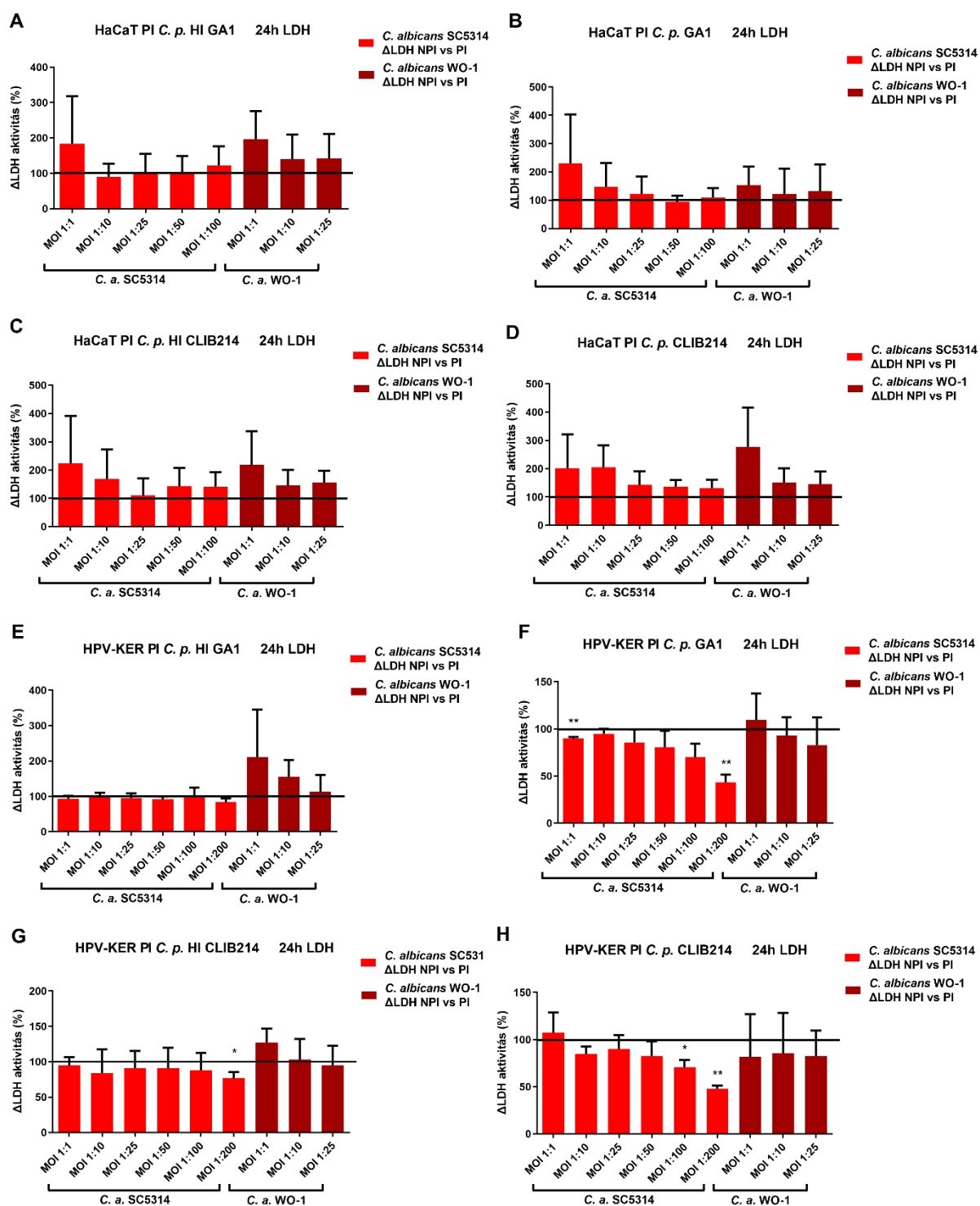
hiba) a pozitív kontrollhoz (100%-os sejtlízis) képest. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek (világoskék és sötétkék), *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (párosítatlan t-próba), összehasonlítva a nem fertőzött kontroll sejtekkel, $n=3$.

Eredményeinkből az a következtetés vonható le, hogy a *C. albicans* szignifikánsan virulensebb fajnak mutatkozik a keratinocitákkal szemben, mint a *C. parapsilosis*. Ez jól korrelál azzal a megfigyeléssel, hogy a *C. albicans* okozza a kután kandidiázisok többségét, míg a *C. parapsilosis* ritkábban okoz bőrbetegséget (Odds, 1994; Dismukes és mtsai., 2003; Trofa és mtsai., 2008). A különbség egyik oka, hogy a *C. parapsilosis* nem képes sem valódi hifák képzésére, sem pedig a kandidalizin pórusképző toxin szintézisére, míg a *C. albicans* igen, ami fontos szerepet játszik a nyálkahártyák károsításában (Moyes és mtsai., 2016). Bár mind a *C. albicans* SC5314, mind a WO-1 törzs genomjában megtalálható a kandidalizint kódoló gén (*ECE1* gén) (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/homologPage.pl?dbid=CAL0000199701&seq_source=C.%20albicans%20SC5314%20Assembly%2022), kísérleteinkben az utóbbi törzs kisebb mértékben károsította a keratinocitákat. Ez összefügghet azzal, hogy tapasztalataink alapján az alkalmazott kísérleti körülmények között a *C. albicans* WO-1 törzs hifaképzése kisebb mértékűnek tűnt az SC5314 törzshöz képest. Kután kandidiázisból vett szövetmintákban is kimutathatók a *C. albicans* hifái (Scherwitz, 1982). A *C. albicans* WO-1 törzs továbbá orális epitélium sejtek fertőzésekor is szignifikánsan kisebb mértékben volt virulens, mint az SC5314 törzs (Solis, 2018). Bár az itt bemutatott vizsgálatokban a *C. parapsilosis* törzsek nem okoztak mérhető károsodást a keratinocitákban, Gácser és mtsai. (2007) kimutatták, hogy 48 órás koinkubáció esetén ez a faj képes volt szöveti károsodást okozni rekonstituált humán epidermisz kultúrában. Kísérleteinkben a 48 órás fertőzés hatására a HaCaT sejtvonal szignifikánsan érzékenyebbnek, míg a HPV-KER sejtvonal védettebbnek mutatkozott a fertőzéssel szemben.

VI.2. Keratinociták károsodási vizsgálata felkészített immunitás szempontjából

A felkészített immunitás vizsgálatának keretein belül az élő modellhez hasonló körülmények között vizsgáltuk a keratinociták károsodását *Candida* fertőzést követően. Ezen kísérletekben a bőr kommenzalistájaként ismert *C. parapsilosis* törzsekkel fertőztük a sejteket

majd a megfelelő inkubációs időt követően (24 óra) a gomba lemosása után azonnal fertőztük a keratinocitákat *C. albicans* törzsekkel. Korábbi nem felkészített immunitási vizsgálataink kimutatták, hogy a keratinociták *C. albicans* fertőzést követően nagyobb halálozást szenvednek el, mint *C. parapsilosis* fertőzés után. A felkészített immunitású kísérlet keretében élő és hőinaktivált *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsekkel való előinkubációs fertőzést követően *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsekkel fertőztük a bőrhámsejteket. Eredményeinket a nem felkészített immunitású fertőzés esetén mért LDH felszabadulás százalékának függvényében tüntettük fel úgy, hogy ezen értéket tekintettük 100%-nak és ezen értékhez képest a változást jelöljük az oszlopdiagrammon (13. ábra). Az előinkubáció esetében a *C. parapsilosis* törzseknél MOI=1:1 fertőzési arányt használtunk fel, tehát 1 keratinocita sejtre 1 gombasejt jutott. Majd különböző fertőzési dózisban fertőztük a keratinocita sejteket *C. albicans* törzsekkel. HaCaT sejtvonal esetén sem élő sem hőinaktivált *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzés esetén és egyik *C. albicans* fertőzési dózison sem mutatkozott szignifikáns eltérés a nem előinkubált fertőzésen mért LDH felszabaduláshoz képest. HPV-KER sejtvonalon a hőinaktivált *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 előinkubációs fertőzésen kívül az összes előinkubációs fertőzés esetén látható volt szignifikáns eltérés (13. ábra).

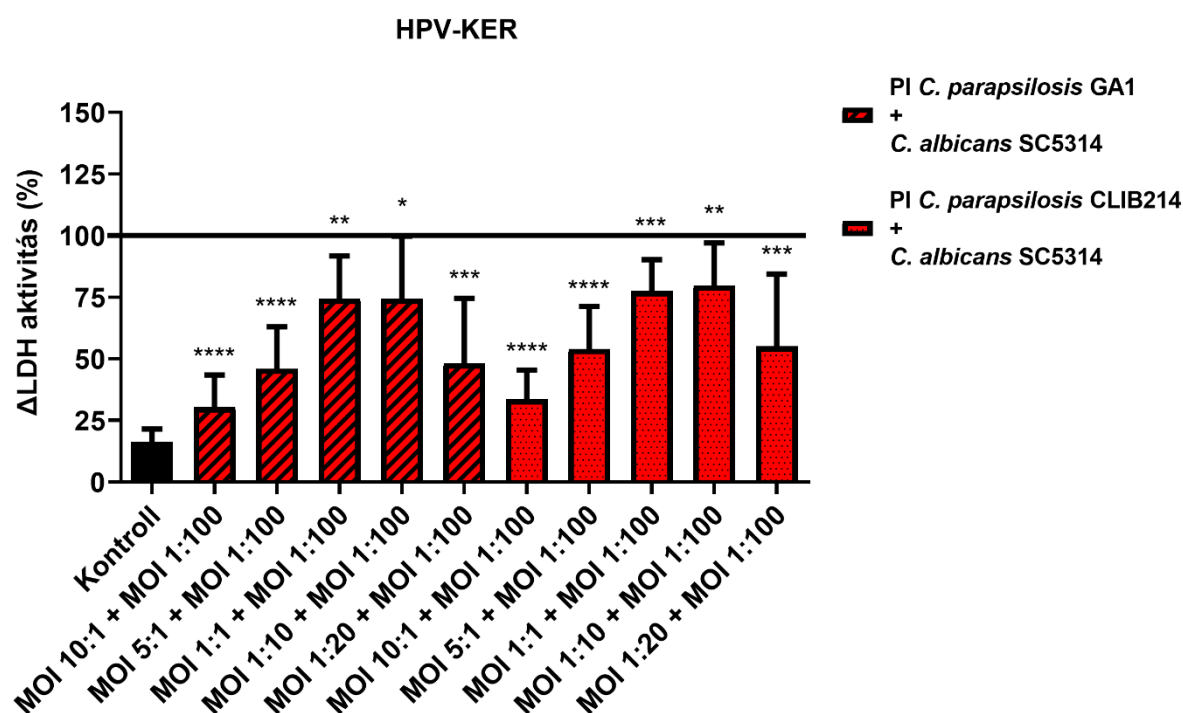


13. ábra. *C. albicans* által okozott sejtkárosodás HaCaT (A,B,C,D) és HPV-KER (E,F,G,H) keratinocitákban 24 órás pre-inkubációs (PI) fertőzést követően HI GA1 (A és E), élő GA1 (B és F), HI CLIB214 (C és G) és élő CLIB214 (D és H) *C. parapsilosis* törzsekkel. A sejtkárosodás mértékét 24 órával a bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után a felülúszóban mért LDH aktivitás alapján határoztuk meg. Az LDH aktivitást a pozitív kontrollhoz (100%-os sejtlyzisz) képest %-ban határoztuk meg (átlag $\pm$ standard hiba) és a változás mértékét a pre-

inkubációs fertőzés nélküli mérésekhez (100%-on látható jelölés) képet kaptuk. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (párosított t-próba), összehasonlítva a pre-inkubációs fertőzés mentes (NPI) sejtekhez képest, $n=3$.

Ezen esetekben a *C. albicans* SC5314 fertőzés alacsonyabb MOI=1:200 fertőzési dózisain volt látható szignifikánsan alacsonyabb mértékű károsodás a nem felkészített immunitású mérésekhez képest. Ezek alapján elmondható, hogy egy kisebb dózisú *C. albicans* fertőzés esetén a felkészített immunitású állapot előnyös a bőrhámsejtek károsodásának mértéke szempontjából.

A következő vizsgálatban felderítettük, hogy különböző MOI fertőzési dózisokon történő élő *C. parapsilosis* törzsekkel való előinkubációs fertőzést követően hogyan változik a *C. albicans* SC5314 törzs által okozott károsodás a fertőzésre érzékenyebb HPV-KER bőrhámsejteken. Az LDH felszabadulás mértéke a legkevésbé szignifikánsabb szinten, a MOI=1:1 és MOI=1:10 *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek előinkubációs fertőzését követően volt megfigyelhető. A MOI=5:1 és MOI=1:20 fertőzési dózisokon szignifikánsabbnak mutatkozott a károsodás, míg a legszignifikánsabb LDH szint a MOI=10:1 fertőzési dózison jelent meg (14. ábra).



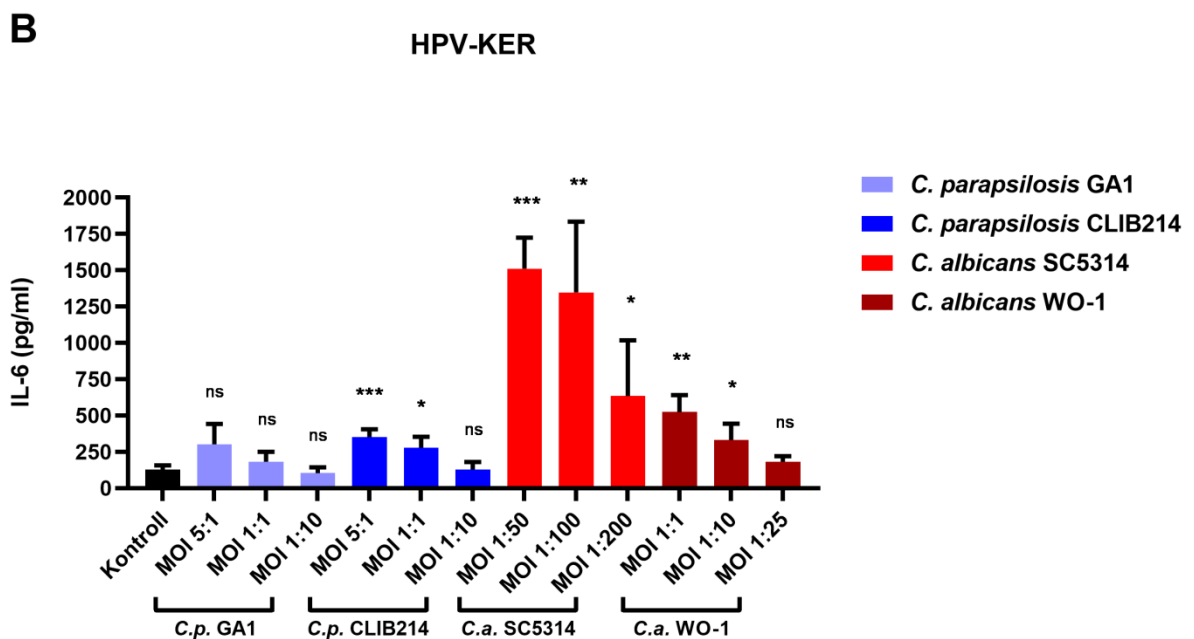
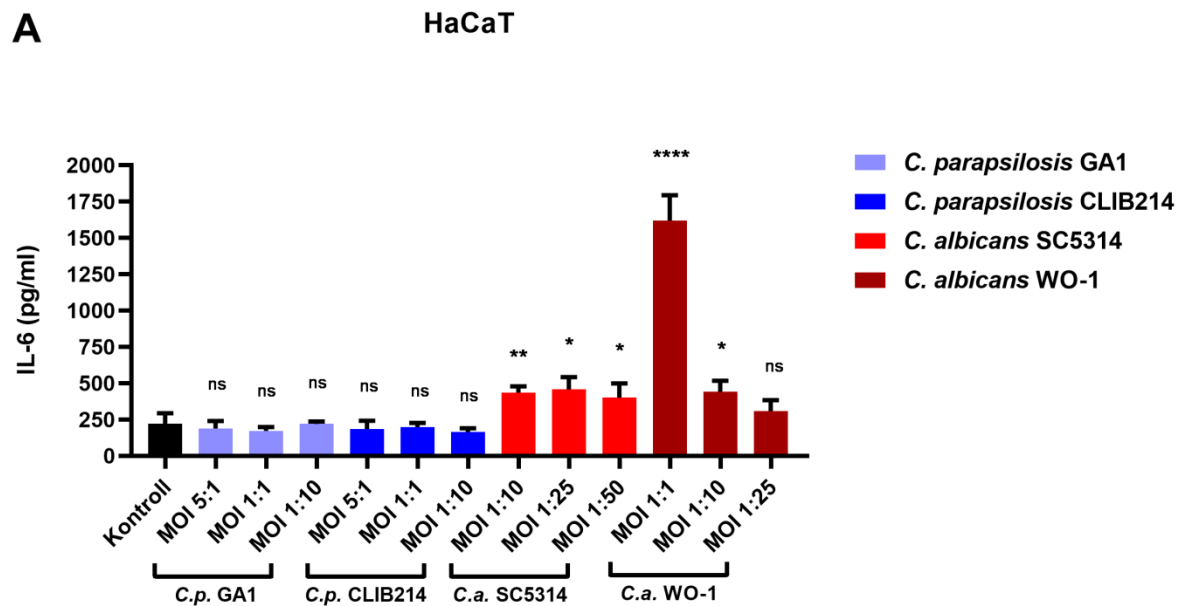
14. ábra. A *C. albicans* által okozott sejtkárosodás HPV-KER keratinocitákban a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek különböző MOI fertőzési dózisu 24 óras pre-inkubációs fertőzését követően. A sejtkárosodás mértékét 24 órával a bőrhámsejtek *C. albicans* fertőzése után a felülúszóban mért LDH aktivitás alapján határoztuk meg. Az LDH aktivitást a pozitív kontrollhoz (100%-os sejtlyzis) képest %-ban határoztuk meg (átlag $\pm$ standard hiba) és a változás mértékét a pre-inkubációs fertőzés nélküli mérésekhez (100%-on látható jelölés) képest kaptuk. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 törzs + *C. parapsilosis* GA1 preinkubáció és *C. parapsilosis* CLIB214 pre-inkubáció (vonalas piros és pöttyös piros jelölések). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (párosított t-próba), összehasonlítva a pre-inkubációs fertőzés mentes sejtekhez képest, $n=3$.

Vizsgálatunk alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a legnagyobb LDH felszabadulás a nem alacsony és nem is magas *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzési dózisokon jelenik meg, ezzel szemben a magas és alacsony fertőzési dózison történt előinkubációs fertőzés pozitív hatással volt a keratinocita sejtek károsodására.

VI.3. Keratinociták citokin illetve kemokin termelése *Candida* stimulusra

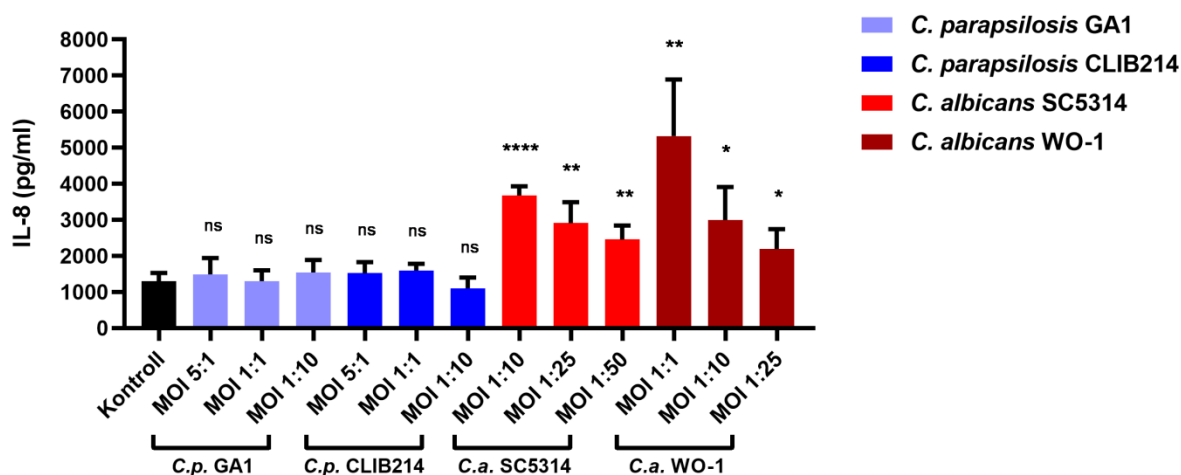
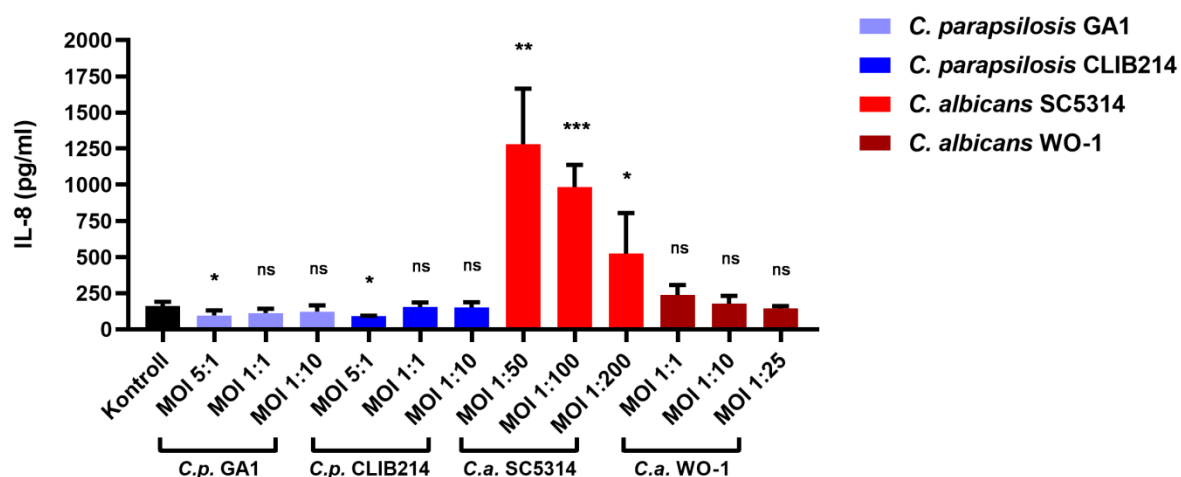
Ismert, hogy a keratinociták képesek kemokinek és gyulladásos citokinek termelésével reagálni mikrobiális stimulusokra (Pivarcsi és mtsai., 2005; Pivarcsi és mtsai., 2004; Nestle és mtsai., 2009). Ezt a *C. albicans* foszfolipomannán sejtalkomponensével (Li és mtsai., 2008) és ezen gomba által termelt szolubilis faktorokkal (Wollina és mtsai., 2004) inkubált keratinociták esetén is kimutatták. Arról azonban kevés adat található, hogy a bőrhámsejtek hasonlóan reagálnak-e a *C. parapsilosis* jelenlétére. Vizsgálatainkban számos citokin és kemokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL5, IL-36g, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-17a) szekréciójának meghatározására végeztünk méréseket. Ezek közül szignifikáns mértékű szekréciót kizárólag az IL-6 citokin és IL-8 kemokin esetén tudtunk detektálni. A többi analit szekréciójának mértéke nem érte el a használt kitek mérésstartományának minimális értékét, vagy nem mutatott szignifikáns mértékű szekréciót a kontroll csoporthoz viszonyítva. HaCaT sejtvonal esetében az IL-6 szekréció a *C. parapsilosis* törzsekkel való fertőzést követően nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz viszonyítva, ezzel ellentétben a *C. albicans* törzsek esetén az IL-6 szekréció szignifikánsan magasabb mértékű volt, kiugróan a *C. albicans* WO-1 törzs MOI

1:1 arányú fertőzési dózisa esetében. A *C. albicans* SC5314 törzs által kiváltott IL-6 szekréció is szignifikáns mértékben nőtt a kontroll csoporthoz képest, bár elmaradt a WO-1 törzs MOI 1:1 fertőzési arányú citokin szekréciójához képest. A *C. albicans* SC5314 törzs virulensebb jellege miatt a fertőzési arányt nem tudtuk 1:1 arányra csökkenteni mivel a sejtek LDH vizsgálat keretében mért károsodásának mértéke túl jelentősnek bizonyult (35% feletti). Ezzel szemben a virulensebbnek számító *C. albicans* SC5314 törzs MOI 1:10 fertőzési aránya nem okozott olyan kiugróan magas szignifikancia szintű citokin szekréciót, mint a WO-1 törzs MOI 1:1 fertőzési aránya esetén (15. ábra).



15. ábra. HaCaT (A) és HPV-KER (B) keratinociták IL-6 termelése 24 órával a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzés után. Az x-tengelyen lévő számok a MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelzik. SC5314 (piros) és WO-1 (rozsdabarna): *C. albicans* törzsek, GA1 (világoskék) és CLIB214 (sötétkék): *C. parapsilosis* törzsek. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (párosítatlan t-próba) a nem fertőzött kontroll sejtekhez képest, $n=3$.

A HaCaT sejtek IL-8 kemokin szekréciója a *C. parapsilosis* törzsek esetén szintén nem mutatott szignifikáns mértékű szekréciót a kontroll csoporthoz viszonyítva, azonban a *C. albicans* mindkét törzse esetén dóziszfüggő IL-8 termelés volt jellemző, mely minden esetben szignifikáns mértékű volt a kontroll csoporthoz képest. HPV-KER sejtek IL-8 szekréciója esetében ugyanezen dóziszfüggő szekréció csak a *C. albicans* SC5314 törzsszel való fertőzés hatására volt elmondható. A *C. albicans* WO-1 törzs és *C. parapsilosis* törzsekkel való fertőzés hatására a HPV-KER keratinociták nem mutattak szignifikáns IL-8 termelést (16. ábra).

A**HaCaT****B****HPV-KER**

16. ábra. HaCaT (A) és HPV-KER (B) keratinociták IL-8 termelése 24 órával a *C. parapsilosis* és *C. albicans* fertőzést követően. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelzik. SC5314 (piros) és WO-1 (rozsdabarna): *C. albicans* törzsek, GA1 (világoskék) és CLIB214 (sötétkék): *C. parapsilosis* törzsek. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (párosítatlan t-próba) a nem fertőzött kontroll sejtekhez képest, $n=3$.

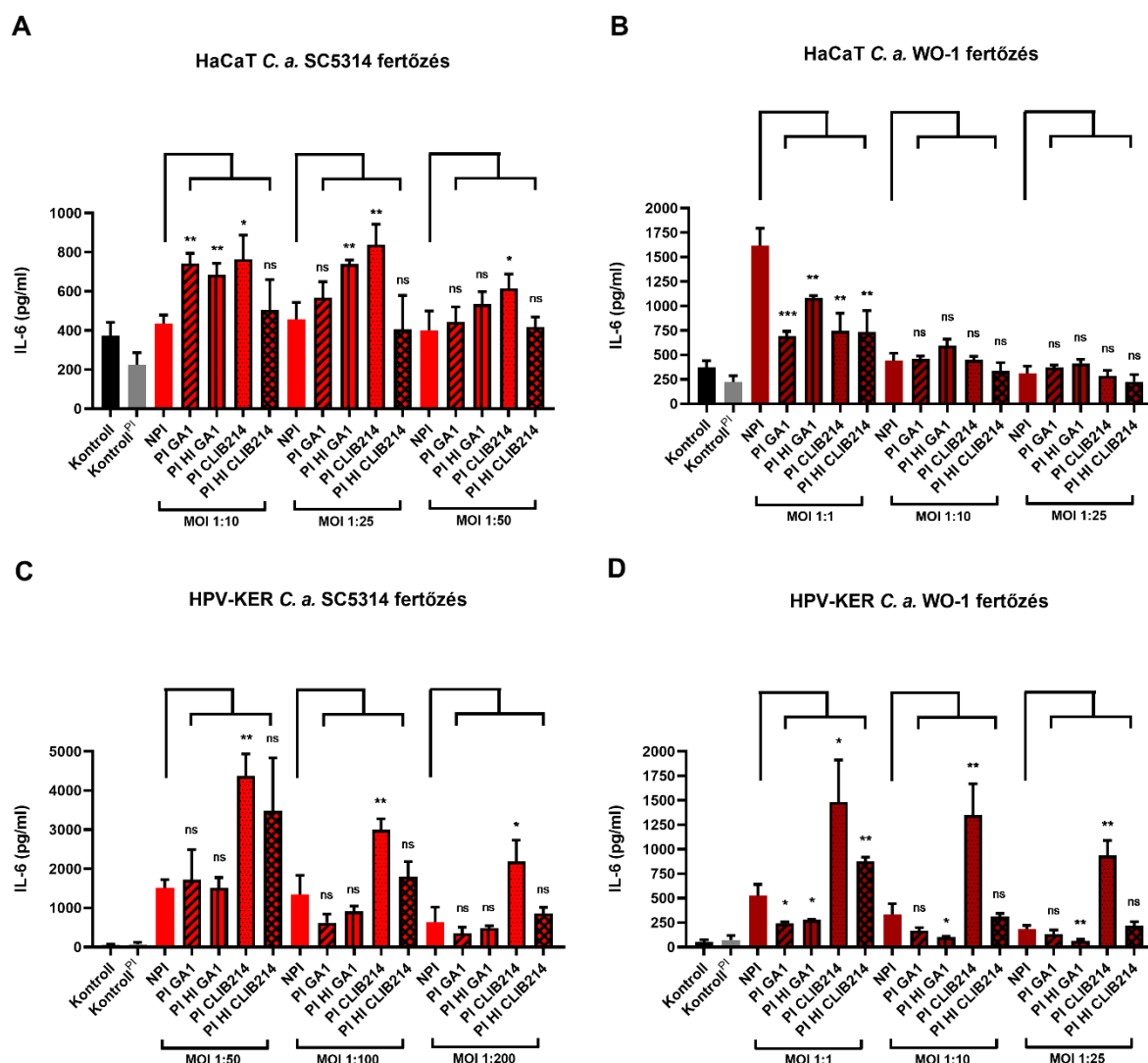
Wollina és mtsai. (2004) HaCaT keratinocitákat kezeltek olyan sterilre szűrt oldatokkal (filtrátum), melyekben korábban *C. albicans* sejteket inkubáltak. Eredményeinkhez hasonlóan

ez a vizsgálat sem detektált IL-1 β termelést sem a kontroll, sem a kezelt hámsejtek felülúszójában. Továbbá a kezelt keratinociták IL-8 termelése vizsgálatukban fokozódott, valamint az IL-6 produkció is növekedett a kezelések hatására. Ez az emelkedés azonban törzsfüggő volt, mivel az egyik *C. albicans* törzshöz tartozó filtrátum nem okozott IL-6 termelést. Eredményeink és az említett cikk eredményi közötti ellentmondásokra a kísérleti körülmények (élő gombával történő stimulus, filtrátumos kezelés használata a keratinocitákon) eltérése és a felhasznált törzsek különbözősége adhat magyarázatot. A HPV-KER sejtek IL-6 valamint IL-8 termelésére közösen elmondható, hogy a virulensebbnek számító *C. albicans* törzsek okoztak nagyobb mértékű szekréción, azonban a kevésbé virulens *C. albicans* WO-1 törzs a kommenzalistának számító *C. parapsilosis* törzsek szintjén eredményezett szekréción, mely a kontroll csoporthoz képest az esetek többségében nem volt szignifikáns és az SC5314 törzsnél tapasztalt szekréción mértékéhez képest minden esetben csökkent volt.

VI.4. Keratinociták citokin/kemokin termelése felkészített immunitású körülmények között

A pre-inkubáció mentes fertőzések esetében láthattuk, hogy a *C. parapsilosis* törzsek nem, míg a *C. albicans* törzsek szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 szekréción eredményeztek HaCaT és HPV-KER sejtvonalon is. Következő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk élő és hőinaktivált *C. parapsilosis* törzsekkel történő előinkubációs fertőzést követően ugyanezen citokin és kemokin szekretálódásának mértékét *C. albicans* fertőzés hatására. HaCaT keratinociták esetén az IL-6 szekréción *C. albicans* SC5314 fertőzés után az élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel való pre-inkubációt követően emelkedett meg szignifikáns mértékben az összes alkalmazott fertőzési dózison az előinkubáció mentes fertőzéshez képest. A HaCaT sejtek IL-6 termelése esetén *C. albicans* WO-1 törzsszel történt fertőzésnél magas MOI fertőzési dózison volt megfigyelhető szignifikánsan alacsonyabb IL-6 szekréción minden pre-inkubációs körülménynél, míg az alacsonyabb fertőzési dózisokon nem mutatkozott szignifikáns eltérés az IL-6 szekretálódásában egyik előinkubációs körülmény esetében sem. A HPV-KER keratinociták IL-6 citokin termelése *C. albicans* SC5314 fertőzése esetén minden fertőzési dózison kizárólag az élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel történt pre-inkubáció során mutatott szignifikánsan magasabb értéket az előkezelés mentes állapothoz képest. A HPV-KER bőrhámsejtek IL-6 szekretálódásánál, *C. albicans* WO-1 törzs fertőzését követően, hasonlóan az előző esethez csak élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel végzett előinkubációs fertőzést

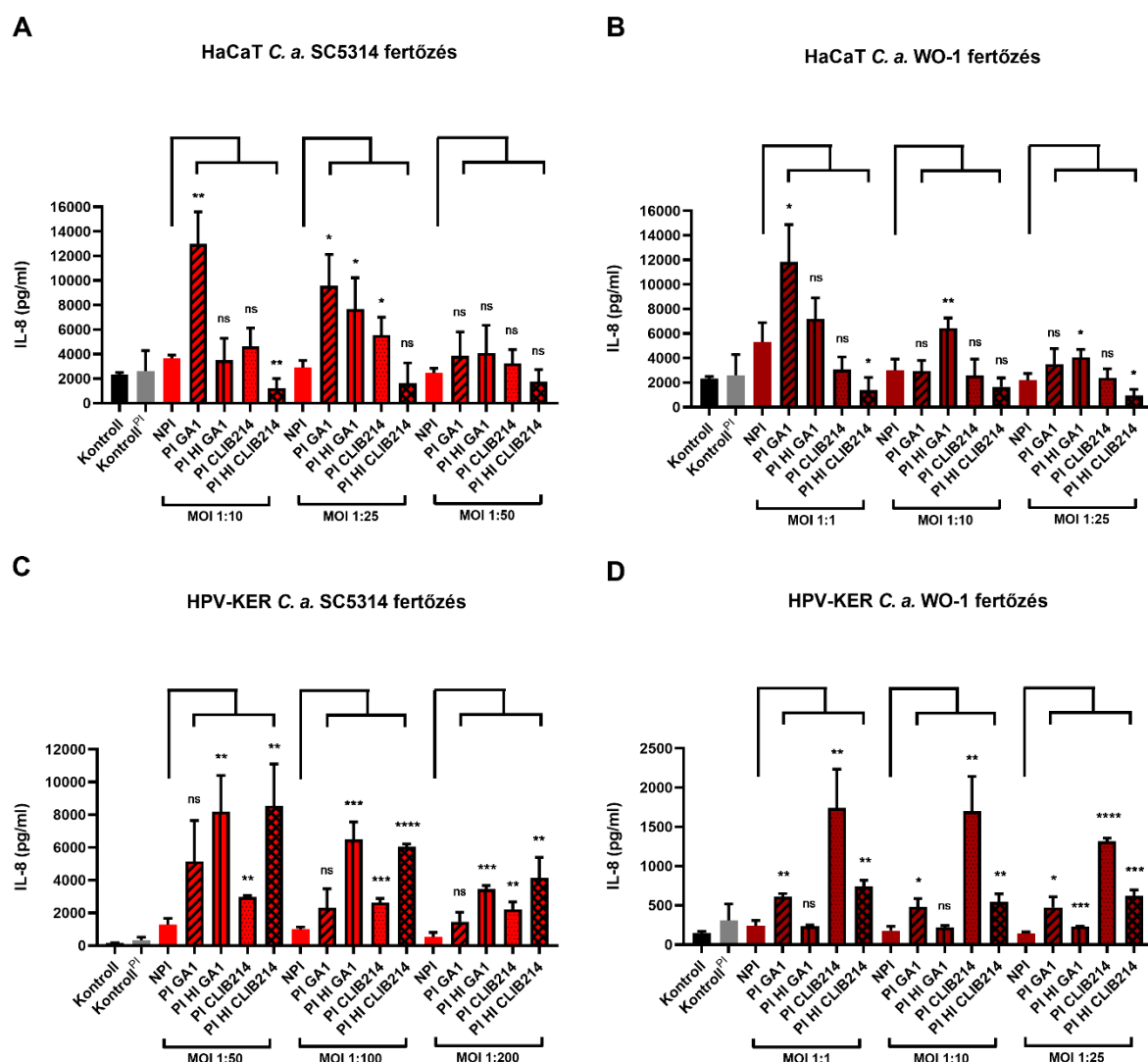
követően láthattunk szignifikánsan magasabb mértékű IL-6 citokin termelődést a pre-inkubáció mentes fertőzéssel összehasonlítva (17. ábra).



17. ábra. HaCaT (A és B) valamint HPV-KER (C és D) keratinocita sejtek IL-6 citokin termelése *C. parapsilosis* törzsekkel való pre-inkubációt és *C. albicans* 24 órás fertőzést követően. Az x-tengelyen a fertőzési kondíciók láthatóak, PI=Pre-inkubációs fertőzés adott törzsre, NPI=Nem pre-inkubációs fertőzés, valamint a kondíciók alatt látható számok a MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelzik. SC5314 (piros) és WO-1 (rozsdabarna): *C. albicans* törzsek * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (párosítatlan t-próba) a pre-inkubáció mentes *C. albicans* fertőzéshez képest, $n=3$.

HaCaT sejtvonal IL-8 szekréciója esetén *C. albicans* SC5314 fertőzésre az élő *C. parapsilosis* GA1 törzzsel történt pre-inkubáció esetében mutatkozott meg szignifikánsan

magasabb IL-8 termelés, a legalacsonyabb alkalmazott fertőzőési dózison kívül minden fertőzőési dózisonál, az előinkubáció mentes fertőzéshez képest. HaCaT sejtek IL-8 kemokin szekréciója esetében *C. albicans* WO-1 törzs fertőzésénél a legmagasabb MOI=1:1 fertőzőési dózison volt szignifikánsan nagyobb az IL-8 termelés élő *C. parapsilosis* GA1 törzsszel történt preinkubációt követően. HPV-KER keratinocita sejtek IL-8 termelődésénél *C. albicans* SC5314 törzs fertőzésére a hőinaktivált *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsekkel végzett előinkubáció után volt megfigyelhető nagyobb mértékű IL-8 termelés az előinkubáció mentes *C. albicans* fertőzéshez képest. Továbbá *C. albicans* WO-1 törzs fertőzését követően, az élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel történt előinkubációnál volt szignifikánsan magasabb IL-8 termelés HPV-KER sejteknél (18. ábra).



18. ábra. HaCaT (A és B) valamint HPV-KER (C és D) keratinocita sejtek IL-8 kemokin termelése *C. parapsilosis* törzsekkel való preinkubációt és *C. albicans* 24 órás fertőzést követően. Az x-tengelyen a fertőzőési kondíciók láthatóak, PI=Preinkubációs fertőzés adott

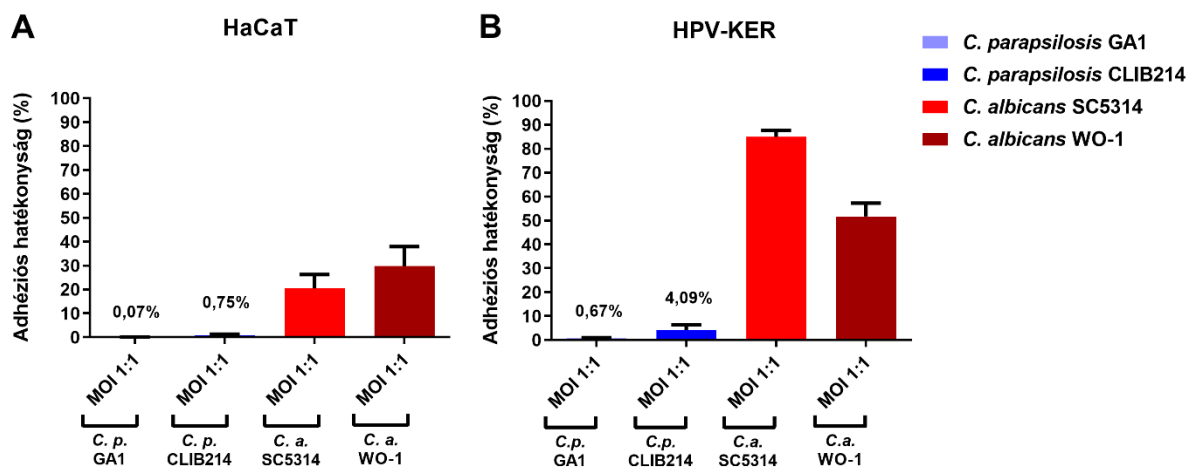
törzsre, NPI=Nem pre-inkubációs fertőzés, valamint a kondíciók alatt látható számok a MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelzik. SC5314 (piros) és WO-1 (rozsdabarna): *C. albicans* törzsek * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ (párosítatlan t-próba) a pre-inkubáció mentes *C. albicans* fertőzéshez képest, $n=3$.

Összességében arra a következtetésre juthatunk, hogy a HaCaT és HPV-KER keratinocita sejtek *C. parapsilosis* törzsekkel történő pre-inkubáció hatására, ezen előinkubáció különböző kondíciói (élő vagy hőinaktivált törzs/törzsfüggés) különböző mértékben váltanak ki IL-6 citokin vagy IL-8 kemokin szekréciót *C. albicans* SC5314 vagy WO-1 törzsszel végzett fertőzés hatására. Általános tendenciájában elmondható, hogy ezen előinkubációs fertőzésekben a nem előinkubációs fertőzésekhez képest magasabb mértékben szekretálnak a HaCaT és HPV-KER keratinocita sejtek IL-6 citokint és IL-8 kemokint. Tehát a felkészített immunitású immunválasz elősegítheti az IL-6 citokin és IL-8 kemokin termelést HaCaT és HPV-KER keratinociták esetében is.

VI.5. *Candida* sejtek kitapadása keratinocitákhoz

A különböző opportunistá patogén *Candida* fajok képesek lehetnek megtapadni epiteliális sejtek felszínén. Ebben szerepet játszhatnak a gazdasejtek plazmamembránjában lokalizálódó PRR-ek, illetve a gombasejtek által expresszált adhezin fehérjék. Adhezinek termelését kimutatták *C. albicans* és *C. parapsilosis* fajokban is (Cota és Hoyer, 2015; Gácsér, 2015), azonban a *C. parapsilosis* gazdasejtekhez történő kitapadó képessége elmarad a *C. albicans*tól (Gácsér, 2015). Ezen kísérletek arra irányultak, hogy megvizsgáljuk, ezen két *Candida* faj milyen mértékben képes kötődni a keratinocita sejtekhez.

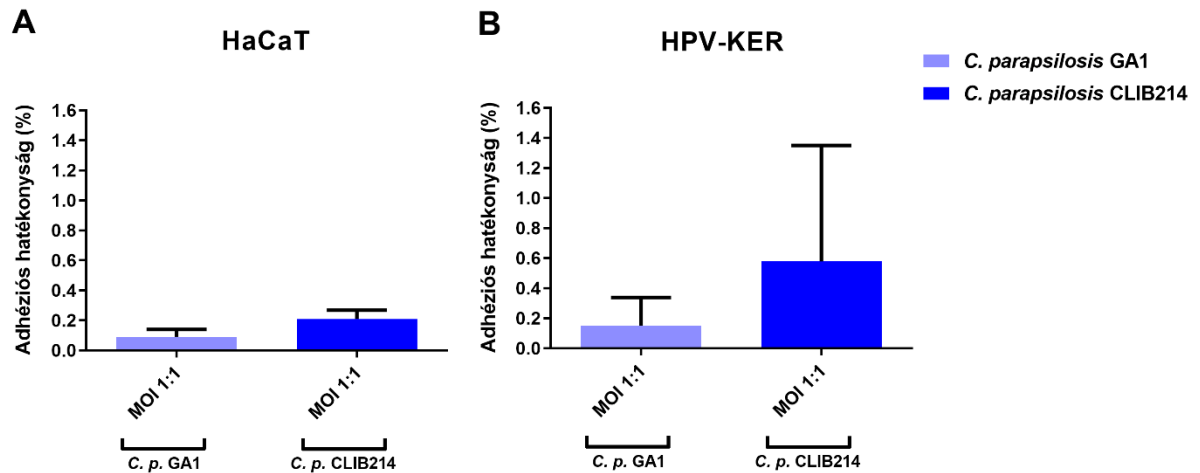
A *Candida* törzsekkel való fertőzést követően 1 órával a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek esetén minimális mértékű kitapadó képesség volt detektálható MOI=1:1 fertőzési dózis mellett. Ezzel szemben a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek magasabb mértékben voltak képesek kötődni a keratinocita sejtekhez a *C. parapsilosis* törzsekhez képest (19. ábra).



19. ábra. A *C. parapsilosis* és *C. albicans* adhéziója (A) HaCaT és (B) HPV-KER keratinocitákhoz 1 órával a fertőzés után. A fertőzést követően az adhézió hatékonyságát CFU számlálással határoztuk meg az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek (világoskék és sötétkék), *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). n=3.

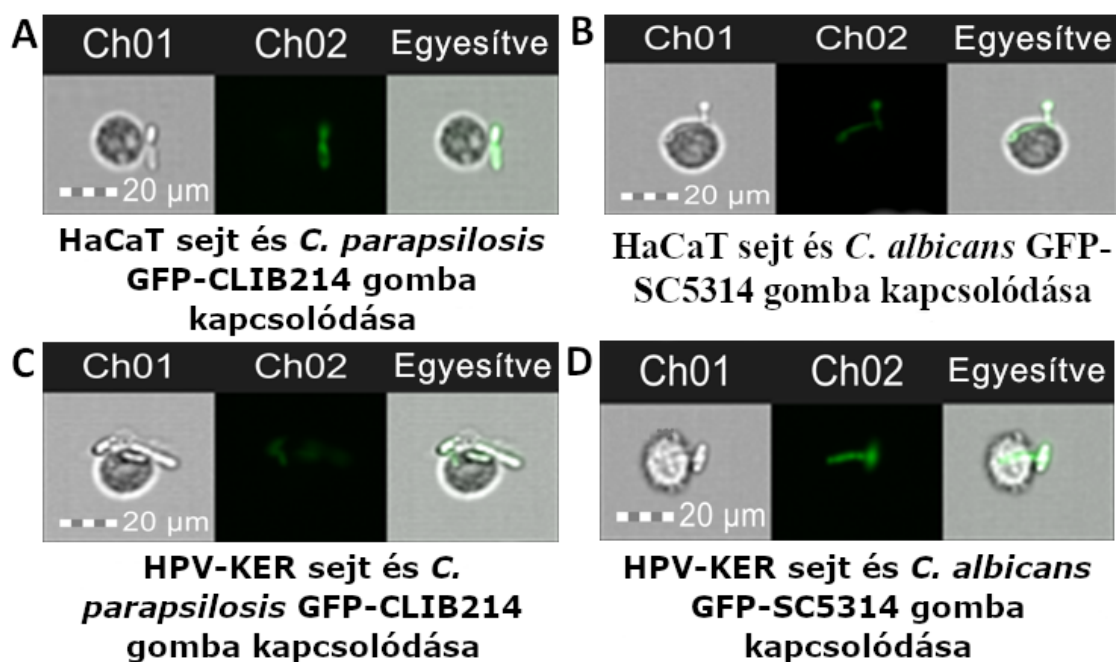
Ez a tapadási képesség szignifikánsan nagyobbak bizonyult a HPV-KER sejtek esetén mért *C. albicans* törzsek általi asszociációban a HaCaT sejteknél mértékhez képest. Ezen mértékbeli különbség magyarázata a *C. albicans* törzsek valódi hifaképző képessége a *C. parapsilosis* törzsekkel szemben. Egy *ex vivo* humán bőrmetszet modellben már kimutatták, hogy a *C. albicans* nagyobb adhézións képességet mutatott az epidermisz hámsejtjeihez, mint a *C. parapsilosis* (Ullmann és Berdicevsky, 2011).

Vizsgálataink kiterjedtek arra az eshetőségre is, hogy a *C. parapsilosis* törzsek hosszabb inkubációs idejű fertőzés mellett képesek lehetnek-e magasabb kitapadó képességet mutatni. Ezen vizsgálatok során egyik *C. parapsilosis* törzs sem mutatott emelkedett mértékű kitapadó képességet egyik vizsgált sejtvonal esetében sem (20. ábra).



20. ábra. A *C. parapsilosis* kapcsolódása (A) HaCaT és (B) HPV-KER keratinocitákhoz 24 órával a fertőzés után. A fertőzést követően az adhézió hatékonyságát CFU számlálással határoztuk meg az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek (világoskék és sötétkék). n=3.

Az adhézió jelenségével kapcsolatban reprezentatív felvételeket készítettünk, ennek elérése céljából GFP-t expresszáló *C. albicans* vagy *C. parapsilosis* törzsekkel fertőztünk HaCaT és HPV-KER sejteket, majd képkötő áramlási citométerrel detektáltuk az asszociáció mértékét (21. ábra).

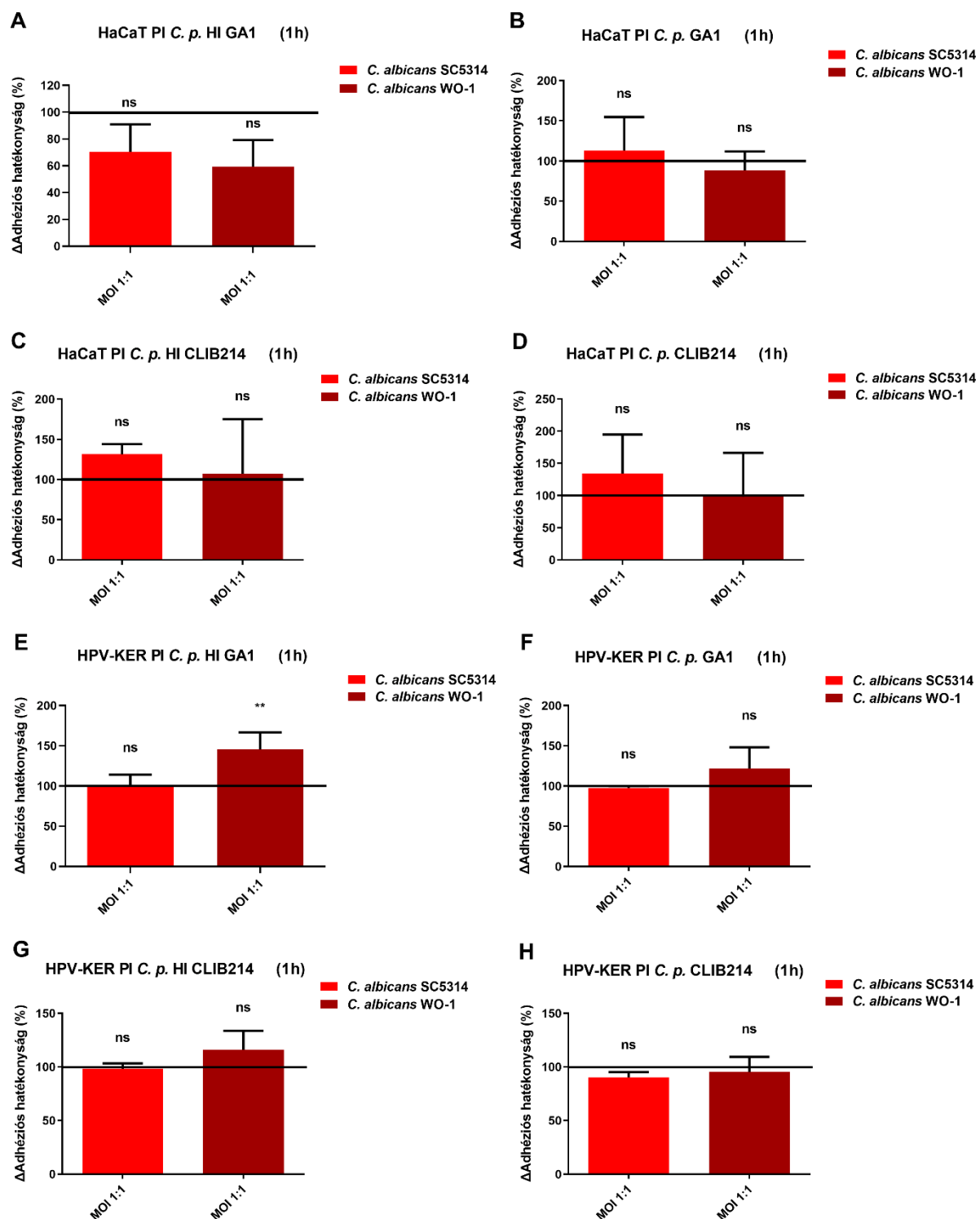


21. ábra. A *C. parapsilosis* (A, C) és *C. albicans* (B, D) tapadása a keratinocitákhoz. MOI=5:1. A bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után az asszociációt képalkotó áramlási citometriával mértük és mikroszkópos képeket készítettünk a GFP-pozitív keratinocitákról. Olyan helyzetek reprezentatív felvételei láthatók, ahol a gombasejtek a keratinocitákhoz kitapadva jelennek meg. A GFP-CLIB214 a GFP-t kifejező *C. parapsilosis* törzset, a GFP-SC5314 pedig a GFP-t kifejező *C. albicans* törzset jelöli. Ch01: fénymikroszkópos csatorna; Ch02: GFP emissziót detektáló csatorna; egyesített: a Ch01 és Ch02 fúziója.

A képalkotó áramlási citométer minden egyes sejtről mikroszkópos felvételt tud készíteni, a képek megtekintésével lehetőségünk volt felmérni, az asszociáció pozitív eseményekben a sejtfelszínhez való adhéziót. *Candida* fajtól és sejtvonaltól függetlenül a GFP pozitív keratinociták fluoreszcenciája szinte kivétel nélkül a sejtfelszínükre tapadt gombasejtekből származott (21. ábra).

VI.6. *Candida* sejtek adhéziója keratinocitákhoz felkészített immunitású állapotban

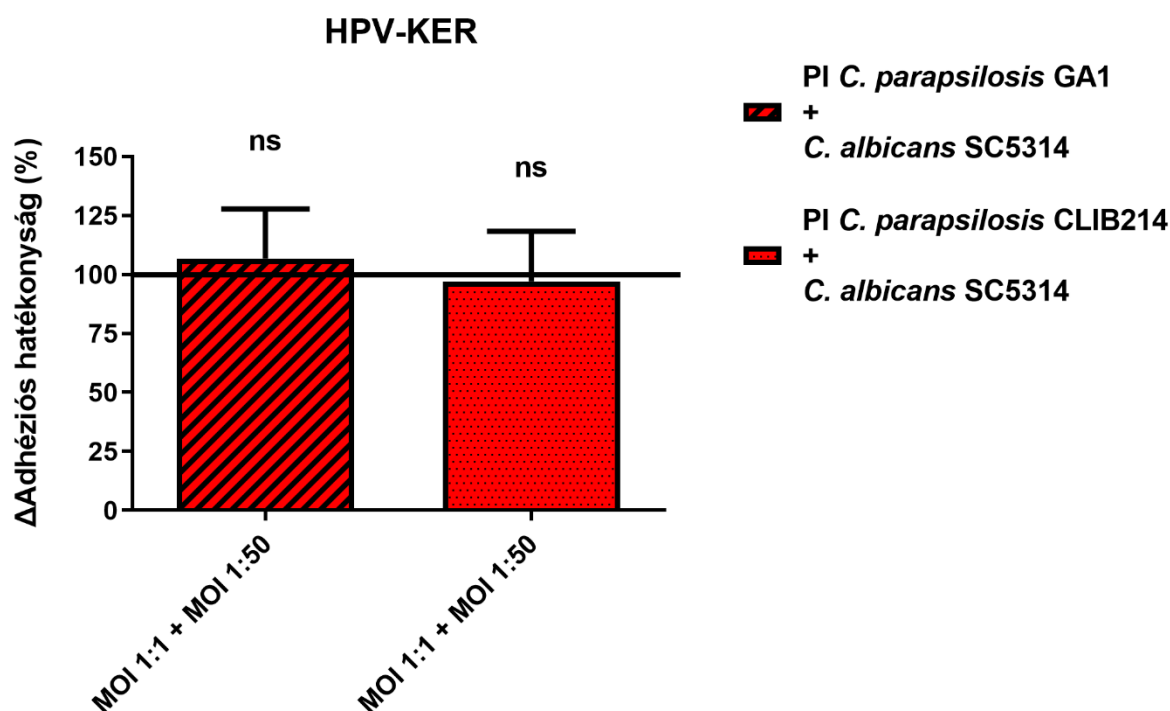
Kísérleteink kiterjedtek a keratinocita sejtek és *Candida* sejtek között végbemenő adhézió vizsgálatára pre-inkubációs körülmények között. Ebben az esetben a vizsgálódásunk alapja az volt, hogy a bőrfelület gyakori kommenzalistájaként ismert *C. parapsilosis* törzsekkel való előfertőzést követően a *C. albicans* adhéziójának hatékonysága mutat-e különbséget a pre-inkubáció mentes körülmények között mért adhéziós képességhez képest. Az LDH és ELISA mérések után ezen kísérletben is élő és hőinaktivált *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzseket használtunk fel pre-inkubációs fertőzés során. Ezután értékeltük a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek asszociációs hatékonyságát a hámsejtekhez. HaCaT sejtvonal esetén egyik pre-inkubációs körülmény sem okozott változást sem a *C. albicans* SC5314, sem a *C. albicans* WO-1 törzs adhéziós képességében a keratinocita sejtekhez az előfertőzés mentes vizsgálatokhoz hasonlítva. HPV-KER sejtvonalon a pre-inkubációs körülmények döntő többségében, hasonlóan a HaCaT sejteknél mértékhez, egyik *C. albicans* törzs kitapadó képessége sem mutatott szignifikáns változást a pre-inkubációs fertőzés mentes állapotokhoz képest. Egyedül a hőinaktivált *C. parapsilosis* GA1 törzsszel előinkubált hámsejteknél mutatott a *C. albicans* WO-1 törzs szignifikánsan magasabb mértékű adhéziót az előinkubáció mentes körülményhez képest. Összességében nézve kijelenthetjük, hogy a *C. parapsilosis* törzsekkel pre-inkubált keratinocita sejtekkel szemben a *C. albicans* törzsek nem mutatnak változást az adhéziós hatékonyságukban (22. ábra).



22. ábra. A *C. albicans* HaCaT (A,B,C,D) és HPV-KER (E,F,G,H) keratinocitákhoz történő adhéziójának mértéke 24 órás pre-inkubációs fertőzést követően HI GA1 (A és E), élő GA1 (B és F), HI CLIB214 (C és G) és élő CLIB214 (D és H) *C. parapsilosis* törzsekkel. Az adhéziós hatékonyságot CFU számolással határoztuk meg 1 órával a bőrhámsejtek *Candida* fertőzését követően, az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az x-tengelyen szereplő számok

MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). ** $p < 0.01$ (párosítatlan t-próba), összehasonlítva a pre-inkubációs fertőzés mentes sejtek adhéziónak hatékonyságával, $n=3$.

A pre-inkubációs vizsgálatok során a *C. parapsilosis* törzseket minden alkalommal lemostuk a *C. albicans* fertőzés előtt a konfluens keratinocita sejtrétegről. Ezt a mosást három alkalommal végeztük el, és ahogy az előinkubáció mentes adhéziónak kísérleteknél már láttuk, a *C. parapsilosis* törzsek csak nagyon alacsony mértékben képesek kapcsolódni a hámsejtekhez. Ennélfogva a lemosás nagy hatékonysággal elvégezhető, viszont a tenyésztőlemez mintahelyeinek pereméről maradéktalanul nem tüntethetőek el a gombasejtek. Ezen probléma elhárítására nourseothricin (NTC) rezisztens *C. albicans* SC5314 törzset használtunk fel. A rezisztens törzs és a fertőzési médiumhoz adagolt NTC hatására a *C. parapsilosis* törzsek elpusztultak, és így a CFU alapú kiértékelés során nem torzították a *C. albicans* gombasejtek általi kitapadási hatékonyságot a bőrhámsejtekhez. Továbbá ahogy azt már az LDH vizsgálatoknál is megfigyeltük, az alacsonyabb MOI fertőzési dózisban történő *C. albicans* fertőzés pozitív változást eredményezhet pre-inkubációs körülmények között. Így a *C. albicans* SC5314 törzs fertőzési dózisát MOI=1:50 arányra változtattuk (23. ábra).



23. ábra. A *C. albicans* (NTC^R) tapadásának mértéke a HPV-KER keratinocitákhoz élő *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsekkel történő 24 órás pre-inkubációs fertőzést követően. Az adhézió hatékonyságát CFU számolással határoztuk meg 1 órával a bőrhámsejtek NTC-Rezisztens (NTC^R) *C. albicans* SC5314 törzzsel történő fertőzése után, az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. Az x-tengelyen szereplő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 törzs, *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzzsel pre-inkubálva (vonalas piros és pöttyös piros jelölések). (Párosítatlan t-próba), összehasonlítva a pre-inkubációs fertőzés mentes sejtek adhéziós hatékonyságával, n=3.

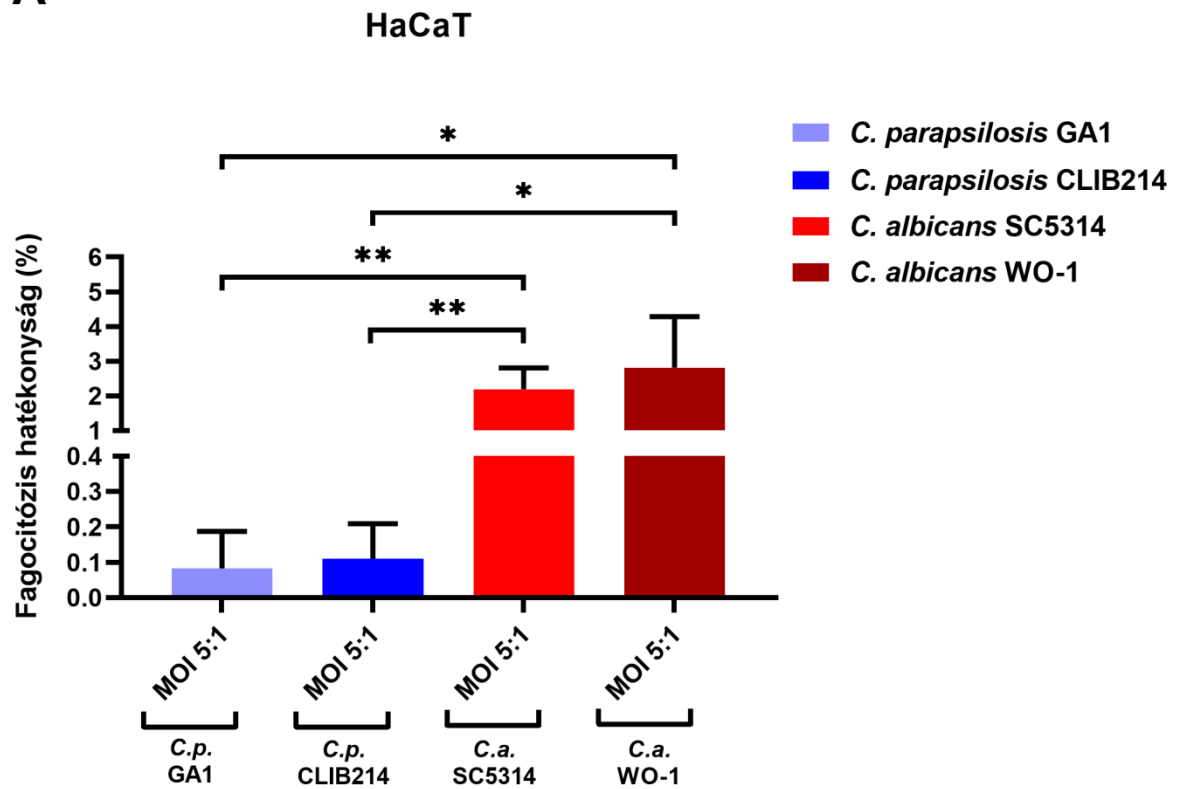
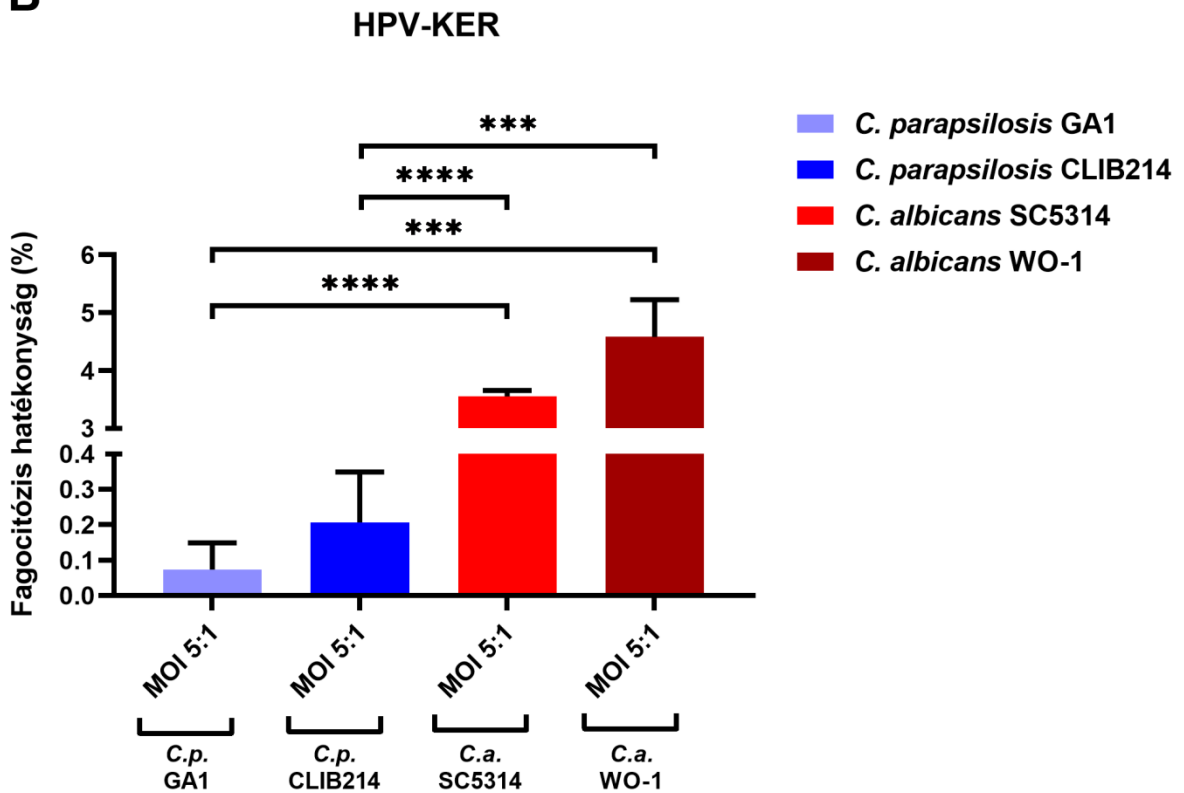
Ahogy az a 23. ábrán is látható, ezen körülményekben történő változás nem okozott szignifikáns eltérést élő *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzzsel való pre-inkubációs fertőzés után az NTC rezisztens *C. albicans* SC5314 törzs adhéziós hatékonyságában, összehasonlítva a pre-inkubáció mentes adhézióhoz képest. Összességében elmondható, hogy a *C. albicans* törzsek adhéziós hatékonyságára nézve a *C. parapsilosis* törzsekkel történő pre-inkubáció nem okoz eltérést az előinkubáció mentes körülményeknél tapasztalt adhéziós hatékonysághoz képest és a nourseothricin rezisztens törzs sem eredményezett szignifikáns változást a vad típusú törzshöz viszonyítva.

VI.7. Keratinociták fagocitáló képessége *Candidákkal* szemben

A gombasejtek hámsejtek általi internalizációjának (fagocitózisának) egyértelmű kimutatására pHrodo™ Red festékkel jelölt *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtekkel fertőztük a két keratinocita kultúrát. Az így jelölt gombasejtek extracelluláris lokalizáció esetén nem, vagy csak kisebb mértékben fluoreszkálnak, míg intracelluláris helyzetben a fagolizoszómális savasodás következtében a festék intenzív pozitív jelet ad. Ez az eljárás más kutatócsoport munkájából is ismert *Candida* sejtekkel végzett kísérletek során (Shintaku és mtsai., 2013).

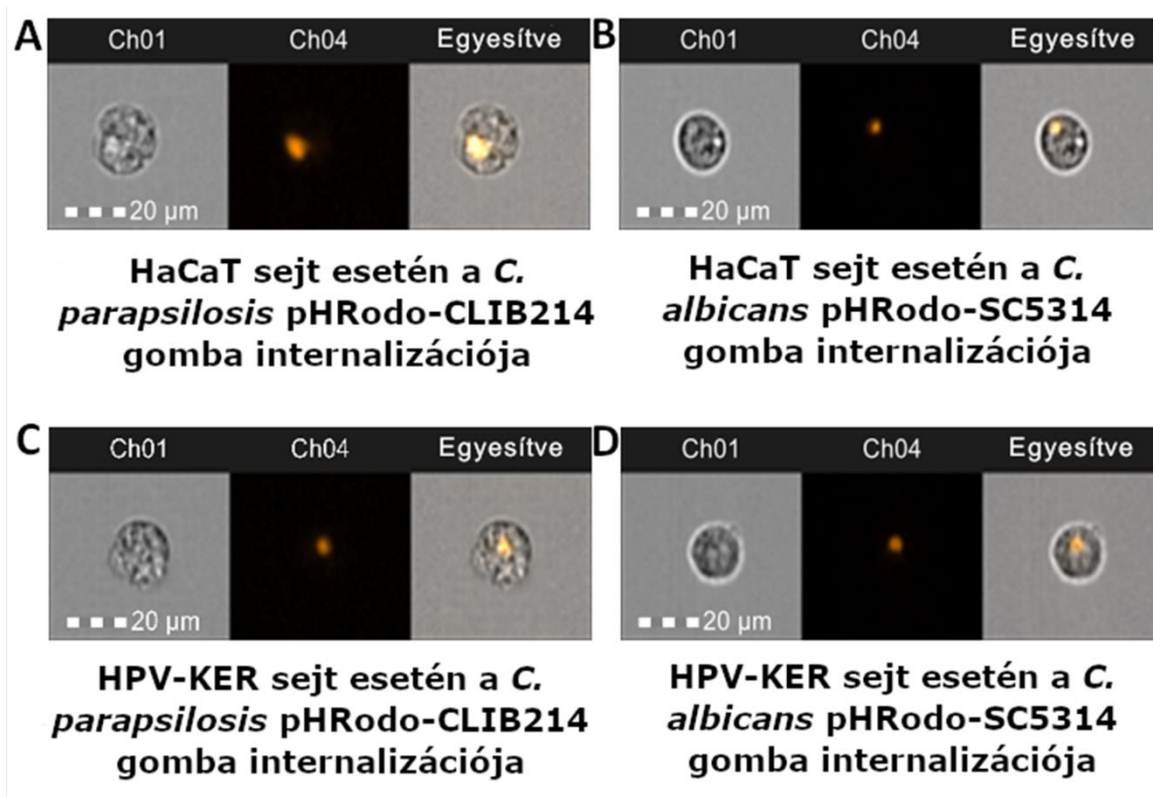
Bár a keratinociták nem fagocita jellegű sejtek, alacsonyabb mértékben mégis képesek fagocitálni az adott gombát. Egy Magyarországon végzett transzmissziós elektronmikroszkópos kutatás igazolta, hogy a bőrhámsejtek képesek a *C. albicans* sejtek kismértékű fagocitózisára (Csátó és mtsai., 1990), arról azonban nincs adat, hogy a *C. parapsilosis* is képesek-e bekebelezni. Mivel a *C. parapsilosis* törzsek kis mértékben képesek kitapadni a keratinocita sejtekhez, ezen törzsek esetén 3 órával a fertőzést követően

vizsgáldtunk és a detektálható fagocitózis elhanyagolhatóan alacsony mértékű volt. Ezzel szemben a *C. albicans* törzseknél, melyek kitapadó képességüket tekintve felülmúlják a *C. parapsilosis* törzseket, 1 órás inkubációs időt követően mindkét keratinocita sejtvonal esetén képesek voltunk detektálni alacsony mértékű, de a *C. parapsilosis* törzsekétől szignifikánsabb szintű fagocitózist (24. ábra). A fagocitózis pozitív események könnyebb detektálása érdekében ötször több gombával fertőztük a sejteket a tenyésztőlyukakban levő sejtszámhoz képest (MOI=5:1).

A**B**

24. ábra. A HaCaT (A) és HPV-KER (B) keratinociták fagocitózisának hatékonysága a *C. parapsilosis* és *C. albicans* gomba ellen. A fagocitózis mérése 3 órával a bőrhámsejtek *C. parapsilosis* és 1 órával a *C. albicans*szal való fertőzés után történt. A fagocitózis mértékét Amnis FlowSight® Imaging áramlási citométerrel vizualizáltuk, miután a gombát pHrodo™ Red festékkel jelöltük. Az x-tengelyen lévő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek (világoskék és sötétkék), *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek (piros és rozsdabarna). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (párosítatlan t-próba), $n=3$.

Képkalkotó áramlási citométerrel a pHrodo™ Red festékkel jelölt gombák által fagocitózis pozitív keratinocitákat mindkét sejtvonal esetén elvértve, de detektáltunk, így az ezekről készült felvételek igazolták, hogy mind a HaCaT, mind a HPV-KER sejtvonal képes volt a *C. albicans*, valamint a *C. parapsilosis* sejtek ritkán bekövetkező internalizációjára (25. ábra).



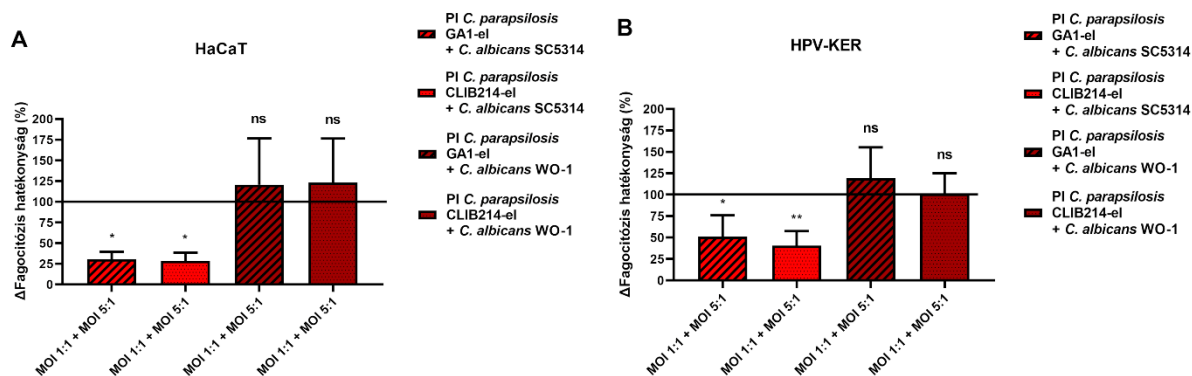
25. ábra. A *C. parapsilosis* (A, C) és *C. albicans* (B, D) fagocitózisa keratinocitákban. MOI=5:1. A bőrhámsejtek *Candida* fertőzése után a fagocitózist képkalkotó áramlási

citometriával mértük és mikroszkópos képeket készítettünk a fagocitózis pozitív keratinocitákról. Az ábrán reprezentatív képek láthatóak olyan helyzetekről, amikor a gombasejtek internalizálódtak a keratinocitákban. pHRod-CLIB214 a pHRodTM Reddel festett *C. parapsilosis* törzset és pHRod-SC5314 a pHRodTM Reddel festett *C. albicans* törzset jelöli. Ch01: fénymikroszkópos csatorna; Ch04: a pHRodTM Red emissziót detektáló csatorna; egyesített: a Ch01 és Ch04 fúziója.

Elektronmikroszkópos felvételekből ismert volt, hogy primer humán keratinociták rendelkeznek a *C. albicans* fagocitózisának képességével (Csátó és mtsai., 1990). Ezt az állítást erősítettük meg jelen munkánkban egy újabb módszert alkalmazva.

VI.8. Bőrhámsejtek internalizációs kapacitása felkészített immunitású körülményben

A pre-inkubáció mentes kísérleti körülményekből megmutatkozik, hogy bár a keratinociták nem fagocitózisra specifikus sejtek, mégis képesek internalizálni a *Candida* gombasejtet, főleg a sejtekhez kitapadni képes *C. albicans* törzsek esetében. A pre-inkubációs kísérletek során újból *C. parapsilosis* törzsekkel fertőztük a hámsejteket és lemosásuk után *C. albicans* törzsekkel történő fertőzés következett. Ezek után vizsgáltuk a keratinocita sejtek fagocitáló képességét a *C. albicans* gombasejtekre és összehasonlítottuk tapasztalható-e változás az egyébként is alacsony szintű fagocitózis képességben a nem felkészített immunitású kísérletekhez képest. Vizsgálatunkban azt az eredményt kaptuk, hogy nem történt változás a fagocitózis hatékonyságában *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsszel történt pre-inkubációt követő *C. albicans* WO-1 törzsszel való fertőzés hatására HaCaT és HPV-KER sejtvonalon sem. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* törzsekkel előinkubált hámsejtek *C. albicans* SC5314 törzsszel való fertőzést követően szignifikánsan alacsonyabb mértékben voltak képesek a gombasejtek internalizációjára mind HaCaT és HPV-KER sejtvonalon (26. ábra).



26. ábra. A HaCaT (A) és HPV-KER (B) keratinociták fagocitózisának hatékonysága a *C. albicans* ellen a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsekkel történő 24 órás pre-inkubációs fertőzést követően. A grafikonon a bőrhámsejtek *C. albicans* fertőzése után 1 órával mért fagocitózis változása látható az előinkubáció mentes méréshez képest. A fagocitózis mértékét az Amnis FlowSight® Imaging Flow Cytometer segítségével vizualizáltuk miután a gombát pHrodo™ Red festékkel jelöltük. Az x-tengelyen szereplő számok MOI arányokat (*Candida* sejt:keratinocita arány) jelentenek. *C. albicans* SC5314 törzs pre-inkubálva *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsszel (vonalas piros és pöttyös piros jelölések) és *C. albicans* WO-1 törzs pre-inkubálva *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsszel (vonalas rozsdabarna és pöttyös rozsdabarna jelölések). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (párosítatlan t-próba), összehasonlítva a pre-inkubációs fertőzés mentes sejtek fagocitózis képességével, $n=3$.

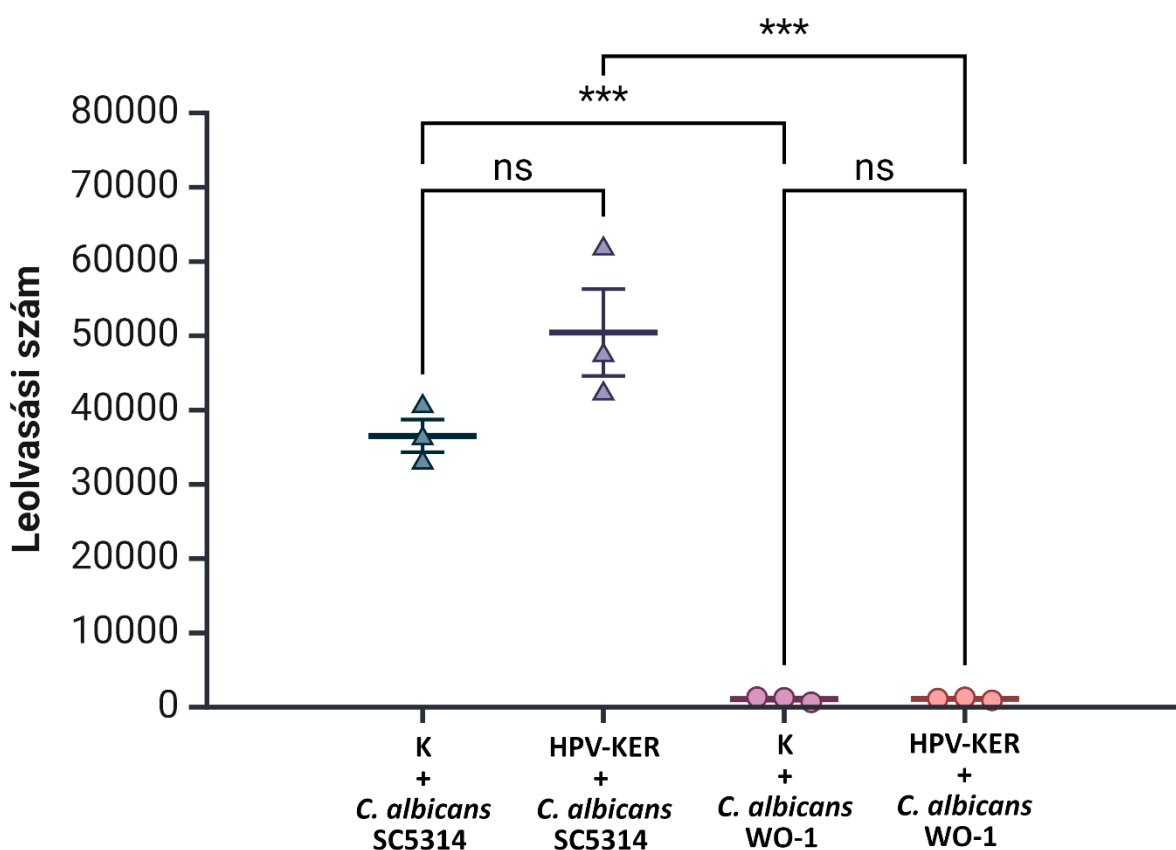
Összességében elmondható, hogy HaCaT és HPV-KER sejtvonalon is a *C. parapsilosis* törzsekkel végbemenő pre-inkubáció szignifikánsan csökkenti a *C. albicans* SC5314 törzsszel szemben a keratinocita sejtek fagocitáló képességét.

VI.9. *ECE1* génexpressziós szintek a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsekben

Ismert, hogy a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek a fertőzés során fontos virulenciafaktorokkal rendelkeznek a valódi hifaképző tulajdonságuk révén. Az egyik legfontosabb virulencia képesség azonban a kandidalizin szekréciója, amely képes pórusokat képezni a sejtfalban és így károsítani és elpusztítani a sejteket. A gombafertőzést követő károsodási vizsgálataink (LDH vizsgálat) felvázolták, hogy a két *C. albicans* törzs nem azonos mértékben károsítja a keratinocita sejteket (sem a HaCaT, sem a HPV-KER sejtvonal esetén). A *C. albicans* SC5314 törzs által okozott károsodás mértéke szignifikánsan nagyobb

bizonyult, mint a WO-1 törzsé. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a két törzs különböző szinten expresszálja az *ECE1* gént.

A két gombatörzsből végzett RNS-izolálás és RNS-szekvenálás különbséget mutatott ki az *ECE1* gén expressziójában. A keratinocita sejtek jelenléte a gombafertőzés során azonban egyik törzsben sem emelte az *ECE1* gén expresszióját. Ezzel szemben az *ECE1* gén alap expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt a *C. albicans* SC5314 törzsben, mint a WO-1 törzsben (27. ábra).



27. ábra. Az *ECE1* génexpressziójának mértéke 4 órával a *C. albicans* fertőzést követően (MOI=10:1, *Candida* sejt:keratinocita arány). Az x-tengelyen a kontroll (K) jelölés csak a gombát önmagában, a HPV-KER jelölés a keratinocita és gomba együttes jelenlétét jelöli. A *C. albicans* SC5314 törzs háromszöggel, a *C. albicans* WO-1 törzs karikával jelölve. Az y-tengelyen a szekvenálás során történő *ECE1* gén olvasási száma látható. *** $p < 0,001$; (Egytényezős ANOVA Tukey teszttel), $n=3$.

VI.10. A gomba-sejt kölcsönhatás következtében végbemenő génexpressziós és biokémiai változások

A humán keratinociták *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsszel történő fertőzése egy sor génexpressziós és biokémiai változást eredményez mind a gombában, mind a sejtben. A gombasejtek és a keratinocita sejtek találkozását követően számos génexpressziós szintje felül szabályozódik és ezen gének egy része közös keresztmetszetet mutat a két különböző törzsszel történő fertőzést követően. Esetünkben 21 gént találtunk, amelyek expressziós szintje megváltozott (Függelék 11. ábra). A felülszabályozott gének részt vesznek az adhézión folyamatokban, ROS stressz csökkentésében, anyagcsere szabályozásában (pl. glikolízis) és a transzporter aktivitás növelésében. *C. albicans* SC5314 törzs esetében emelkedett fémion transzport, fémion homeosztázis, fémion transzmembrán aktivitás és oxidoreduktáz aktivitás folyamatokat/funkciókat sikerült detektálni (Függelék 12. ábra). *C. albicans* WO-1 törzsnél az oxigényökökre adott válasz, az oxidoreduktáz és antioxidáz aktivitás mutatott emelkedett szintet (Függelék 13. ábra). Mindezek a folyamatok azt mutatják, hogy a gomba csökkenti a fertőzésnek való kitettség okozta stresszt és az anyagcsere, valamint virulencia változásain keresztül növeli a fertőzés hatékonyságát.

Ahogy korábbi vizsgálataink kimutatták, a citokinek és kemokinek szekréciójáért felelős gének felülszabályozódnak a keratinocita sejtek *Candida* gombasejtekkel való találkozását követően. A keratinocita sejtek RNS szekvenálásából kapott eredmények megerősítették az ELISA mérésekből kapott adatokat, amelyek szerint az IL-6 citokin és az IL-8 kemokin gének expressziós szintje megemelkedik a humán keratinocitákban a *C. albicans* gombafertőzést követően (Függelék 1. és 2. ábra). Különböző biológiai folyamatok, sejtkomponensek és molekuláris funkciók változnak attól függően, hogy *C. parapsilosis* vagy *C. albicans* fertőzés történik-e HaCaT vagy HPV-KER humán keratinocita sejtvonalakban. A HaCaT sejtek *C. parapsilosis* fertőzését követően a megváltozott oxigén- és fémionszintek szabályozásában részt vevő gének felülszabályozódnak. Emellett a sejtek a fertőzés ellen több transzmembrán transzporter aktivitásának növelésével küzdenek (Függelék 3. és 7. ábra). A HaCaT sejtekben a virulensebb *C. albicans* fertőzés a jelátvitelben részt vevő receptorok és citokin aktivitás nagyobb mértékű felül szabályozódásán keresztül hat, ami fertőzésre figyelmeztető funkciók emelkedését jelzi (Függelék 4. és 8. ábra). A HaCaT sejtekkel ellentétben a HPV-KER sejteknél *C. parapsilosis* fertőzést követően több olyan folyamat felülszabályozott, amely összefügg az epiteliális sejtproliferációval, mely a keratinocita sejtek differenciálódásának iniciációját mutatja. Ezenfelül főként a jelátvitelért és a ROS csökkentésért felelős folyamatok mutatnak

felül szabályozást (Függelék 5. és 9. ábra). Ezzel szemben *C. albicans* fertőzés hatására számos biológiai folyamat, sejtszintű és molekuláris funkció jelentősebb mértékben aktiválódik. Növekszik a kemotaxisban részt vevő sejtek aktivációja, a jelátviteli folyamatok szintje és a citokin/kemokin aktivitás, ezek egy erősebb fertőzésre figyelmeztető választ és gyulladásos folyamatok aktivációját reprezentálják. Ezen felül a citokinekhez és a sejtfalhoz kapcsolódó receptorok expressziója fokozódik. Valamint a bakteriális fertőzésekre jellemző sejtválaszok is emelkedettek (Függelék 6. és 10. ábra).

Ezen eredményeket figyelembe véve a HPV-KER sejtek a biológiai folyamatok, sejtkomponensek és molekuláris funkciók tekintetében érzékenyebbek a patogén *C. albicans* fertőzésre és gyulladásos folyamatok megindításában kapnak szerepet. A HPV-KER sejteknél tapasztalt folyamatok és funkciók jelentős hányada nem szabályozódik felül HaCaT sejtekben patogének általi fertőzést követően.

VI.11. A keratinocita sejtek antimikrobiális peptid válasza *Candida* gombafertőzést követően

A szakirodalomban több információ áll rendelkezésre a humán bőr keratinociták antimikrobiális peptidtermeléséről. A legtöbb esetben normál humán keratinociták vagy HaCaT sejtek állnak a kutatás középpontjában. Ezekben a vizsgálatokban stimulálatlan állapotban nem figyeltek meg antimikrobiális peptidtermelést, de UVB-sugárzást vagy LPS adagolást követően megnövekedett az antimikrobiális peptidtermelés, leggyakrabban a hBD-1, hBD-2 vagy LL-37 (Cathelicidin) szintjén (Ji Eun Kim és mtsai., 2005; Jun Seo és mtsai., 2001).

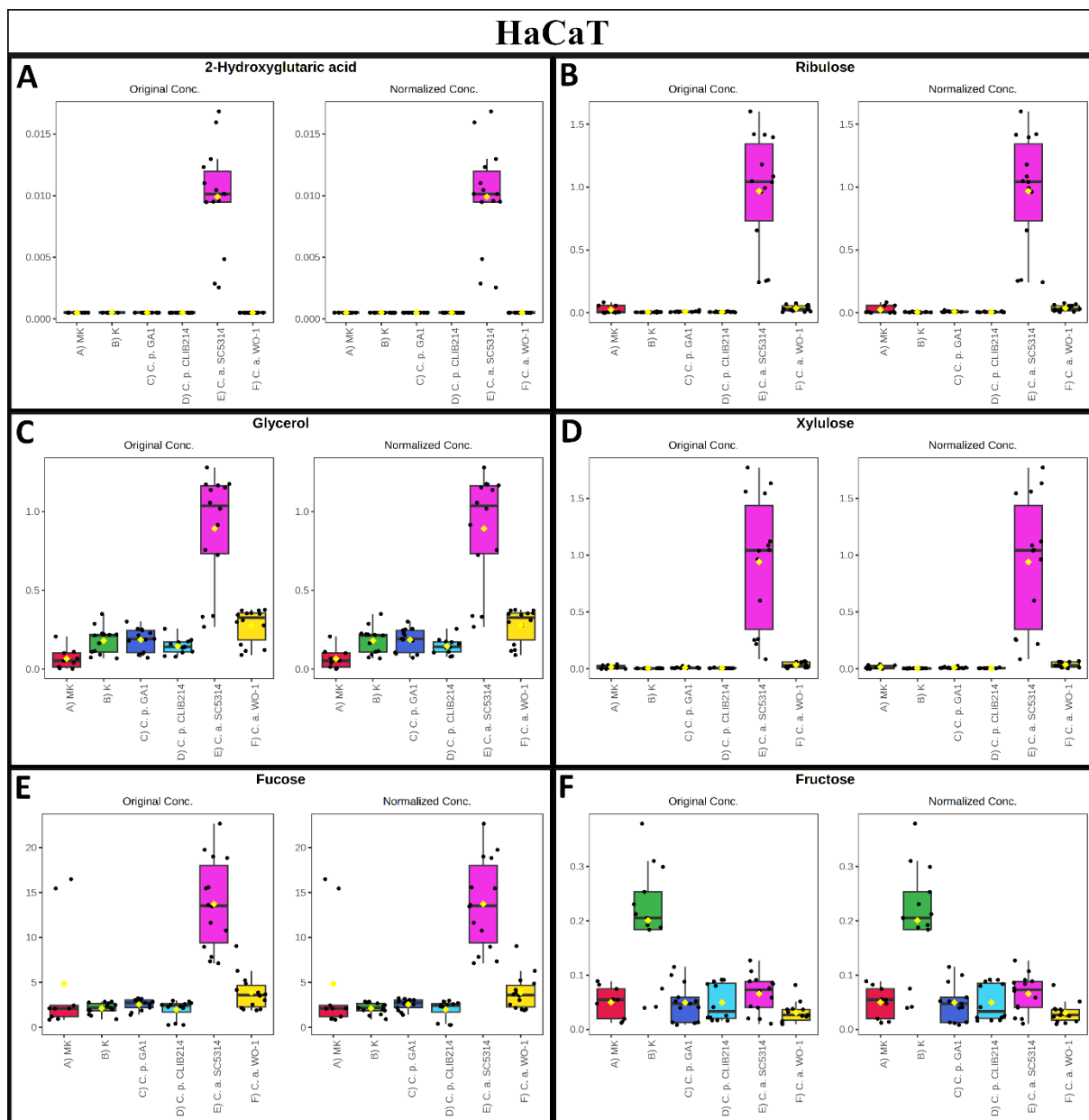
Tanulmányunkban a humán keratinocita sejtekből történő RNS izolálást követően RT-PCR és RNS szekvenálással vizsgáltuk a sejtek antimikrobiális peptidtermelő képességével kapcsolatos gének kifejeződését. Ezen vizsgálatok során sem a *C. albicans*, vagy *C. parapsilosis* fertőzés, sem az LPS vagy a kolekalciferol (UVB-sugárzás után keletkező intermedier) használata nem indukálta semmilyen antimikrobiális peptidtermelésért felelős gén kifejeződését sem HaCaT, sem HPV-KER sejtvonalon.

VI.12. A keratinociták metabolomikája *Candida* fertőzés után

A metabolitok olyan kismolekulák, amelyek biokémiai útvonalak szubsztrátjaiként, köztes termékeiként és termékeiként szolgálnak. A fertőzést követően a keratinocita sejtek

metabolizmusában olyan változások következnek be, amelyek segítik a sejtet a fertőzéssel szembeni ellenállásban és annak leküzdésében. A fertőzést követő metabolit termelésben bekövetkező változások a sejtek fertőzéssel szembeni ellenállási mechanizmusainak indikátorai lehetnek és az anyagcseréjük szintjén a fertőzés okozta változásokhoz való alkalmazkodást teszik lehetővé (Viano és mtsai., 2017).

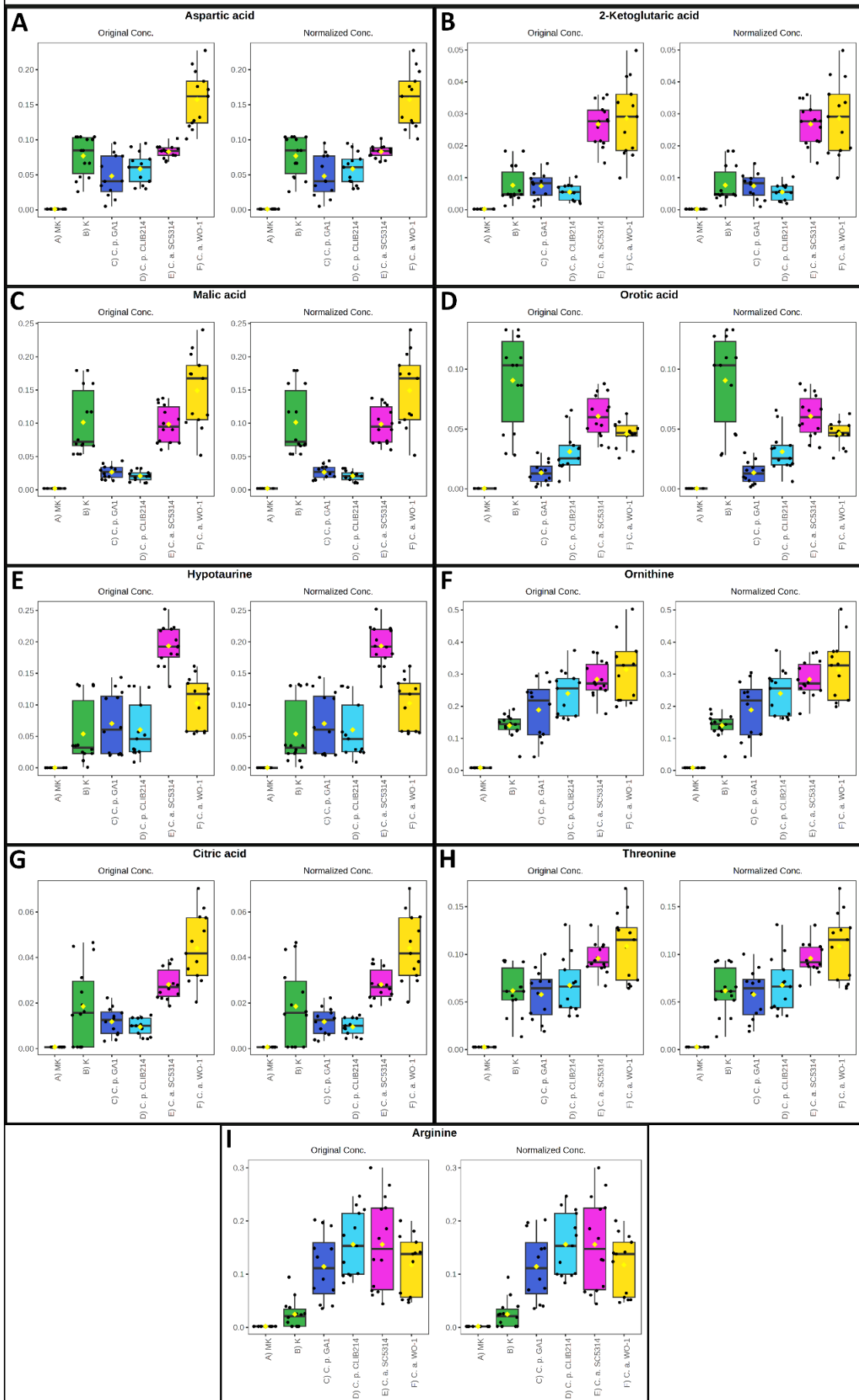
Számos metabolitot sikerült a sejtekből történő feltárással és GC-MS módszerrel azonosítani HaCaT sejtvonalon a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsekkel, valamint a *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsekkel való fertőzést követően. A *C. albicans* SC5314 fertőzésre szignifikánsan magasabb metabolit szekréció volt megfigyelhető az esetek nagy többségében. Ilyen magasabb szekréció volt tapasztalható a ribulóz esetében a *C. albicans* SC5314 törzsszel való fertőzés után, különösen az általunk vizsgált keratinocita sejtekben, melyek gyorsan osztódó sejtek, ahol magasabb pentóz-felhasználás jellemző, de egy virulensebb *Candida* törzsszel való fertőzés esetén a ribulóz felhalmozódása is előfordulhat a fertőzés következményeként. Hasonló tendencia figyelhető meg a glicerín esetében, amely hozzájárul a barrier funkciók fokozásához (Páyer és mtsai., 2018). A fruktóz esetében minden kezelésnél alacsonyabb szekréció mutatkozott a kontroll sejtekhez képest, ami összefügghet a fertőzés során megnövekedett glikolízissel, de a keratinocita differenciálódás elősegítéséhez is kapcsolható (Arul és mtsai., 2016). A *C. albicans* SC5314 törzsszel történő fertőzést követően a fukóz, a xilulóz és a 2-hidroxi-glutársav metabolitok is megnövekedett mennyiségben voltak jelen. A fukóz hozzájárulhat az immunológiai mikrokörnyezet kialakításához és a jelátvitelhez (Li és mtsai., 2018), a xilulóz a pentóz-foszfát útvonalon keresztül elősegítheti a glükóz-anyagcserét és hozzájárulhat az oxidatív stressz csökkentéséhez (Henderson és mtsai., 1999), míg a 2-hidroxi-glutársavnak jelentős szerepe lehet a jelátvitelben és más sejtfolyamatokban, szorosabb összefüggést mutatva az anyagcsere és az epigenetika között (Nadtochiy és mtsai., 2016) (28. ábra).



28. ábra. HaCaT sejtek által *Candida* fertőzést követően szekretált metabolitok. Az adott metabolit szekréciónak mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport). A gomba kontroll esetében nem tapasztaltunk metabolit szekréción, amely arra utalt volna, hogy történt metabolit felszabadulás a gombából. A: 2-hidroxi-glutársav, B: Ribulóz, C: Glicerín, D: Xilulóz, E: Fukóz, F: Fruktóz.

A HPV-KER sejtvonalban a kontroll csoporthoz képest magasabb szinten szekretálódott több metabolit is az f-próba határértéke (15.0) feletti értéken. A *C. albicans* SC5314 mellett a *C. albicans* WO-1 fertőzést követően több metabolit esetében is magasabb szekréciós szintet figyeltünk meg a kontroll csoporthoz képest. Ezek közé tartozott az aszparaginsav, amely csak a *C. albicans* WO-1 törzs fertőzése esetén mutatott nagyobb termelést a kontroll csoporthoz képest és emelkedett szintje gyulladásos folyamatok jelenlétére utal (Nordlind és mtsai., 1993). Az almasav csak a *C. parapsilosis* GA1 és CLIB214 törzsek fertőzése esetén volt jelen alacsonyabb mennyiségben a kontroll sejtekhez képest, ami általános aminosav-hiányra utalhat (Hsiao és mtsai., 2015). A hipotaurin antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, és nagyobb mennyiségben volt jelen *C. albicans* SC5314 törzzsel való fertőzést követően (Green és mtsai., 1990). A *C. albicans* törzsekkel való fertőzéskor megnövekedett citromsav és 2-glutársav szinteket figyeltünk meg, az előbbi apoptotikus és citotoxikus hatású (Giardino és mtsai., 2022), az utóbbi pedig a sejtprolifерáció keresztül a barrier funkciók fokozásában vesz részt (Si és mtsai., 2022). Az arginin termelés minden *Candida* fertőzésre megnövekedett a kontroll sejtekhez képest, amely számos hatással rendelkezik a szervezetben, többek között az immunfunkció, a sebgyógyulás, a hormonszekréció, az érrendszeri tónus, az inzulinérzékenység és az endotél funkció modulációjában (Cancer és mtsai., 2004). Az arginin a nitrogén-oxidtól független és függő útvonalakon keresztül közvetíti hatásait. A treonin emelkedett szekréciós szintet mutatott *C. albicans* törzsekkel való fertőzést követően, amely utal adhézis folyamatok jelenlétére és keratinocita sejt differenciációra (McMullan és mtsai., 2003). Az ornitin termelődés hasonlóan a treonin esetéhez *C. albicans* fertőzés után mutat emelkedett mértékű szekréciót. Az ornitin emelkedett jelenléte a bőrhámsejtek védekező funkciójához kapcsolható, hiszen a kollagén szintézis prekursora és fontos szerepet tölt be a hámsejtek metabolizmusában, különösképp poliaminok szintézisében (Sivashanmugam és mtsai., 2017). Az orotsav esetében a kontroll csoporthoz képest minden gombás fertőzés hatására csökkent ezen metabolit mennyisége a sejtekben. Az orotsav fontos szerepet tölt be a folsav és a B12 vitamin metabolizmusának beindításában (West és mtsai., 2017). *Candida* fertőzés hatására a kisebb mértékű szekretálódása utalhat ezen metabolikus folyamatok megerősödésére, melyek szerepet játszanak a hámsejt regenerációban, az epidermális barrier funkciók megerősítésében, DNS javító mechanizmusokban és kollagén termelésben (29. ábra).

HPV-KER



29. ábra. A HPV-KER sejtek *Candida* fertőzést követő metabolit szekréciója. Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport). A gomba kontroll esetében nem tapasztaltunk metabolit szekréciót, amely arra utalt volna, hogy történt metabolit felszabadulás a gombából. A: Aszparaginsav, B: 2-ketoglutarát, C: Malát, D: Orotsav, E: Hipotaurin, F: Ornitin, G: Citromsav, H: Treonin, I: Arginin.

VI.13. Keratinocita metabolomika felkészített immunitású állapotban

A keratinociták metabolomikájára vonatkozó kísérleteink kiterjedtek a felkészített immunitású hámsejtek metabolikus változásainak felderítésére. Ebben az esetben is a hámsejtek *C. parapsilosis* törzsekkel történő fertőzése után a gombát lemostuk a sejtekről és *C. albicans* törzsekkel fertőztük meg a hámsejteket. Ezután a sejtek feltárását követően derítettük fel a szekretált metabolitok terén történt változásait a nem felkészített immunitású fertőzésekkel összehasonlítva.

HaCaT keratinocita sejtek élő *C. parapsilosis* GA1 törzsszel végzett pre-inkubációs fertőzését követően 11 metabolit szekretálódását tudtuk kimutatni *C. albicans* törzsekkel történt fertőzés után (30. ábra). Ezek közül a laktát *C. albicans* SC5314 törzs általi fertőzés hatására termelődött jelentősebb mértékben a kontroll csoportokhoz képest. Az emelkedett laktát szint a megnövekedett celluláris respirációval, glükóz termeléssel, gyulladásos válasz regulációjával és molekuláris szignalizációs folyamatokkal hozható kapcsolatba (Manosalva és mtsai., 2022). A glicerín és foszforsav nagyon közeli csúcsban volt detektálható a GC-MS mérést követően, így pontosan nem tudtuk validálni melyik metabolit megemelkedett termelése mutatkozik meg a fertőzés hatására. Ezen metabolitok emelkedett szintjei szintén a *C. albicans* SC5314 törzs esetében jelentek meg. A glicerín nagyobb mértékű akkumulációja barrier funkciók megerősítésében kap szerepet, míg a foszforsav emelkedett jelenléte antimikrobiális és citotoxikus aktivitással bír (Akbas és mtsai., 2013). A xilóz *C. albicans* SC5314 törzs hatására szekretálódott nagyobb mértékben és a hámsejtek nagyobb vízretenciós kapacitásában kap szerepet (Huntley és mtsai., 2018). A treonin *C. albicans* fertőzés hatására kisebb mértékben volt jelen, mint a kontroll csoport esetében. A nagyobb treonin felhasználás utalhat a

keratinociták megnövekedett differenciációjára, valamint adhéziós folyamatok erősebb jelenlétére (McMullan és mtsai., 2013). Hasonló a helyzet az azelainsav esetében, ami *C. albicans* törzsekkel való fertőzés hatására mutatott csökkent mennyiséget a feltárást követően és szintén szerepet játszhat a korai/kései keratinocita differenciáció modulálásában (Sieber és mtsai., 2013). *C. albicans* SC5314 törzzsel való fertőzés után csökkent szekretálódást mutatott a sztearinsav a kontroll csoporthoz képest, ami a bőr barrier funkcióinak hiányos meglétére utalhat (Ananthapadmanabhan és mtsai., 2013) (Függelék 14. ábra). *C. albicans* SC5314 törzzsel történt fertőzés hatására további metabolitok szintje is megemelkedett, úgy mint a trehalóz, hipotaurin, taurin és 5-oxoprolin (30. ábra). A trehalóz és hipotaurin antioxidáns tulajdonságán keresztül a szabad gyökök okozta károsodás csökkentéséért felel (Bucak és mtsai., 2007), az 5-oxoprolin a prolin szintézis prekursora és emelkedett jelenléte a keratinocita differenciációt segítheti prolinon keresztül (Karen-Ng és mtsai., 2021), illetve a taurin antioxidáns tulajdonságán túl védi a hámsejteket az UV-sugárzás által okozott stresszel szemben és a sejtproliferáció, gyulladásos folyamatok és kollagén genezis szintjén jelentős a szerepe (Bucak és mtsai., 2007). A mirisztinsav *C. albicans* fertőzés hatására bekövetkező csökkent mennyisége központi metabolikus folyamatok csökkent működésére utal (Függelék 16. ábra).

A HaCaT keratinocita sejtek élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzzsel végzett preinkubációs kísérletében összesen 13 metabolit szekréciója mutatott megváltozott mértékű termelődést a kontroll csoportokhoz képest (30. ábra). Ezen metabolitok közül hasonlóan a *C. parapsilosis* GA1 törzzsel való előinkubációs fertőzésnél kapott eredményekhez a glicerín/foszforsav, trehalóz, 5-oxoprolin, hipotaurin és laktát egy közös metszetet képeznek és az összes esetben a virulensebb *C. albicans* SC5314 törzs általi fertőzés hatására mutattak emelkedett termelődést. Hasonlóan az előző metabolitokhoz a piruvát, valin, izoleucin és cisztein szintén SC5314-es *C. albicans* törzs fertőzését követően jelentek meg nagyobb mértékben a kontroll csoporthoz képest. A piruvát jelenléte összefüggésbe hozható antimikrobiális és kollagén szintézist stimuláló tulajdonságokkal (Schwörer és mtsai., 2021; Goodwine és mtsai., 2019). A valin a kollagén termelés egyik kulcs szereplője, ennél fogva a sebgyógyulásban, illetve a károsult sejtek/szövetek növekedésében és javításában kap támogató szerepet (Gao és mtsai., 2021). Az izoleucin antioxidatív és gyulladás ellenes folyamatokért felel (Wu és mtsai., 2022). Továbbá a cisztein antioxidatív tulajdonságán túl kollagén szintézisben kapott szerepén keresztül fejt ki hatását (Sameem és mtsai., 2019) (Függelék 15. ábra). Inozitol és lizin metabolitok szekretálódtak *C. albicans* SC5314 törzs fertőzésének

hatására. Az inozitol a bőrhámsejtek növekedésében (Gordon és mtsai., 1988), a lizin a kollagén képzésben, illetve a hámsejtek kalcium felvevő képességében kapnak segítő szerepet (Yamauchi és Sricholpech, 2012; Civitelli és mtsai., 1989). A sztearil alkohol (oktadekanol) és a palmitin sav a kontroll sejtekhez képest kisebb szekréciót mutattak *C. albicans* törzsekkel történt fertőzés hatására. A sztearil alkohol csökkent szintje a bőr barrier funkciójának alulműködésére utal (Aungst és mtsai., 1986), ugyanezen funkció csökkenését jelzi a palmitinsav alacsony szintje a gombafertőzés hatására, hiányában a bőr barrier képességének gyengült működéséről beszélhetünk (Mieremet és mtsai., 2019) (Függelék 17. ábra).

HPV-KER sejtvonalon a *C. parapsilosis* GA1 pre-inkubációs fertőzéses állapot esetében több megemelkedett szekréciójú metabolittal is megfigyelhető volt közös metszet a HaCaT sejtvonalon mért eredményekkel. Ilyen volt például a trehalóz és a hipotaurin (30. ábra). Ezen két metabolit termelődésének mértéke HPV-KER sejtek esetén is *C. albicans* SC5314 törzsszel történő fertőzést követően mutatott emelkedett szintet. Azonban voltak olyan közös metszetbe sorolható metabolitok, mint például a taurin és 5-oxoprolin, melyek esetében a gombás fertőzés csökkentette a mennyiségüket a sejtekben, míg HaCaT sejtvonalon pont az ellenkezője volt megfigyelhető. Eddig nem detektált metabolitok is megjelentek HPV-KER sejtek esetében, ilyen a szintén túl közeli csúcsokban megjelenő, így nehezen elválasztható arginin/ornitin, mely *C. albicans* SC5314 törzs fertőzésének hatására mutatott emelkedett szekretálódást, továbbá a fumársav, amely jelentősen visszaesett termelődés szempontjából gombás fertőzés hatására. Az arginin szerepei közé tartozik a sejtek antioxidáns képességének megemelése, a kollagén termelés stimulációja, a bőrsejtek hidratációjának megemelése és a bőr barrier funkciójának védelme (Cancer és mtsai., 2004). Ezzel szemben az ornitin kulcsfontosságú a keratinocita sejtek metabolizmusában úgy, mint az urea, poliaminok és kollagén szintézis (Sivashanmugam és mtsai., 2017). A fumársav csökkent szintje a gombás fertőzés során gyengébb mértékű gyulladás ellenes és antioxidatív hatásról árulkodik (Kaur és mtsai., 2020) (Függelék 18. ábra).

A HPV-KER keratinocita sejtek *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel való előinkubációs fertőzés során kapott metabolomikai változásokat tekintve, több metabolit emelkedett/csökkent jellege közös metszetbe hozható a *C. parapsilosis* GA1 törzsszel történt előinkubációs fertőzésben tapasztaltakkal (30. ábra). A trehalóz, hipotaurin (Függelék 19. ábra), valin és ornitin (Függelék 20. ábra) ebben az esetben is nagyobb szekréciót mutatott a kontroll csoporthoz képest, hasonlóan a másik *C. parapsilosis* törzsszel történt előinkubációs kísérlethez vagy a HaCaT sejtvonalon tapasztalt felkészített immunitású körülmények közötti metabolit termelést tekintve. A taurin, fumársav, 5-oxoprolin esetében a kontroll csoporthoz képest

alacsonyabb metabolit szekretálódás volt megfigyelhető ugyanúgy, mint a HPV-KER sejtek *C. parapsilosis* GA1 törzs pre-inkubációjával kapott eredmények tekintetében, de ellentétesen mint a HaCaT sejtek esetén kapott eredmények esetében. Új szekretált metabolitként jelent meg a malát (Függelék 19. ábra) és a putreszcín (Függelék 20. ábra), melyek a kontroll csoporthoz képest kisebb mértékben mutattak termelődést *C. albicans* fertőzést követően. Az almasav csökkent mennyisége arra utal, hogy jelenlétének hiányában nem lazul meg az a sejt-sejt kapcsolat, ami a halott sejteket tartja össze a bőrréteg külső felszínén, valamint csökken az általa okozott citotoxikus és antiproliferatív hatás a keratinocita sejtekben, a sejtciklus progressziójának a gátlása és a programozott sejthalál kiváltás hiányának köszönhetően (Hsiao és mtsai., 2015). A putreszcín alacsonyabb szintű termelődésének köszönhetően csökkent mértékben következik be a keratinocita sejtek differenciációja és érése, illetve kevésbé képes a sejt a DNS struktúra szabályozására és a sejtmembrán funkciók megerősítésére (Shridharan és mtsai., 2020; Ginty és mtsai., 1989; Farriol és mtsai., 2001) (Függelék 19. ábra).

	HaCaT PI GA1		HPV-KER PI GA1		
	Xilóz Treonin Azelaínsav Sztearínsav Mirisztinsav Taurin				
HaCaT NPI	HaCaT NPI		HPV-KER NPI	HPV-KER NPI	
2-hidroxi-glutársav Ribulóz Xilulóz Fukóz Fruktóz	Glicerín	Laktát Trehalóz Hipotaurin 5-oxoprolin	Taurin Fumársav 5-oxoprolin Trehalóz	Arginin/Ornitin Hipotaurin	Aszparaginsav 2-ketoglutarát Malát Orotsav Citromsav Treonin
	Piruvát Valin Allo-izoleucin/Izoleucin Cisztein Inozitol Lizin Oktadekanol Palmitinsav		Almasav Putreszcín Valin		
	HaCaT PI CLIB214		HPV-KER PI CLIB214		

30. ábra. A HaCaT és HPV-KER keratinociták metabolit termelésének összefoglaló ábrája nem felkészített immunitású (NPI) és felkészített immunitású (PI) állapotban. Kék szín: A kontroll csoporthoz képest csökkent metabolit termelés. Piros szín: A kontroll csoporthoz képest legalább az egyik *C. albicans* törzs esetén emelkedett metabolit termelés.

VII. Összefoglalás

A leginkább immunhiányos betegeket érintő invazív *Candida* fertőzések az egész világra kiterjedő komoly egészségügyi problémát jelentenek (Lamoth és mtsai., 2018). A szakirodalomból is jól ismert *C. albicans* az invazív kandidiázisok kialakulásában egy fontos szereplő, emellett a nem *albicans* fajok által okozott szisztémás fertőzések száma az elmúlt években növekvő tendenciát mutat (Függelék 21. ábra). Ilyen nem *albicans* faj a *C. parapsilosis*, amely napjainkban egyre nagyobb számban felelős a szisztémás, az egész szervezetet érintő *Candida* fertőzés kialakulásáért (Pfaller és mtsai., 2011). Ezen betegségekre leginkább a koraszülöttek, immunszuppresszált egyének és idős korúak a legveszélyeztetettebb csoportok (Pammi és mtsai., 2013). A szakirodalomban széles körben tárgyalt *C. albicans* kapcsán már elég jó betekintést nyertünk ezen gomba által okozott kórképekbe, azonban a *C. parapsilosis* fertőzéssel kapcsolatos információk mennyisége elmarad a *C. albicans*szal szemben. Továbbá a szakirodalomban kevésbé található olyan publikáció, amely az élő modellhez leginkább hasonlító felkészített immunitást írja le, ahol bemutatják, hogy a kommenzalista gomba jelenléte miként befolyásolja a gazdaszervezet bőrsejtjeit egy patogén gombás fertőzés során. A humán bőrfelület az első immunológiai frontvonal a patogén gombák által okozott támadások elhárítására. Ebben a stratum corneum réteg alatt elhelyezkedő epidermális rétegben megtalálható keratinocita sejtek kulcsfontosságú szerepet játszanak. A szakirodalomban több tudományos cikk lelhető fel mikróba/vírus-keratinocita interakciókról, de gomba-keratinocita interakcióval kapcsolatban leginkább csak *C. albicans* fajjal található adat. Ezen publikációk nem túl mélyrehatóan és a felkészített fertőzés nélkül tárgyalnak a gazda-patogén interakciókról.

Ennélfogva munkánk során célul tűztük ki, hogy behatóbban megvizsgáljuk a keratinocita sejtek és *Candida* fajok között végbemenő interakciót károsodás, citokin/kemokin termelés, adhézión és fagocitáló képesség, antimikrobiális peptidtermelés és metabolikus változások szintjén. Annak érdekében, hogy szélesebb képet kapjunk ezen fertőzésekről, *C. parapsilosis* és *C. albicans* esetében is 2-2 klinikai izolátumot használtunk a kísérleteink során, emellett kétféle keratinocita sejtvonallal dolgoztunk. Ezen vizsgálatokat két szinten végeztük, az első szint egy egyszerű fertőzés keretében valósult meg, ahol a keratinocita sejtek először találkoztak *Candida* gombával, a második szinten a kommenzalista gombával felkészített

immunitású keratinocita sejtek reakcióját mértük fel patogén gombás fertőzés hatására. Ezek alapján vizsgálataink főbb eredményei a következők:

1. A keratinocita sejtekkel szemben a vizsgált *Candida* törzsek közül a *C. albicans* SC5314 törzs okozza a legnagyobb károsodást, kisebb mértékben HaCaT sejtek, nagyobb mértékben HPV-KER sejtek esetén

Első körben HaCaT és HPV-KER sejteket fertőztünk *C. parapsilosis* és *C. albicans* törzsekkel. Megfigyelhető volt, hogy a *C. albicans* törzsek, közülük is az SC5314 törzs esetében szignifikánsan magasabb károsodás figyelhető meg a hámsejteken a kontroll csoporthoz viszonyítva dózisfüggő módon. A legnagyobb halálozás az érzékenyebbnek bizonyuló HPV-KER sejteknél volt megfigyelhető. Ez a tendencia 24 és 12 órás fertőzésnél is látható volt. *C. parapsilosis* törzsekkel történő hosszabb időtartamú, 48 órás fertőzés esetében sem detektáltunk a kontroll csoporttól eltérő mértékű sejthalálozást. *C. albicans* törzsek 48 órás időtartamú fertőzését követően az érzékenységi mutató felcserélődött, a HaCaT sejtek nagyobb sejthalálozást mutattak alacsonyabb dózisú fertőzés hatására, a HPV-KER sejtek LDH felszabadulása azonban nem változott a 24 órás fertőzéshez képest. Felkészített immunitású vizsgálat során a HPV-KER sejtek esetén volt megfigyelhető csökkenés a sejtpusztulásban alacsonyabb fertőző dózison *C. albicans* SC5314 törzsnél a nem felkészített immunitású fertőzéshez képest. Ugyanakkor HPV-KER sejteknél a felkészített immunitáshoz szükséges *C. parapsilosis* törzsekkel történő előinkubáció dózisfüggése mutatkozik meg a károsodásban, alacsonyabb dózisú *C. albicans* SC5314 törzsszel való fertőzést követően. Ezzel bizonyítottuk, hogy mindkét *C. albicans* törzs virulensebb és jobban károsítja a keratinocita sejteket a *C. parapsilosis* törzsekhez képest. Továbbá a felkészített immunitás tekintetében alacsonyabb dózisú *C. albicans* fertőzés kedvező lehet a hámsejtek károsodására nézve.

2. A HaCaT és HPV-KER sejtek IL-6 és IL-8 termelése jellemző *C. albicans* törzsekkel való fertőzést követően

A HaCaT sejtvonal esetén mindkét *C. albicans* törzs fertőzése szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 termelődéshez vezet, míg HPV-KER sejtvonalnál a *C. albicans* SC5314 törzs által okozott fertőzés eredményezett szignifikánsan nagyobb IL-6 és IL-8 szekretálódást a kontroll csoporthoz képest. A felkészített immunitású vizsgálatnál általános konzekvencia nem vonható le, a HaCaT sejtek IL-6 és IL-8 termelése különböző pre-inkubációs fertőzés hatására mutat emelkedett szintet a nem felkészített immunitású esetben tapasztaltakhoz

képest. Ezzel szemben a HPV-KER sejteknél főleg az élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzzsel végzett pre-inkubáció után mutatkozott emelkedett IL-6 és IL-8 termelés mindkét *C. albicans* törzs fertőzését követően. Ezen vizsgálatban megerősítettük, hogy a *C. albicans* törzsek okozta fertőzés emelkedett IL-6 és IL-8 termelődést eredményez, valamint felkészített immunválasznál több esetben is fennáll a nem felkészített immunitású körülménynél mért IL-6 és IL-8 termeléshez képest magasabb szintű szekréció ezen citokin és kemokin esetében, tehát a kommenzalista gomba jelenléte előnyhöz tudja juttatni a hámsejtet egy *C. albicans* fertőzést követő citokin/kemokin szekréció tekintetében.

3. A *C. albicans* törzsek valódi hifaképző sajátosságukon keresztül hatékonyabb kitapadó képességgel bírnak a keratinocita sejtekhez

A *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek adhéziós hatékonysága szignifikánsan magasabb mértékű mind HaCaT és HPV-KER keratinociták esetében. Ezen eredményesebb kötődés valódi hifaképző tulajdonságuknak és magasabb adhezin expressziójuknak tulajdonítható. A *C. parapsilosis* törzsek ezen tulajdonságok hiányában csak minimális mértékben képesek kitapadni keratinocita sejtekhez akár 1 órás, akár 24 órás fertőzést követően. A felkészített immunitású körülmény semmilyen esetben nem ront és nem is javít a *C. albicans* törzsek adhéziós képességében HaCaT vagy HPV-KER keratinocitákhoz.

4. A keratinocita sejtek fagocitáló képessége minimális, de magasabb *C. albicans* törzsekkel szemben, mint *C. parapsilosis* törzseknél

A keratinociták, mivel nem tipikusan internalizációra képes sejtek, így ezen képességük csak néhány százalékra tehető egy adott fertőzési dózisu gombás fertőzésben. A *C. albicans* törzsekkel szembeni fagocitáló képesség azonban szignifikánsan nagyobb, mint a *C. parapsilosis* törzseknél tapasztalható. Ez magyarázható az adhéziós vizsgálatban tapasztaltakkal, a *C. albicans* törzsek valódi hifaképző tulajdonságukon keresztül hatékonyabban képesek kapcsolódni a keratinocita sejtekhez és ezen asszociáció megléte szükséges az internalizáció megvalósulásához. Felkészített immunitású esetben a *C. albicans* SC5314 törzzsel szembeni fagocitáló képesség szignifikánsan visszaesett a nem felkészített immunitás eseténél tapasztalathoz képest, míg a *C. albicans* WO-1 törzsnél nem mutatott változást. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy *C. albicans* SC5314 törzzsel szemben a fagocitáló képesség hátrányt szenved el felkészített immunitásban történő fertőzést követően.

5. A keratinocita-gomba interakció nem változtatja meg az *ECE1* génexpressziót, nem okoz antimikrobiális peptidtermelést és biológiai funkciók tekintetében a HPV-KER sejtek nagyobb érzékenységet mutatnak *C. albicans* fertőzésre

A *C. albicans* törzsek egyik legfontosabb virulencia faktora a kandidalizin termelés, mely az *ECE1* gén expressziójának fokozódásán keresztül valósul meg. A gomba RNS-ének szekvenálása segítségével sikerült megállapítani, hogy a keratinocita sejtekkel történő interakció nem emeli az *ECE1* gén expresszióját, hanem alap állapotában mutat kifejeződést, még hozzá szignifikánsan magasabb mértékben a *C. albicans* SC5314 törzs esetében a *C. albicans* WO-1 törzshöz képest. Kutatásaink kiterjedtek a keratinocita sejtek antimikrobiális peptidtermelő képességére, azonban egyik sejtvonal esetében és *C. parapsilosis* valamint *C. albicans* törzsek által okozott fertőzés hatására sem tudtunk detektálni humán AMP-ket. A *Candida* gomba és keratinocita sejt RNS kivonását követő RNS szekvenálási folyamatból szélesebb körű bioinformatikai analízist végeztünk el és arra a következtetésre jutottunk, hogy a *C. albicans* törzsekkel végzett fertőzés során olyan gének szabályozódtak felül, amelyek segítik a gomba kitapadó képességét, szabadgyök okozta stressz csökkentését, anyagcseréjük és transzporter aktivitásuk megnövekedett szabályozását. Továbbá a hámsejtek oldaláról *C. albicans* fertőzést követően a HaCaT sejtekben több folyamat alulszabályozott, míg HPV-KER keratinocitáknál pont az ellenkezője. Ezek alapján elmondható, hogy a HPV-KER keratinocita sejtek érzékenyebben reagálnak egy *Candida* fertőzésre, mivel több biológiai folyamat is erősebben felül szabályozódik bennük, mint a HaCaT sejtekben, olyanok mint a jelátvitel, ROS stressz csökkentés és citokin/kemokin termelés.

6. A virulensebb *C. albicans* törzsek általi fertőzés nagyobb mértékű változásokat indít a keratinocita sejtek metabolikus aktivitásában

Nem felkészített immunitású fertőzések esetén HaCaT sejtvonalon a *C. albicans* SC5314 és kisebb mértékben a WO-1 törzs által okozott fertőzések eredményeztek jelentősebb metabolit termelést a sejtekben a fertőzetlen kontroll csoporthoz képest. Ezek a metabolitok összességében szerepet kapnak a keratinocita sejtek differenciációjának segítésében, szignál transzdukciós folyamatok és központi biokémiai útvonalak felerősítésében és barrier funkciók megerősítésében. A HPV-KER sejtek esetén a *C. albicans* SC5314 mellett a WO-1 törzs is jelentősebb metabolit szekretálódást okozott a HaCaT sejteknél tapasztaltakhoz képest. Az itt termelődött metabolitok hozzájárulnak a keratinocita sejtek differenciációjához és adhéziós folyamatokhoz, segítik a kollagén szintézist, antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek és gyulladásos folyamatok kialakításában vesznek részt. A felkészített immunitású fertőzések esetében HaCaT sejtvonalon a glicerinnel termelés határozottan közös metszetbe hozható, tehát mind a felkészített és nem felkészített immunitású fertőzésben megjelenik *C. albicans* SC5314 törzs jelenlétére és a barrier

funkciók támogatásában van szerepe. Több újonnan megjelenő metabolit termelődés is tapasztalható, melyek antioxidáns, gyulladásos, adhézis, sejt differenciációs, kollagén szintézis és barrier funkcióhoz rendelhető tulajdonságokkal rendelkeznek. Felkészített immunitású fertőzés során HPV-KER sejtek esetén az almasav, arginin, ornitin és hipotaurin szekréciója közös metszetbe hozható a nem felkészített immunitású fertőzésekkel. Ezek a metabolitok szerepet kapnak antioxidáns, kollagén szintézis segítő, károsodott sejt javítási és sejt differenciációs folyamatokban.

Ezek az eredmények elősegítik a keratinocita sejtek *Candida* gombával történő interakcióinak behatóbb megismerését. Sikeresen kimutattuk, hogy a *C. albicans* törzsekkel szemben a sejtek károsodása magasabb, IL-6 és IL-8 citokin/kemokin termelésre nézve a sejtek szignifikánsabb szekrécióval rendelkeznek, gomba-sejt kitapadó képességük szignifikánsabb, valamint a sejt internalizációs képessége nagyobb mértékű, mint a *C. parapsilosis* törzsek esetében. Mélyebben felderítettük a gomba-sejt interakcióból származó felülszabályozott géneket, biológiai folyamatokat és azok funkcióit mind a gomba és sejt oldalról. Továbbá részletesen megvizsgáltuk a keratinocita sejtek metabolikus változásait *Candida* fertőzésre és ezen metabolit termelődésbeli változások funkcionális szerepét. Ezen ismeretek hozzájárulnak bőrünk jobb megismeréséhez és hatékonyabb védekezési mechanizmusok kialakításához patogén gomba fertőzéssel szemben.

VIII. Summary

Invasive *Candida* infections affecting immunosuppressed patients are a serious health problem worldwide (Lamoth et al., 2018). *C. albicans*, well known from the literature, is an important participant in the development of invasive candidiasis, but the number of systemic infections caused by non-*albicans* species has been increasing in recent years (Supplementary figure 21.). One such non-*albicans* species is *C. parapsilosis*, which is nowadays increasingly responsible for the development of systemic, whole-body *Candida* infections (Pfaller et al., 2011). The most vulnerable groups for these diseases are premature infants, immunosuppressed individuals and the elderly (Pammi et al., 2013). Related to the *C. albicans* -which is widely discussed in the literature- we gained good insight into the pathologies caused by this fungus, but the amount of information on *C. parapsilosis* infection is inferior to the *C. albicans*. Furthermore, there are fewer publications in the literature describing the primed immunity that most closely resembles a living model, i.e. where the presence of the commensal fungus affects host skin cells during a pathogenic fungal infection. The human skin surface is the first immunological frontline to fend off attacks by pathogenic fungi. In this, keratinocyte cells, found in the epidermal layer beneath the stratum corneum, play a key role. There are several scientific articles in the literature on microbe/virus-keratinocyte interactions, but data on fungus-keratinocyte interactions are mostly limited to *C. albicans*. These publications do not discuss host-pathogen interactions in great depth and primed immunity of the host skin cells.

Hence, our work aimed to investigate in more detail the interaction between keratinocyte cells and *Candida* species at the level of damage, cytokine/chemokine production, adhesion, phagocytic ability, antimicrobial peptide production and metabolic changes. In order to get a broader picture of these infections, we used 2-2 clinical isolates of both *C. parapsilosis* and *C. albicans* in our experiments, and we also used two different keratinocyte cell lines. These studies were performed in two levels, the first level was performed in the context of a simple infection where keratinocyte cells first encountered *Candida* fungus, the second level measured the response of keratinocyte cells primed with commensal fungus to pathogenic fungal infection. On this basis, the main results of our studies are as follows:

1. Of the *Candida* strains tested, in contrast to keratinocyte cells, *C. albicans* strain SC5314 causes the greatest damage to a lesser extent in HaCaT cells and more significantly in HPV-KER cells

First, HaCaT and HPV-KER cells were infected with *C. parapsilosis* and *C. albicans* strains. It was observed that *C. albicans* strains, including the SC5314 strain, showed significantly higher damage on epithelial cells in a dose-dependent manner compared to the control group. The highest mortality was observed in HPV-KER cells, which were found to be more susceptible. This trend was also seen at 24 and 12 hours of infection. No greater cell death than the control group was detected in the case of longer duration of infection with *C. parapsilosis* strains, the infection period was 48 h. After 48 h of infection with *C. albicans* strains, the sensitivity index was reversed, HaCaT cells showing higher cell death following lower dose infection, however HPV-KER cells showed unchanged LDH release compared to 24 h of infection. In primed immunity assay, HPV-KER cells showed a reduction in cell death at lower infection dose for *C. albicans* strain SC5314 compared to non-primed infection. However, HPV-KER cells showed a dose-dependence of priming on damage following infection with a lower dose of *C. albicans* strain SC5314. Thus, we demonstrate that both *C. albicans* strains are more virulent and damage keratinocyte cells more, compared to *C. parapsilosis* strains. Furthermore, in terms of primed immunity, lower doses of *C. albicans* infection may be beneficial for epithelial cell damage.

2. HaCaT and HPV-KER cells produce IL-6 and IL-8 after infection with *C. albicans* strains

In the HaCaT cell line, infection with both *C. albicans* strains leads to significantly higher IL-6 and IL-8 production, whereas in the HPV-KER cell line, infection with *C. albicans* SC5314 resulted in significantly higher IL-6 and IL-8 secretion compared to the control group. No overall consistency can be drawn when examining primed immunity, with HaCaT cells showing elevated levels of IL-6 and IL-8 production under different pre-incubation infection effects compared to those, observed in the non-primed case. In contrast, HPV-KER cells showed elevated IL-6 and IL-8 production mainly after pre-incubation with live *C. parapsilosis* strain CLIB214 following infection with both *C. albicans* strains. In this study, we confirmed that infection with *C. albicans* strains results in elevated IL-6 and IL-8 production, and that in several cases of primed immune response there is a higher level of secretion of these cytokines and chemokines compared to IL-6 and IL-8 production in the non-primed condition, thus the presence of the commensal fungus may confer an

advantage to the epithelial cell in terms of cytokine/chemokine secretion following *C. albicans* infection.

3. *C. albicans* strains have a more efficient adherence to keratinocyte cells through their true hyphal specificity

The adhesion efficiency of *C. albicans* SC5314 and WO-1 strains was significantly higher for both HaCaT and HPV-KER keratinocytes. This more efficient binding may be attributed to their true hyphal property and higher adhesin expression. In the absence of these properties, *C. parapsilosis* strains can only minimally adhere to keratinocyte cells after either 1 h or 24 h of infection. In any case, the primed condition neither impairs nor improves the ability of *C. albicans* strains to adhere to HaCaT or HPV-KER keratinocytes.

4. The ability of keratinocyte cells to phagocytose is minimal but higher against *C. albicans* strains than against *C. parapsilosis* strains

Keratinocytes are not typically cells capable of internalisation, their ability to phagocytose is limited to a few percent for a given dose of fungal infection. However, the ability to phagocytose against *C. albicans* strains is significantly higher than that seen with *C. parapsilosis* strains. This can be explained by the findings in the adhesion assay, *C. albicans* strains are able to bind more efficiently to keratinocyte cells through their true hyphal property and the presence of this association is necessary for internalisation to occur. In the primed case, the phagocytic ability against *C. albicans* strain SC5314 was significantly reduced compared to the non-primed case, whereas *C. albicans* strain WO-1 showed no change. Thus, our results suggest that phagocytic ability is impaired against *C. albicans* SC5314 strain following primed infection.

5. Keratinocyte-fungus interaction does not alter *ECE1* gene expression, does not induce antimicrobial peptide production and in terms of biological functions, HPV-KER cells show greater susceptibility to *C. albicans* infection

One of the most important virulence factors in *C. albicans* strains is the production of candidalysine, which is mediated through increased expression of the *ECE1* gene. By sequencing the fungal RNA, it was found that interaction with keratinocyte cells does not increase the expression of the *ECE1* gene, but shows a basal expression, significantly higher in *C. albicans* SC5314 compared to *C. albicans* WO-1 strain. Our studies included the ability of keratinocyte cells to produce antimicrobial peptides, but we were unable to detect human AMPs in either cell line and in response to infection by *C. parapsilosis* and *C. albicans* strains. After RNA sequencing following RNA extraction from *Candida* fungi and keratinocyte cells, we performed a broader bioinformatic analysis and concluded that

infection with *C. albicans* strains resulted in the upregulation of genes that contribute to the fungal adhesion, reduction of free radical stress, increased regulation of their metabolism and transporter activity. Furthermore, on the epithelial cell side, several processes are down-regulated in HaCaT cells following *C. albicans* infection, whereas the opposite is true for HPV-KER keratinocytes. These findings suggest that HPV-KER keratinocyte cells are more sensitive to *Candida* infection, as several biological processes are more strongly upregulated in HPV-KER cells than in HaCaT cells, such as signal transduction, ROS stress reduction and cytokine/chemokine production.

6. Infection with more virulent *C. albicans* strains induces greater changes in the metabolic activity of keratinocyte cells

The case of non-primed infections in HaCaT cell line, infections caused by *C. albicans* SC5314 and to a lesser extent by the WO-1 strain resulted in higher metabolite production in cells compared to the uninfected control group. Taken together, these metabolites are involved in promoting keratinocyte cell differentiation, enhancing signal transduction, upregulating central biochemical pathways and strengthening barrier functions. In HPV-KER cells, the WO-1 strain, in addition to *C. albicans* SC5314, also caused a more significant increase in metabolite secretion compared to HaCaT cells. The metabolites produced here contribute to keratinocyte cell differentiation and adhesion processes, promote collagen synthesis, have antioxidant properties and are involved in the development of inflammatory processes. In case of primed infections, glycerol production in the HaCaT cell line is strongly associated with common intersection. It is released in both primed and non-primed infections by *C. albicans* strain SC5314 and has a role in supporting barrier functions. Several emerging metabolites are also produced, which have properties associated with antioxidant, inflammatory, adhesion, cell differentiation, collagen synthesis and barrier functions. During primed infection, malate, arginine, ornithine and hypotaurine are expressed in HPV-KER cells in the same way as in non-primed infections. These metabolites are involved in antioxidant, collagen synthesis promoting, cell repair and cell differentiation processes.

These results will help to better understand the interactions of keratinocyte cells with *Candida* fungi. We have successfully shown that, in comparison with *C. albicans* strains, the cells show higher cell damage, significant secretion of IL-6 and IL-8 cytokine/chemokine production, more significant fungal-cell association and higher cell internalization capacity than *C. parapsilosis* strains. We have further explored the

upregulated genes and biological processes resulting from fungal-cell interactions and their functions on both the fungal and cellular side. Furthermore, we have investigated in detail the metabolic changes in keratinocyte cells in response to *Candida* infection and the functional role of these changes in metabolite production. This knowledge will contribute to a better understanding of our skin and the development of more effective defence mechanisms against pathogenic fungal infections.

IX. Irodalomjegyzék

- Akbas, H., Okumus, A., Kilic, Z., Hökelek, T., Süzen, Y., Koc, L. Y., ... & Celik, Z. B. (2013). Phosphorus–nitrogen compounds part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl) spiro groups. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 294-307.
- Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 117(1): 106-11.
- Ananthapadmanabhan, K. P., Mukherjee, S., & Chandar, P. (2013). Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *International journal of cosmetic science*, 35(4), 337-345.
- Arastehfar, A.; Gabaldón, T.; Garcia-Rubio, R.; Jenks, J.D.; Hoenigl, M.; Salzer, H.J.F.; Ilkit, M.; Lass-Flörl, C.; Perlin, D.S. Drug-Resistant Fungi: An Emerging Challenge Threatening Our Limited Antifungal Armamentarium. *Antibiotics* 2020, 9, 877. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120877>
- Arul, S., Dayalan, H., Jegadeesan, M. and Damodharan, P. (2016) Induction of Differentiation in Psoriatic Keratinocytes by Propylthiouracil and Fructose. *BBA Clinical*, Elsevier B.V., 6, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.06.002>.
- Aungst, B. J., Rogers, N. J., & Shefter, E. (1986). Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. *International journal of pharmaceutics*, 33(1-3), 225-234.
- Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991; 337(8735): 211-4.
- Bassetti, M., Garnacho-Montero, J., Calandra, T., Kullberg, B., Dimopoulos, G. és mtsi. (2017). "Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients." *Intensive Care Med* 43(9): 1225-1238.
- Bates, S., Hughes, H. B., Munro, C. A., Thomas, W. P., Maccallum, D. M. és mtsai. (2006). "Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*." *J Biol Chem* 281(1): 90-98.

- Beno, D W, Stover, A G, Mathews, H L (1995). "Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes." *J Immunol* 154(10): 5273-5281.
- Borghi, M, Renga, G, Puccetti, M, Oikonomou, V, Palmieri, M, Galosi, C, . . . Romani, L (2014). "Antifungal Th Immunity: Growing up in Family." *Front Immunol* 5: 506.
- Boukamp, P., Petrussevska, Rule, T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. és Fusenig, N., E., (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771. doi:10.1083/jcb.106.3.761
- Brown, A. J. P., Brown, G. D., Netea, M. G. és Gow, N. A. R. (2014): Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends in Microbiology*, 22(11):614-622. doi:10.1016/j.tim.2014.07.001
- Brown, G. D. (2011): Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. *Annual Review of Immunology*, 29(1): 1-21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G. és White, T. C. (2012): Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13–165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067.
- Butler, G., Rasmussen, D. M., Lin, F., M., Santos, S. A. M., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J. P., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W. J., Harris, D., Hoyer, L. L., Hube, B., Klis, F. M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M. E., Martin, R., Neiman, A. M., Nikolaou, E., Quail, M. A., Quinn, J., Santos, M. C., Schmitzberger F. F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K. A. T., Skrzypek, M. S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M. P. H., Sudbery, P. E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N. A. R., Lorenz, M. C., Birren, B. W., Kellis, M. és Cuomo, C. A. (2009): Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247):657-62. doi: 10.1038/nature08064.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y. és Segre, J. A. (2018): The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3):143-155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157

- Cancer, A. and Lind, D.S. (2004) Arginine Metabolism: Enzymology, Nutrition, and Clinical Significance. *J. Nutr*, 2837–2841.
- Carretero M, Del Rio M, Garcia M, et al. A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte-targeted overexpression of antimicrobial peptides. *FASEB J* 2004; 29: 29.
- Casadevall, A. és Pirofski, L. A. (2003). "The damage-response framework of microbial pathogenesis." *Nat Rev Microbiol* 1(1): 17-24.
- Chessa C, Bodet C, Jousselin C, Wehbe M, Lévêque N and Garcia M (2020) Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Front. Microbiol.* 11:1155. doi: 10.3389/fmicb.2020.01155
- Civitelli, R., Fedde, K. N., Harter, J., Halstead, L. R., Gennari, C., & Avioli, L. V. (1989). Effect of L-lysine on cytosolic calcium homeostasis in cultured human normal fibroblasts. *Calcified tissue international*, 45, 193-197.
- Cooper, C. R. (2011): Yeasts Pathogenic to Humans. In: C. P. Kurtzman, C. P., Fell, J. W. és Boekhout, T. (szerk.): *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier, Amsterdam, 9-19. doi:10.1016/b978-0-444-52149-1.00002-1
- Cota, E. és Hoyer, L. L. (2015): The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. *Future Microbiology*, 10(10), 1635-1548. doi:10.2217/fmb.15.79
- Csátó, M., Bozóky, B., Hunyadi, J. et al. *Candida albicans* phagocytosis by separated human epidermal cells. *Arch Dermatol Res* 279, 136–139 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF00417535>
- Csátó, M., Kenderessy, A. S., Judak, R., Dobozy, A. (1990): Inflammatory mediators are involved in the *Candida albicans* killing activity of human epidermal cells. *Archives of Dermatological Research*, 282(5), 348-350. doi: 10.1007/bf00375732
- Dambuza, I. M., Wagener, J., Brown, D. G. és Gow., N. A. R. (2018): Immunology of fungal disease. In: In: Kibbler, C. C., Barton, R., Gow, N. A. R., Howell, S., MacCallum, D. M. és Manuel, R. J. (szerk.): *Oxford textbook of medical mycology*. Oxford University Press, New York, 62-70. doi:10.1093/med/9780198755388.003.0009
- Dambuza, I., Levitz, S., Netea, M. G. és Brown, G. (2017): Fungal Recognition and Host Defense Mechanisms. In Heitman, J., Howlett, B., Crous, P., Stukenbrock, E., James, T. és Gow, N. (szerk.): *The Fungal Kingdom*. ASM Press, Washington, DC, 887-902. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0050-2016

- Daniel, H. M., Lachance, M. A. és Kurtzman, C. P. (2014). "On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription." *Antonie Van Leeuwenhoek* 106(1): 67-84.
- Daniel, H-M., Lachance, M-A. és Kurtzman, C. P. (2014): On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1):67-84. doi:10.1007/s10482-014-0170-z
- Deyrieux, A. F. és Wilson, V. G. (2007): In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54(2), 77–83. doi:10.1007/s10616-007-9076-1
- Dias LB, de Melhem MSC, Szeszs MW, Filho JM, Hahn RC. Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drugs tests. *Brazilian J Microbiol.* 2011;42: 1300–7.
- Dismukes, W.E., Pappas, P. G. és Sobel, J. D. (szerk.) (2003): *Clinical Mycology*. Oxford University Press, New York.
- Dóczy, I., Dósa, E., Hajdú, E. és Nagy, E. (2002): Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, 51:677-681. doi:10.1099/0022-1317-51-8-677.
- Engku Nasrullah Satiman EAF, Ahmad H, Ramzi AB, et al. The role of *Candida albicans* candidalysin *ECE1* gene in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2020;49:835–841. <https://doi.org/10.1111/jop.13014>
- Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Castellanos, J. M., Venereo, Y., & Orta, X. (2001). Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition*, 17(11-12), 934-938.
- Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ, Ferreira SH: The involvement of nitric oxide in the anti-*Candida albicans* activity of rat neutrophils. *Immunology* 89:295±300, 1996
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997; 272(24): 15258-63.
- Fulton C, Anderson GM, Zasloff M, Bull R, Quinn AG. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 1997; 350(9093): 1750-1.
- Gácsér, A. (2015): Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in virulence. *Virulence*, 7(2):65-67. doi:10.1080/21505594.2015.1135288

- Gácsér, A., Schäfer, W., Nosanchuk, J. S., Salomon, S. és Nosanchuk, J. D. (2007): Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology*, 44(12), 1336–1341. doi:10.1016/j.fgb.2007.02.002
- Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol*. 2011 Oct;131(10):1974-80. doi: 10.1038/jid.2011.182. Epub 2011 Jun 23.
- Gamarra S, Morano S, Dudiuk C, Mancilla E, Nardin ME, de los Angeles Méndez E és mtsai. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital. *Mycopathologia*. 2014;178:251–8.
- Gantner, B N, Simmons, R M, Underhill, D M (2005). "Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments." *EMBO J* 24(6): 1277-1286.
- Gantner, B.N. et al. (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–1117
- Gao, H., Tuyishime, P., Zhang, X., Yang, T., Xu, M., & Rao, Z. (2021). Engineering of microbial cells for L-valine production: challenges and opportunities. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-16.
- Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001; 15(10): 1819-21.
- Giardino, L., Generali, L., Savadori, P., Barros, M.C., Simas, L.L. de M., Pytko-Polończyk, J., Wilkoński, W., Ballal, V. and Andrade, F.B. de. (2022) Can the Concentration of Citric Acid Affect Its Cytotoxicity and Antimicrobial Activity? *Dentistry Journal*, MDPI, 10. <https://doi.org/10.3390/dj10080148>.
- Ginty, D. D., Osborne, D. L., & Seidel, E. R. (1989). Putrescine stimulates DNA synthesis in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257(1), G145-G150.
- Goodwine, J., Gil, J., Doiron, A., Valdes, J., Solis, M., Higa, A., ... & Sauer, K. (2019). Pyruvate-depleting conditions induce biofilm dispersion and enhance the efficacy of antibiotics in killing biofilms *in vitro* and *in vivo*. *Scientific reports*, 9(1), 3763.
- Gordon, P. R., Mawhinney, T. P., & Gilchrest, B. A. (1988). Inositol is a required nutrient for keratinocyte growth. *Journal of cellular physiology*, 135(3), 416-424.

- Gow, N. A. és Netea, M. G. (2016). "Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371(1709).
- Gow, N., Latge, J. és Munro, C. (2017): The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. In Heitman, J., Howlett, B., Crous, P., Stukenbrock, E., James, T. és Gow, N. (szerk.): The Fungal Kingdom. ASM Press, Washington, DC, 267-292. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
- Granits, J. (1954): Pilzkulturen aus Reihenuntersuchungen von Gesunder Epidermis. *Dermatologische Wochenschrift*, 130, 1352-1356.
- Green, T.R., Lack, 2, Fellman, H., Eicher, A.L. and Pratt, K.L. (1990) Antioxidant Role and Subcellular Location of Hypotaurine and Taurine in Human Neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC; NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009 May 29;324(5931):1190-2. doi: 10.1126/science.1171700.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244-53. doi: 10.1038/nrmicro2537.
- Grice EA. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Semin Cutan Med Surg*. 2014 Jun;33(2):98-103.
- Guégan, S., Lanternier, F., Rouzaud, C., Dupin, N. és Lortholary, O. (2016): Fungal skin and soft tissue infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(2), 124–130. doi:10.1097/qco.0000000000000252
- Guinea, J. (2014). "Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia." *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 6: 5-10.
- Han, S. H., Cheon, H. I., Hur, M. S., Kim, M. J., Jung, W. H. és Lee, Y. W. (2018): Analysis of the skin mycobiome in adult patients with atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*. 27(4):366-373. doi: 10.1111/exd.13500
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin 3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276(8): 5707-13.
- Harder J, Bartels J. Christophers E. Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387(6636): 861.

- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004; 123(3): 522-9.
- Hardison, S E, Brown, G D (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity." *Nat Immunol* 13(9): 817-822.
- Havlickova, B., Czaika, V. A. és Friedrich, M. (2008): Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51, 2-15. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
- Henderson, D.P. and Toone, E.J. (1999) Aldolases. *Comprehensive natural products chemistry*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780080912837000886>.
- Hernandez-Santos, N, Gaffen, S L (2012). "Th17 cells in immunity to *Candida albicans*." *Cell Host Microbe* 11(5): 425-435.
- Hess, J, Angel, P, Schorpp-Kistner, M (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." *J Cell Sci* 117(Pt 25): 5965-5973.
- Higa, M. (2008). "[Clinical epidemiology of fungal infection in diabetes]." *Nihon Rinsho* 66(12): 2239-2244.
- Hof, H. (2009): Mycoses in the elderly. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(1):5-13. doi:10.1007/s10096-009-0822-5
- Höfs, S., Mogavero, S. és Hube, B. (2016): Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3):149-169. doi:10.1007/s12275-016-5514-0
- Hsiao, Y.P., Lai, W.W., Wu, S.B., Tsai, C.H., Tang, S.C., Chung, J.G. and Yang, J.H. (2015) Triggering Apoptotic Death of Human Epidermal Keratinocytes by Malic Acid: Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress- and Mitochondria-Dependent Signaling Pathways. *Toxins*, MDPI AG, 7, 81–96. <https://doi.org/10.3390/toxins7010081>.
- Huntley, N. F., & Patience, J. F. (2018). Xylose: absorption, fermentation, and post-absorptive metabolism in the pig. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9, 1-9.
- Hwang, S.Y., Kang, Y.J., Sung, B., Jang, J.Y., Hwang, N.L., Oh, H.J., Ahn, Y.R., Kim, H.J., Shin, J.H., Yoo, M.A., Kim, C.M., Chung, H.Y. and Kim, N.D. (2018) Folic Acid Is Necessary for Proliferation and Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, Wiley-Liss Inc., 233, 736–747. <https://doi.org/10.1002/jcp.25989>.

- Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, Agata T, Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010 May 20;465(7296):346-9. doi: 10.1038/nature09074.
- Janeway, C A, Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
- Ji Eun Kim, Beom Joon Kim, Mi Sook Jeong, Seong Jun Seo, Myeung Nam Kim, Chang Kwun Hong, & Byung In Ro. (2005). Expression and Modulation of LL-37 in Normal Human Keratinocytes, HaCaT cells, and Inflammatory Skin Diseases. *J Korean Med Sci*, 20(649–54).
- Jouault, T, Iyata-Ombetta, S, Takeuchi, O, Trinel, P A, Sacchetti, P, Lefebvre, P, . . . Poulain, D (2003). "*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors." *J Infect Dis* 188(1): 165-172.
- Jun Seo, S., Won Ahn, S., Kwun Hong, C., & In Ro, B. (2001). Expressions of b-defensins in human keratinocyte cell lines. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 27). www.elsevier.com/locate/jdermsci
- Kaech, S M, Cui, W (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation." *Nat Rev Immunol* 12(11): 749-761.
- Karen-Ng, L. P., James, E. L., Stephen, A., Bennett, M. H., Mycielska, M. E., & Parkinson, E. K. (2021). The extracellular metabolome stratifies low and high risk potentially premalignant oral keratinocytes and identifies citrate as a potential non-invasive marker of tumour progression. *Cancers*, 13(16), 4212.
- Kashem, S. W. és Kaplan, H. K. (2016): Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends in Immunology*, 37(7): 440–450. doi: 10.1016/j.it.2016.04.007
- Kaur, G., Shivanandappa, T. B., Kumar, M., & Kushwah, A. S. (2020). Fumaric acid protect the cadmium-induced hepatotoxicity in rats: owing to its antioxidant, anti-inflammatory action and aid in recast the liver function. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 1911-1920.
- Kawai, T, Akira, S (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* 13(5): 816-825.
- Kenderessy, A. S., Kemeny, L. és Dobozy, A. (1996): Nitric oxide is involved in the *Candida albicans* killing activity of keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 107, 452.

- Khan M, Ahmed J, Gul A, Ikram A, Lalani FK. Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. *Infect Drug Resist.* 2018;11:447–56.
- Köhler, J. R., Casadevall, A. és Perfect, J. (2014): The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1):a019273-a019273. doi:10.1101/cshperspect.a019273
- Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A. és Perfect, J. (2017): Fungi that Infect Humans. In Heitman, J., Howlett, B., Crous, P., Stukenbrock, E., James, T. és Gow, N. (szerk.): The Fungal Kingdom. *ASM Press*, Washington, DC, 813-843. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2907-15.
- Kroetz, D N, Deepe, G S, Jr. (2010). "CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection." *J Immunol* 184(9): 5224-5231.
- Kumar, H, Kawai, T, Akira, S (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* 30(1): 16-34.
- Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen AL, Wu ZR, Hooper LV, Schmidt RR, von Aulock S, Radek KA, Huang CM, Ryan AF, Gallo RL. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med.* 2009 Dec;15(12):1377-82. doi: 10.1038/nm.2062. Epub 2009 Nov 22.
- Lamothe, F., Lockhart, S. R., Berkow, E. L. és Calandra, T. (2018). "Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis." *J Antimicrob Chemother* 73(suppl_1): i4-i13.
- Larone, D. H. (1987): Medically important fungi: a guide to identification. 2. kiadás. *Elsevier*, Washington, DC.
- Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 1995; 63(4): 1291-7.
- Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 2009;52(3):197–205.

- Lehrer, I. R., and T. Ganz. 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 23–27.
- Lev-Sagie, A. et al. (2009) Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 303.e1–6
- Lewis, D. A., Hengeltraub, S. F., Gao, F. C., Leivant, M. A. és Spandau, D. F. (2006): Aberrant NF-κB Activity in HaCaT Cells Alters their Response to UVB Signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(8), 1885–1892. doi:10.1038/sj.jid.5700333
- Li, J., Hsu, H.C., Mountz, J.D. and Allen, J.G. (2018, May) Unmasking Fucosylation: From Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. *Cell Chemical Biology*, Elsevier Ltd, 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.005>.
- Li, M., Chen, Q., Shen, Y. és Liu, W. (2008): *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Experimental Dermatology*, (19), 603–610. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00832.x
- Liew FY, Cox FE: Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 12:A17±A21, 1991
- Lima-Neto, R. G., Beltrão, E. I. C., Oliveira, P. C. és Neves, R. P. (2010): Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*, 54(1), 23–29. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x
- Lionakis, M. S., Iliev, I. D. és Hohl, T. M. (2017): Immunity against fungi. *JCI Insight*, 2(11):e93156. doi:10.1172/jci.insight.93156
- Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe*. 2011 Oct 20;10(4):311-23. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.004.
- Lo, H J, Kohler, J R, DiDomenico, B, Loebenberg, D, Cacciapuoti, A, Fink, G R (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* 90(5): 939-949.
- Luckheeram, R V, Zhou, R, Verma, A D, Xia, B (2012). "CD4(+) T-cells: differentiation and functions." *Clin Dev Immunol* 2012: 925135.
- Manosalva, C., Quiroga, J., Hidalgo, A. I., Alarcón, P., Anseoleaga, N., Hidalgo, M. A., & Burgos, R. A. (2022). Role of lactate in inflammatory processes: friend or foe. *Frontiers in immunology*, 12, 808799.

- Marples, M. J. és Somerville, D. A. (1968): The oral and cutaneous distribution of *Candida albicans* and other yeasts in Rarotonga, Cook Islands. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2):256-262. doi:10.1016/0035-9203(68)90166-1
- Martinon, F. et al. (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265
- Marwin, R. M. (1949): Relative incidence of *Candida albicans* on the skins of persons with and without skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 12, 229-241.
- Matee, M I, Scheutz, F, Moshly, J (2000). "Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians." *Oral Dis* 6(2): 106-111.
- Mayer, F. L., Wilson, D. és Hube, B. (2013): *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2):119-128. doi:10.4161/viru.22913
- Mccarty, T. P. és Pappas, P. G. (2016). "Invasive Candidiasis." *Infect Dis Clin North Am* 30(1): 103-124.
- McMullan, R., Lax, S., Robertson, V.H., Radford, D.J., Broad, S., Watt, F.M., Rowles, A., Croft, D.R., Olson, M.F. and Hotchin, N.A. (2003) Keratinocyte Differentiation Is Regulated by the Rho and ROCK Signaling Pathway. *Current Biology*, Cell Press, 13, 2185–2189. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.050>.
- Mieremet, A., Helder, R., Nadaban, A., Gooris, G., Boiten, W., El Ghalbzouri, A., & Bouwstra, J. A. (2019). Contribution of palmitic acid to epidermal morphogenesis and lipid barrier formation in human skin equivalents. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6069.
- Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S és mtsai. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hospital Epidemiol* 2005;26:540-7.
- Moris, D. V., Melhem, M. S. C., Martins, M. A. és Mendes, R. P. (2008): Oral *Candida* spp. colonization in human immunodeficiency virus infected individuals. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 14(2):224-257. doi:10.1590/s1678-91992008000200004

- Mosmann, T R, Coffman, R L (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I, Kichik, N., Häder, A., Kurzai, O., Luo, T., Krüger, T., Kniemeyer, O., Cota, E., Bader, O., Wheeler, R. T., Gutschmann, T., Hube, B. és Naglik, J. R. (2016): Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597):64-68. doi:10.1038/nature17625
- Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 119(5): 1090-5.
- Myers, T A, Leigh, J E, Arribas, A R, Hager, S, Clark, R, Lilly, E, Fidel, P L, Jr. (2003). "Immunohistochemical evaluation of T-cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis." *Infect Immun* 71(2): 956-963.
- Nadtochiy, S.M., Schafer, X., Fu, D., Nehrke, K., Munger, J. and Brookes, P.S. (2016) Acidic pH Is a Metabolic Switch for 2-Hydroxyglutarate Generation and Signaling The Downstream Signaling Roles of D-2-HG in Cancer Biology and of L-2-HG in Hypoxia. *Biorxiv*.
- Nestle, F. O., Meglio, P. Di, Qin, J. Z. és Nickoloff, B. J. (2009): Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 679–691. doi:10.1038/nri2622
- Netea, M G, Brown, G D, Kullberg, B J, Gow, N A (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." *Nat Rev Microbiol* 6(1): 67-78.
- Netea, M G, Suttmüller, R, Hermann, C, Van der Graaf, C A, Van der Meer, J W, van Krieken, J H, . . . Kullberg, B J (2004). "Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells." *J Immunol* 172(6): 3712-3718.

- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Kullberg, B.-J. és van de Veerdonk, F. L. (2015): Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 15(10):630-642. doi:10.1038/nri3897
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2005). The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol.* 175, 1776–1784. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1776
- Nizet V, Ohtake T Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 414(6862): 454-7.
- Nordlind, K., Johansson, O., Lidén, S. and Hiikfelt, T. (1993) Virchows Arch & B Original Articles Glutamate- and Aspartate-like Immunoreactivities in Human Normal and Inflamed Skin. *Virchows Archiv B Cell Pathol*, 75–82.
- Nosek, J, Holesova, Z, Kosa, P, Gacser, A, Tomaska, L (2009). "Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." *Curr Genet* 55(5): 497-509.
- Odds, F. C. (1988): *Candida* and Candidosis, 2. kiadás. London, Bailliere Tindall.
- Odds, F. C. (1994): Cutaneous yeast infections. Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 31(3), S2-S3.
- Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 2003; 74(2): 180-2
- Ouyang, W, Kolls, J K, Zheng, Y (2008). "The biological functions of T-helper 17 cell effector cytokines in inflammation." *Immunity* 28(4): 454-467.
- Pammi, M, Holland, L, Butler, G, Gacser, A, Bliss, J M (2013). "*Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis." *Pediatr Infect Dis J* 32(5): e206-216.
- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3): 485–506.
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. & Bazzoni, G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1778, 646–659 (2008).
- Park, H, Li, Z, Yang, X O, Chang, S H, Nurieva, R, Wang, Y H, . . . Dong, C (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* 6(11): 1133-1141.
- Páyer, E., Szabó-Papp, J., Ambrus, L., Szöllősi, A.G., Andrási, M., Dikstein, S., Kemény, L., Juhász, I., Szegedi, A., Bíró, T. and Oláh, A. (2018) Beyond the Physico-Chemical Barrier: Glycerol and Xylitol Markedly yet Differentially Alter Gene

Expression Profiles and Modify Signalling Pathways in Human Epidermal Keratinocytes. *Experimental Dermatology*, Blackwell Publishing Ltd, 27, 280–284. <https://doi.org/10.1111/exd.13493>.

- Peman, J, Canton, E, Linares-Sicilia, M J, Rosello, E M, Borrell, N, Ruiz-Perez-de-Pipaon, M T, . . . Garcia-Garcia, I (2011). "Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey." *J Clin Microbiol* 49(12): 4158-4163.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133–163.
- Pfaller, M A, Diekema, D J, Gibbs, D L, Newell, V A, Ellis, D, Tullio, V, . . . and the Global Antifungal Surveillance, G (2010b). "Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion." *J Clin Microbiol* 48(4): 1366-1377.
- Pfaller, M A, Moet, G J, Messer, S A, Jones, R N, Castanheira, M (2011). "*Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009." *Antimicrob Agents Chemother* 55(2): 561-566.
- Pivarcsi, A., Kemény, L. és Dobozy, A. (2004): Innate immune functions of the keratinocytes. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51(3), 303-10. doi:10.1556/AMicr.51.2004.3.8
- Pivarcsi, A., Kemény, L. és Dobozy, A. (2004): Innate immune functions of the keratinocytes. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51(3), 303-10. doi:10.1556/AMicr.51.2004.3.8
- Pivarcsi, A., Kemény, L. és Nagy, I. (2005): Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Current Immunology Reviews*, 1(1), 29-42. doi: 10.2174/1573395052952941
- Plato, A, Hardison, S E, Brown, G D (2015). "Pattern recognition receptors in antifungal immunity." *Semin Immunopathol* 37(2): 97-106.
- Plato, A, Hardison, S E, Brown, G D (2015). "Pattern recognition receptors in antifungal immunity." *Semin Immunopathol* 37(2): 97-106.
- Rafat, Z., Hashemi, S. J., Ahamdikia, K., Ghazvini, R. D. és Bazvandi, F. (2018): Study of Skin and Nail *Candida* Species as a Normal Flora Based on Age Groups in Healthy

- Persons in Tehran-Iran (2016): *Journal of Medical Mycology*, 27(4):501-505. doi:10.1016/j.mycmed.2017.08.007
- Rathod SD, Klausner JD, Krupp K, Reingold AL, Madhivanan P. Epidemiologic features of vulvovaginal candidiasis among reproductive-age women in India. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;2012:1–8.
 - Rehaume, L.M. et al. (2010) Lessons from the inflammasome: a molecular sentry linking *Candida* and Crohn's disease. *Trends Immunol.* 31, 171–175
 - Rippon, J. W. (szerk.) (1974): *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia, USA, W.B. Saunders Co.
 - Romani, L (2011). "Immunity to fungal infections." *Nat Rev Immunol* 11(4): 275-288.
 - Ruiz-Herrera, J, Elorza, M V, Valentin, E, Sentandreu, R (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." *FEMS Yeast Res* 6(1): 14-29.
 - Sallusto, F, Geginat, J, Lanzavecchia, A (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* 22: 745-763.
 - Sameem, B., Khan, F., & Niaz, K. (2019). l-Cysteine. In *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements* (pp. 53-58). Academic Press.
 - Scherwitz, D. (1982): Ultrastructure of Human Cutaneous Candidosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 78, 200-205.
 - Schwörer, S., Pavlova, N. N., Cimino, F. V., King, B., Cai, X., Sizemore, G. M., & Thompson, C. B. (2021). Fibroblast pyruvate carboxylase is required for collagen production in the tumour microenvironment. *Nature metabolism*, 3(11), 1484-1499.
 - Shen, F, Gaffen, S L (2008). "Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy." *Cytokine* 41(2): 92-104.
 - Sheth, C. C., Hall, R., Lewis, L., Brown, A. J. P., Odds, F. C., Erwig, L. P. és Gow, N. A. R. (2011): Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Medical Mycology* 49(5) 513–524 <http://doi.org/10.3109/13693786.2010.551425>
 - Shevach, E M (2001). "Certified professionals: CD4(+) CD25(+) suppressor T cells." *J Exp Med* 193(11): F41-46.
 - Shintaku Tatsushi, Glass Kyle A., Hirakawa Matthew P., Longley Sarah J., Bennett Richard J., Bliss Joseph M., Shaw Sunil K. (2013): Human Endothelial Cells Internalize

Candida parapsilosis via N-WASP-Mediated Endocytosis. *American Society for Microbiology*, <https://doi.org/10.1128/IAI.00535-13>

- Si, X., Jia, H., Liu, N., Li, J., Pan, L., Wang, J. and Wu, Z. (2022) Alpha-Ketoglutarate Attenuates Colitis in Mice by Increasing *Lactobacillus* Abundance and Regulating Stem Cell Proliferation via Wnt-Hippo Signaling. *Molecular Nutrition and Food Research*, John Wiley and Sons Inc, 66. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100955>.
- Sieber, M. A., & Hegel, J. K. E. (2013). Azelaic acid: properties and mode of action. *Skin pharmacology and physiology*, 27(Suppl. 1), 9-17.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34(1):1–14.
- Silva, R. F. (2010). "Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients." *J Bras Pneumol* 36(1): 142-147.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W. és Azeredo, J. (2012): *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2):288-305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Sivashanmugam, M., J, J., V, U. and K.N, S. (2017, February) Ornithine and Its Role in Metabolic Diseases: An Appraisal. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.024>.
- Sobel, J D (2007). "Vulvovaginal candidosis." *Lancet* 369(9577): 1961-1971.
- Solis, N. V., Park, Y.-N., Swidergall, M., Daniels, K. J., Filler, S. G. és Soll, D. R. (2018): *Candida albicans* White-Opaque Switching Influences Virulence but Not Mating during Oropharyngeal Candidiasis. *Infection and Immunity*, 86(6), e00774-17 doi:10.1128/iai.00774-17
- Somerville D. A. (1969): The normal flora of the skin in different age groups. *British Journal of Dermatology*, 81,248-258.
- Sridharan, A., Shi, M., Leo, V. I., Subramaniam, N., Lim, T. C., Uemura, T., ... & Vardy, L. A. (2020). The polyamine putrescine promotes human epidermal melanogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(10), 2032-2040.

- Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(1): 99-105.
- Szalka, A. (szerk.) (2000): Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Budapest, Magyarország, Golden Book Kiadó
- Szolnok, G., Bata-Csörgő, Z., Kenderessy, A. S., Kiss, M., Pivarcsi, A., Novák, Z., Nagy Newmann K., Michel, G., Ruzicka, T., Marodi, L., Dobozy, A. és Kemeny, L. (2001): A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *Journal of Investigative Dermatology*, 117, 205. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.14071.x
- Takeda, K. et al. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376
- Tax, G., Urbán, E., Palotás, Z., Puskás, R., Kónya, Z., Bíró, T. és Szabó, K. (2016): Propionic Acid Produced by *Propionibacterium acnes* Strains Contributes to Their Pathogenicity. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(1), 43–49. doi:10.2340/00015555-2154
- Tomalka, J. et al. (2011) A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 7, e1002379
- Tóth, R., Tóth, A., Vágvolgyi, Cs. és Gácsér, A. (2017b): *Candida parapsilosis* secreted lipase as an important virulence factor. *Current Protein and Peptid Science*, 18(10):1043-1049. doi:10.2174/1389203717666160813163054
- Trofa, D., Gácsér, A. és Nosanchuk, J. D. (2008): *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 606–625. doi:10.1128/cmr.00013-08
- Tsuchiya, K, Hara, H (2014). "The inflammasome and its regulation." *Crit Rev Immunol* 34(1): 41-80.
- Turner, S. A. és Butler, G. (2014): The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(9), a019778–a019778. doi:10.1101/cshperspect.a019778
- Ullmann, Y. és Berdicevsky, I. (2011): The Pathogenesis of *Candida* Infections in a Human Skin Model: Scanning Electron Microscope Observations, *ISRN Dermatology*. Article ID:150642. doi:10.5402/2011/150642
- Valore, E. V., C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray, Jr., and T. Ganz. 1998. Human Beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* 101: 1633–1642

- Vanaja, S K, Rathinam, V A, Fitzgerald, K A (2015). "Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights." *Trends Cell Biol.*
- Verma, A., Wuthrich, M., Deepe, G. és Klein, B. (2014): Adaptive Immunity to Fungi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(3):a019612-a019612. doi:10.1101/cshperspect.a019612
- Viano, M., Alotto, D., Aillon, A., Castagnoli, C., & Silvagno, F. (2017). A thermal gradient modulates the oxidative metabolism and growth of human keratinocytes. *FEBS Open Bio*, 7(12), 1843–1853. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12303>
- Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis.* 1999;28(5): 1071–1079.
- Wellington, M, Koselny, K, Sutterwala, F S, Krysan, D J (2014). "*Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages." *Eukaryot Cell* 13(2): 329-340.
- West, T.P., Chunduru, J. and Murahari, E.C. (2017) Orotic Acid: Why It Is Important to Understand Its Role in Metabolism. *Biochemistry & Physiology: Open Access*, OMICS Publishing Group, 06. <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000e157>.
- Williams, D. W., Jordan, R. P., Wei, X. Q., Alves, C. T., Wise, M. P. et al (2013). "Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces." *J Oral Microbiol* 5.
- Wilson D, Naglik JR, Hube B. The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005867.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39(3):309–317.
- Wollina, U., Kunkel, W., Bulling, L., Funfstuck, C., Knoll, B., Vennewald, I. és Hipler, U-C. (2004): *Candida albicans*-induced inflammatory response in human keratinocytes. *Mycoses*, 47(5-6), 193–199. doi:10.1111/j.1439-0507.2004.00976.x
- Wu, S., Liu, X., Cheng, L., Wang, D., Qin, G., Zhang, X., ... & Sun, Z. (2022). Protective Mechanism of Leucine and Isoleucine against H₂O₂-Induced Oxidative Damage in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 4013575.
- Yamauchi, M., & Sricholpech, M. (2012). Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays in biochemistry*, 52, 113-133.

- Yapar, N. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." *Ther Clin Risk Manag* 10: 95-105.
- Yokouchi, M. & Kubo, A. Maintenance of tight junction barrier integrity in cell turnover and skin diseases. *Exp. Dermatol.* 27, 876–883 (2018).
- Yokouchi, M. és mtsai. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. *Elife* 5, 1 (2016).
- Zeeuwen PL, Kleerebezem M, Timmerman HM, Schalkwijk J. Microbiome and skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013 Oct;13(5):514-20. doi: 10.1097/ACI.0b013e328364ebeb.
- Zelensky, A N, Gready, J E (2005). "The C-type lectin-like domain superfamily." *FEBS J* 272(24): 6179-6217.
- Zhong, Y, Kinio, A, Saleh, M (2013). "Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases." *Front Immunol* 4:333.
- Zilderberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000–2005. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(10):978–980.

X. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani szüleimnek, családomnak és páromnak, akik lehetővé tették, hogy eljussak a PhD megkezdéséig és a végzés során is folyamatos támogatást és biztatást nyújtottak számomra.

Továbbá Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének mondok köszönetet, hogy a tanszéken végezhettem a doktori iskolát.

Hálás vagyok témavezetőmnek Prof. Dr. Gácsér Attilának. Szakmai tanácsain túl remek példát és utat mutatott számomra a szakmai területen. Köszönöm, hogy biztosította számomra több konferencián való részvételt és gyakorlati, valamint elméleti téren történő előre haladásomat.

Köszönettel tartozom a témavezetőm által irányított kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának: Dr. Németh Tibornak, Dr. Tóth Renátának, Dr. Papp Csabának, Szenzenstein Juditnak, Dr. Zajta Eriknek, Dr. Csonka Katalinnak, Dr. Tanmoy Chakrabortynak, Dr. Dhirendra N. Singhnek, Dr. Vadovics Máténak, Dr. Pál Sárának, Dr. Bohner Flórának, Dr. Takács Tamásnak, Horváth Mártonnak, Veres Évának, Csikós Máténak, Szilovics Zórának, Drabbant Gergőnek, Tasi Zsoltnak és Halmos Emesének amiért egy összetartó, lelkes és vicces csapat tagja lehettem.

Kollégáim közül külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Németh Tibornak a magas szakmai szintű tanácsokért és útmutatásért; Dr. Tóth Renátának a tudományos cikk és doktori írás ismereteibe történő bevezetésért; Dr. Papp Csabának a mikroszkópia és áramlási citometria során nyújtott segítségért; Szenzenstein Juditnak, aki számos adminisztrációs kérdésben segített nekem és Dr. Zajta Eriknek, aki mentorként vezetett be a PhD kezdetének idején a labor életébe és munkájába.

Szeretném megköszönni egykori szakdolgozóimnak Csikós Máténak és Halmos Emesének a munkában adott segítséget.

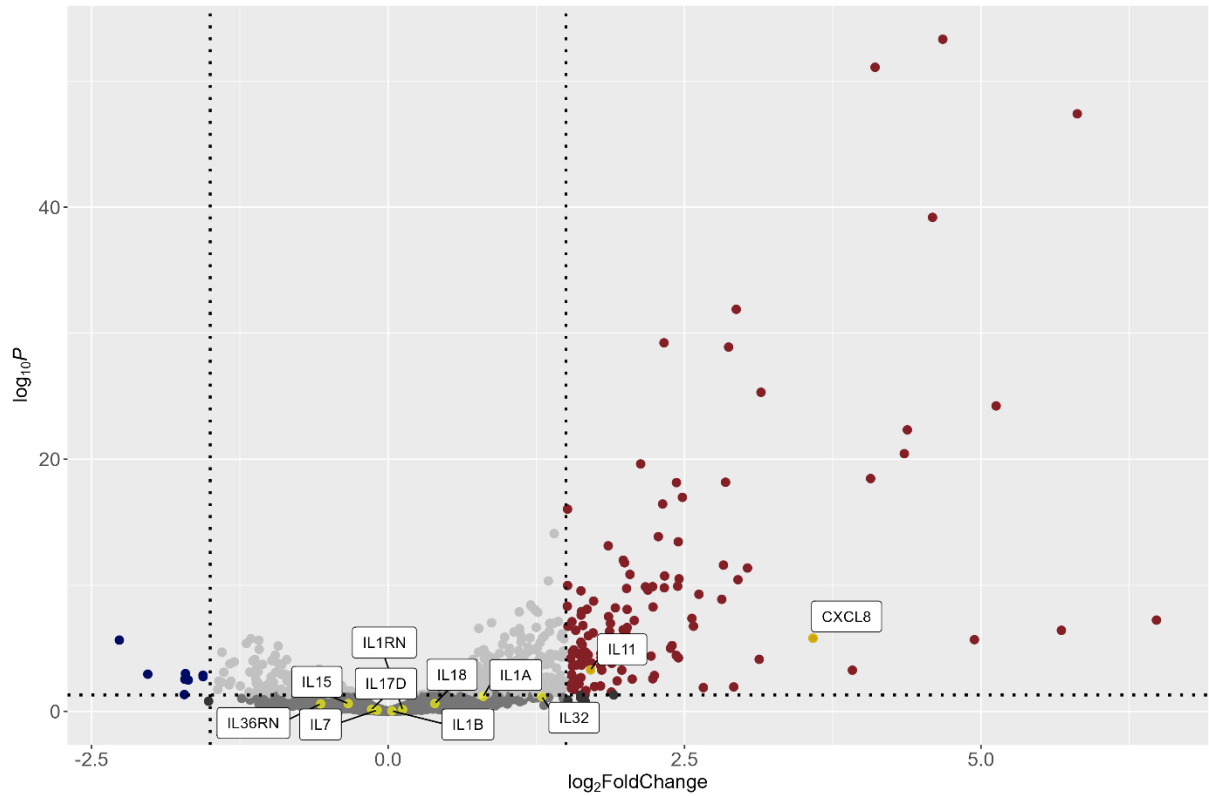
Köszönettel tartozom Dr. Szabó Gábornak és Dr. Gémes Nikolettnek a keratinocita és *Candida* gomba genom szekvenálásokért.

Külön köszönöttel tartozom Dr. Szekeres Andrásnak és Dr. Varga Mónikának a metabolizmus mérések kapcsán.

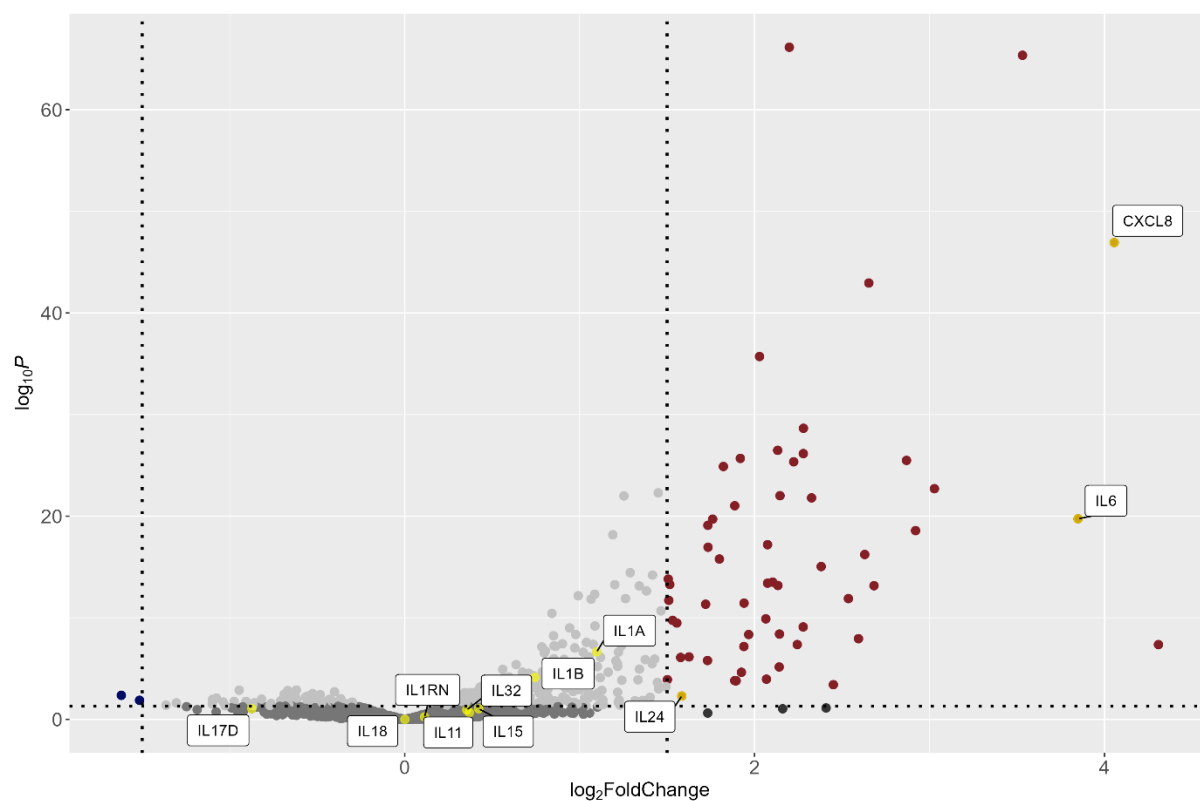
Köszönettel tartozom Dr. Márton Annamáriának az egérkísérletek során nyújtott segítségért és tanácsokért.

Köszönetet mondok Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a technikai segítségnyújtásért, valamint Lengyel Boglárkának, Magyar Adriennek és Szabó Anikónak a munkám során felmerülő gazdasági ügyekben való ügyintézésért, illetve a 301. labor és a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért.

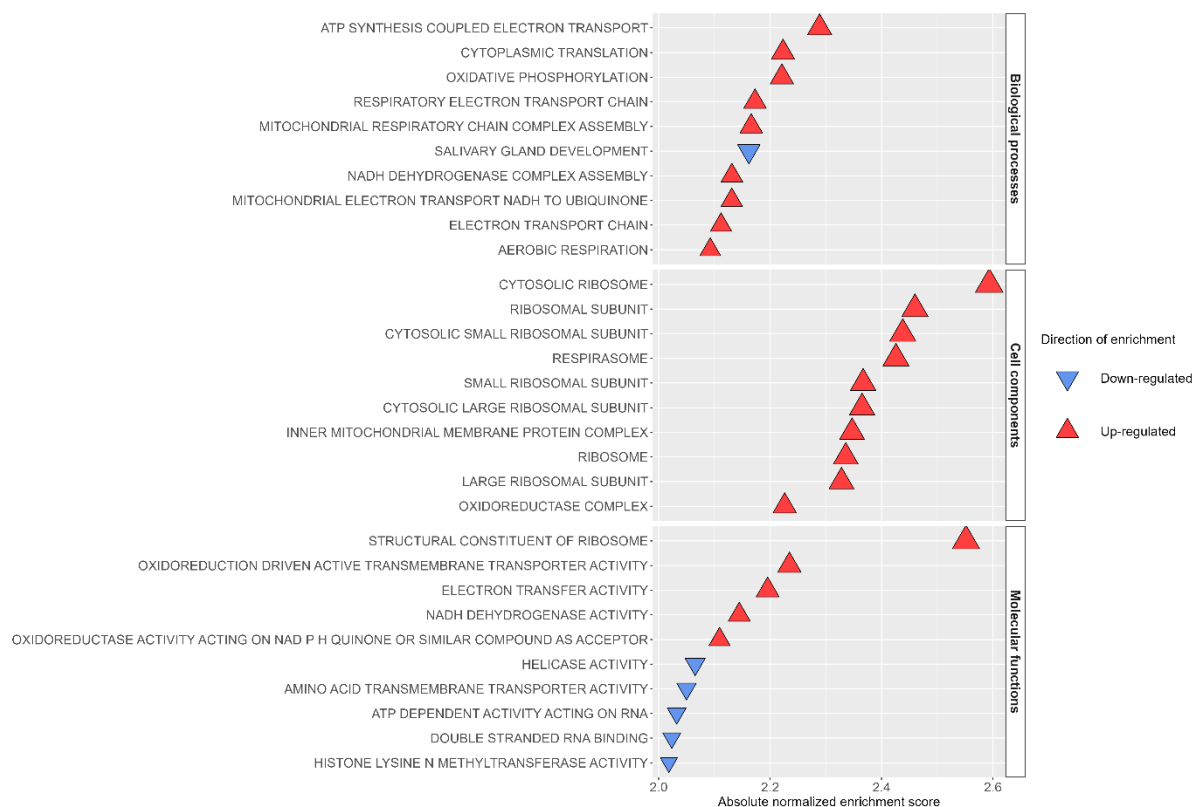
XI. Függelék



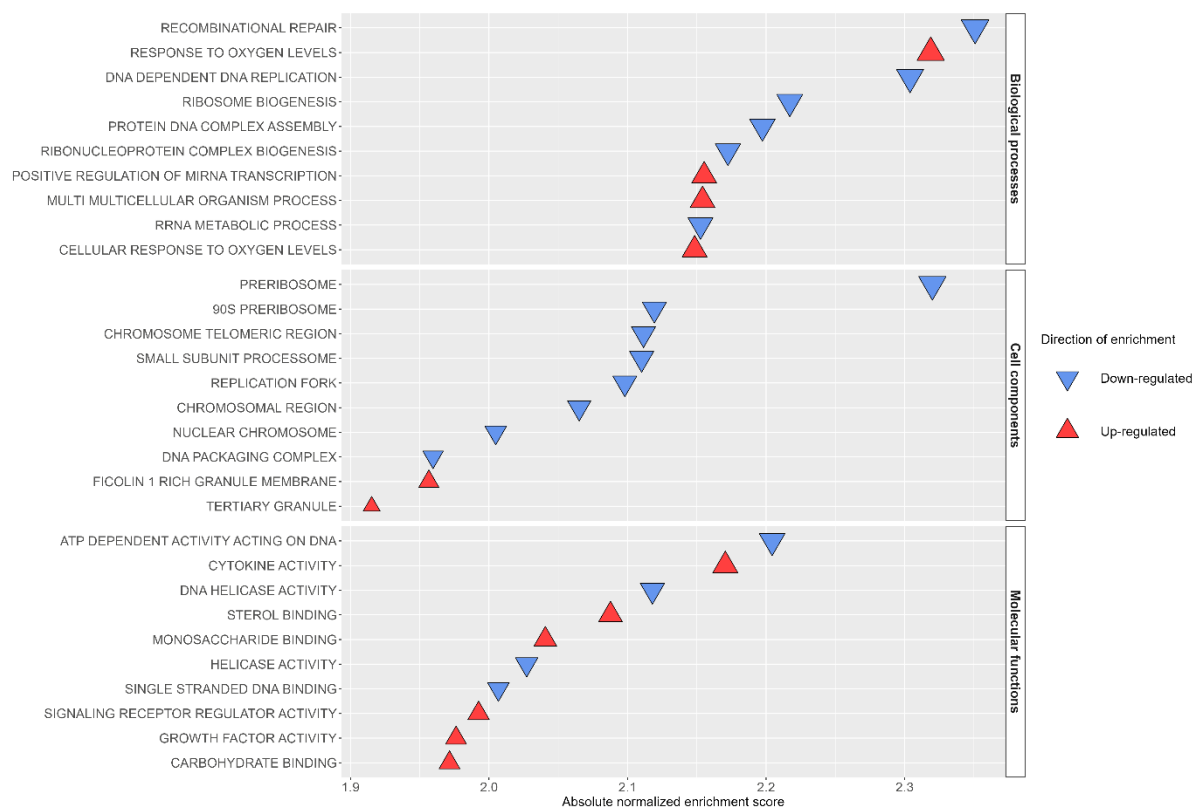
Függelék 1. ábra. A HaCaT keratinocita sejtek *C. albicans* SC5314 (MOI=1:25) törzs fertőzését követő citokin/kemokin termelésért felelős génjeinek expressziójának mértéke a fertőzetlen kontroll sejtekhez képest. A piros pontok jelölik a felülszabályozott, a kék pontok az alulszabályozott génexpressziót. Az x-tengelyen a változás mértéke, az y-tengelyen a szignifikancia szint látható logaritmikus skálán.



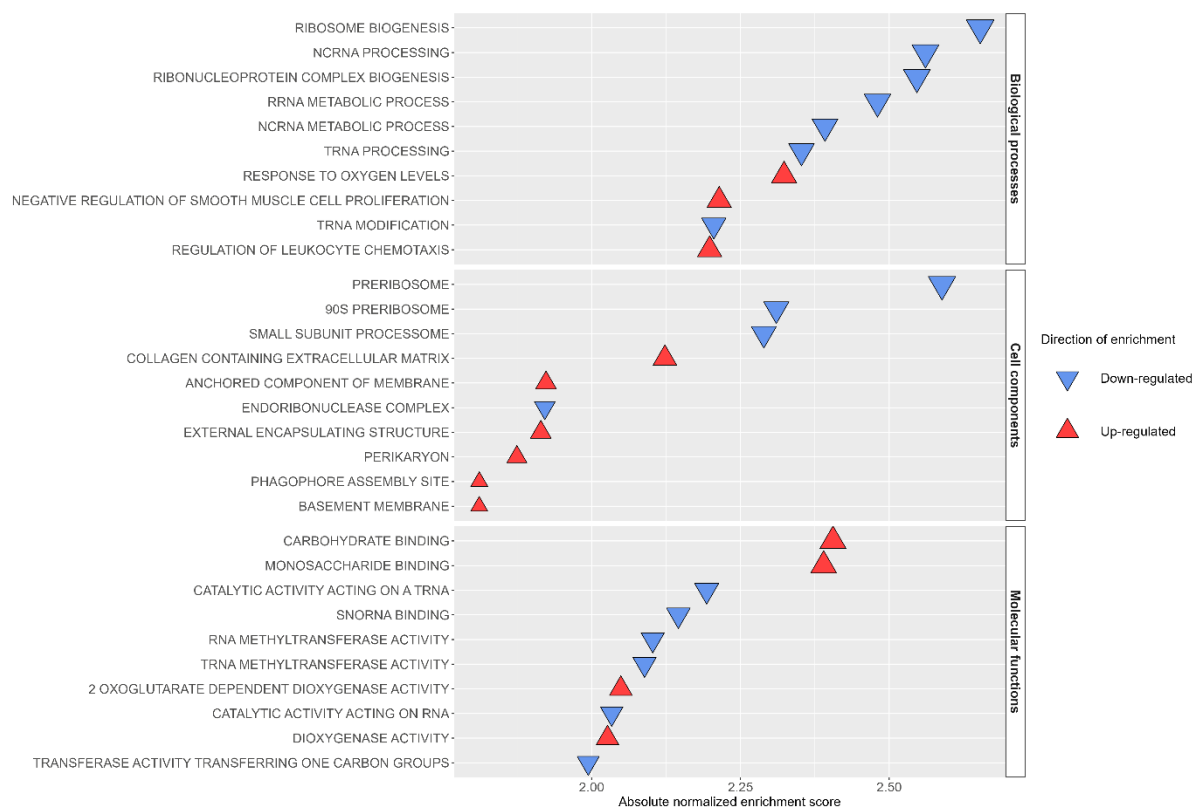
Függelék 2. ábra. A HPV-KER keratinocita sejtek *C. albicans* SC5314 (MOI=1:25) törzs fertőzését követő citokin/kemokin termelésért felelős génjeinek expressziójának mértéke a fertőzetlen kontroll sejtekhez képest. A piros pontok jelölik a felülszabályozott, a kék pontok az alulszabályozott génexpressziót. Az x-tengelyen a változás mértéke, az y-tengelyen a szignifikancia szint látható logaritmikus skálán.



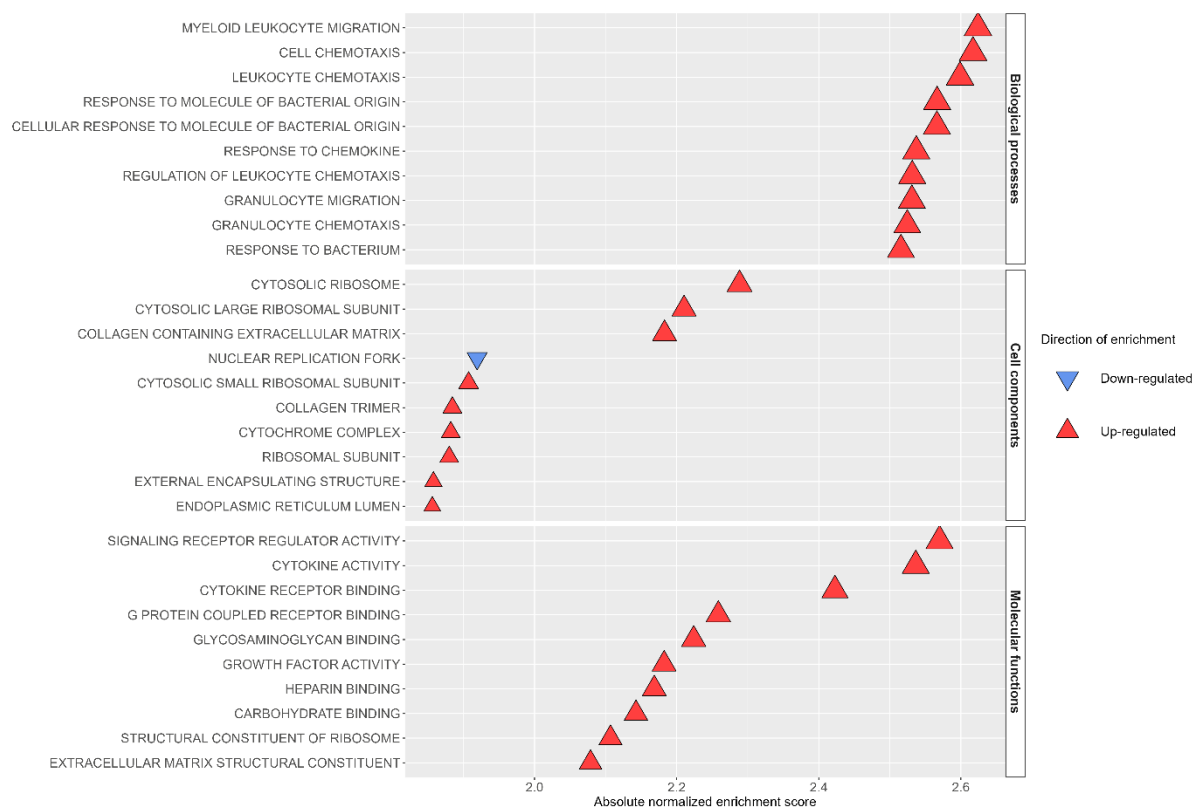
Függelék 3. ábra. GSE analízis HaCaT sejtek *C. parapsilosis* fertőzését követően. Az ábra a HaCaT keratinociták biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be, mely folyamatok felül- vagy alulszabályozottak a fertőzést követően. Az abszolút normalizált feldúsulási pontszám jelöli, hogy az egyes génkészletek (útvonalak) esetében, az adott génkészletben (útvonalban) szereplő tagok (génnek) milyen gyakran szerepelnek.



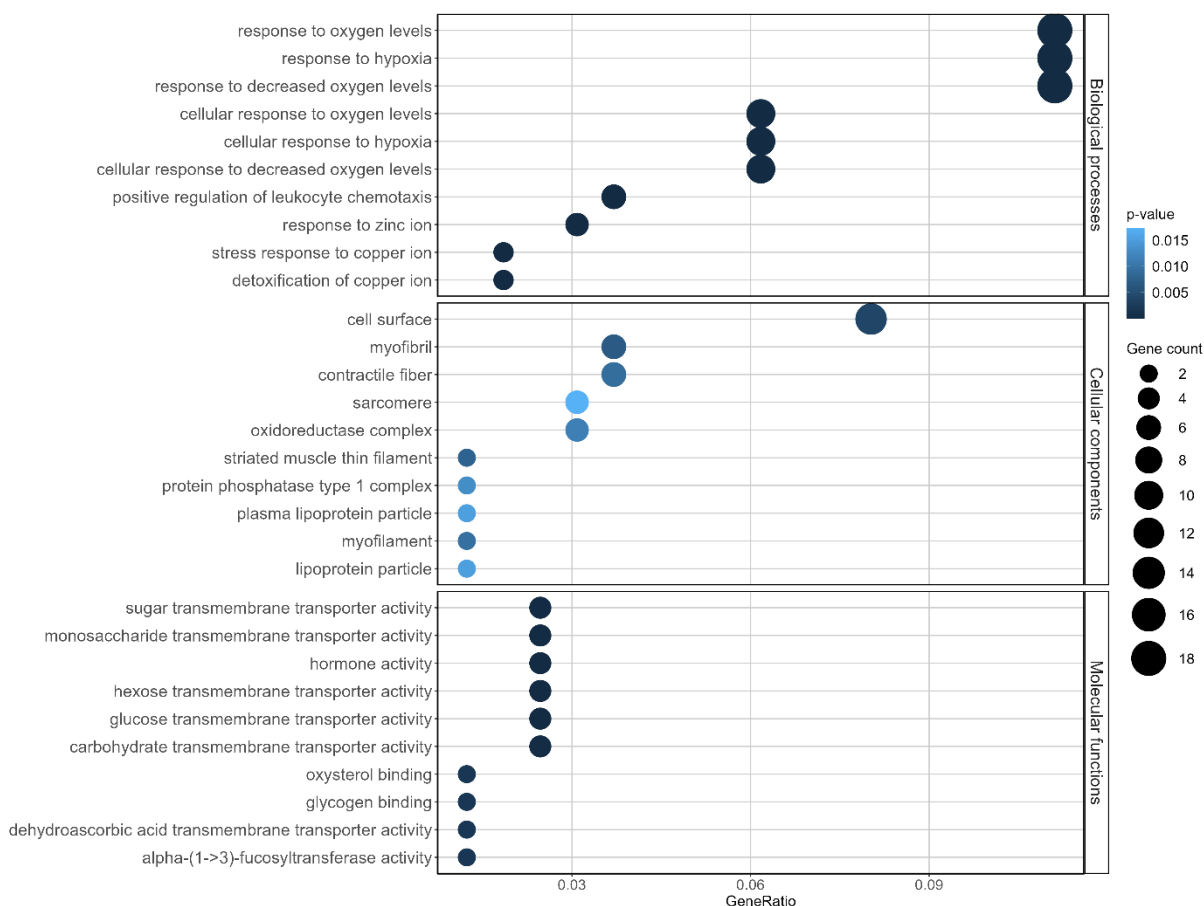
Függelék 4. ábra. GSE analízis HaCaT sejtek *C. albicans* fertőzését követően. Az ábra a HaCaT keratinociták biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be, mely folyamatok felül- vagy alulszabályozottak a fertőzést követően. Az abszolút normalizált feldúsulási pontszám jelöli, hogy az egyes génkészletek (útvonalak) esetében, az adott génkészletben (útvonalban) szereplő tagok (gének) milyen gyakran szerepelnek.



Függelék 5. ábra. GSE analízis HPV-KER sejtek *C. parapsilosis* fertőzését követően. Az ábra a HPV-KER keratinociták biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be, mely folyamatok felül- vagy alulszabályozottak a fertőzést követően. Az abszolút normalizált feldúsulási pontszám jelöli, hogy az egyes génkészletek (útvonalak) esetében, az adott génkészletben (útvonalban) szereplő tagok (gének) milyen gyakran szerepelnek.



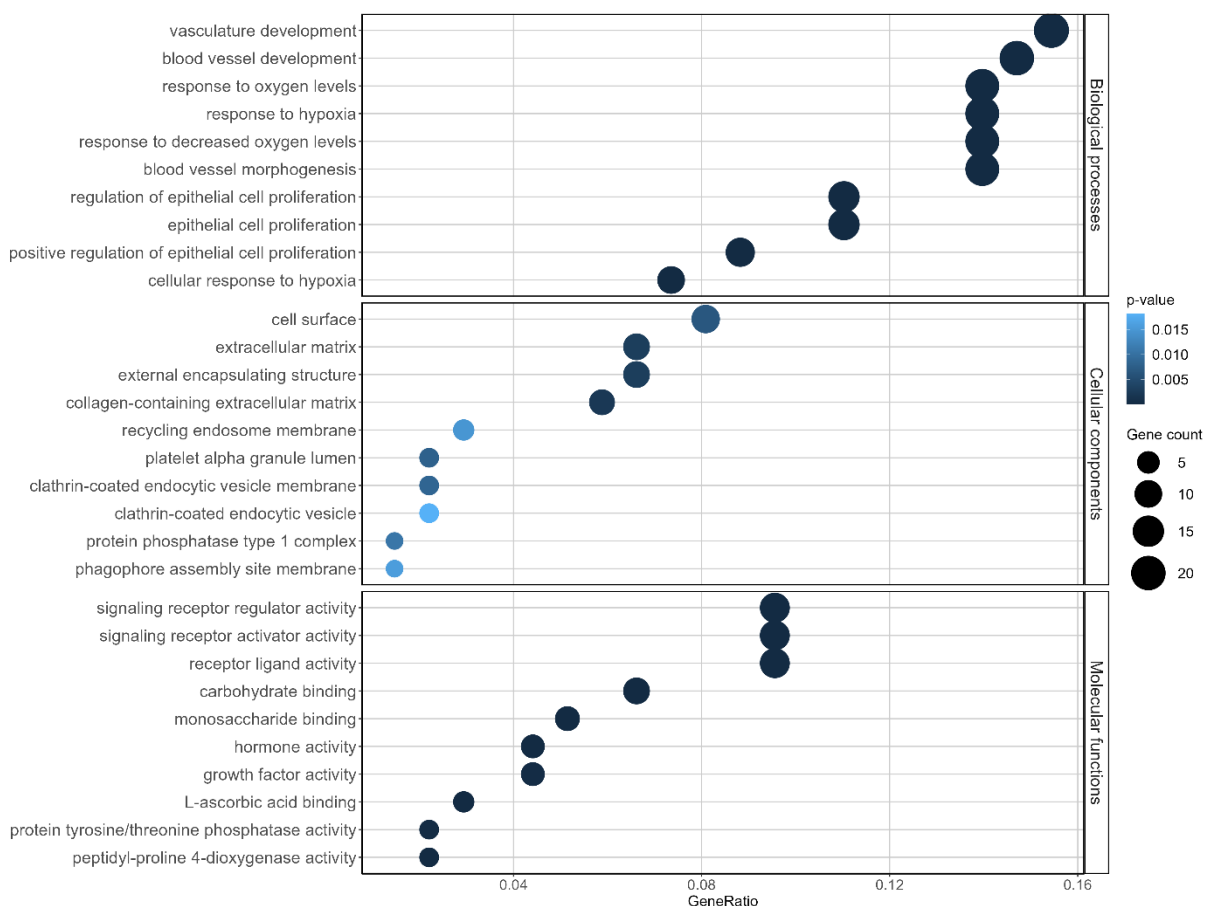
Függelék 6. ábra. GSE analízis HPV-KER sejtek *C. albicans* fertőzését követően. Az ábra a HPV-KER keratinociták biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be, mely folyamatok felül- vagy alulszabályozottak a fertőzést követően. Az abszolút normalizált feldúsulási pontszám jelöli, hogy az egyes génkészletek (útvonalak) esetében, az adott génkészletben (útvonalban) szereplő tagok (génnek) milyen gyakran szerepelnek.



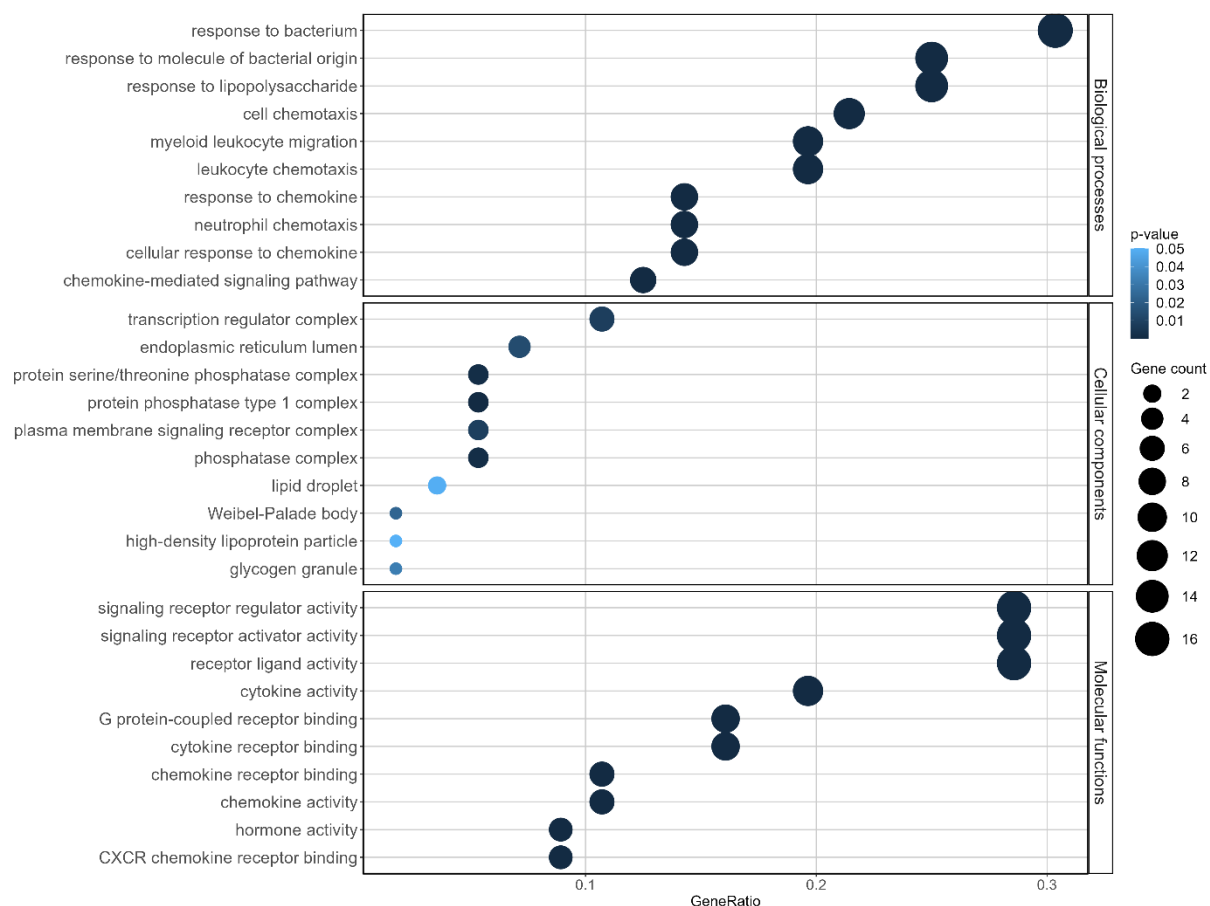
Függelék 7. ábra. Gén ontológiai analízis HaCaT keratinociták *C. parapsilosis* gombával történő fertőzését követően. Az ábra a HaCaT sejtek biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be a megnövekedett génexpressziót mutató gének számát és p-értékét. A kör nagysága a génszámmal arányos, a p-érték a szignifikancia szintet jelöli (mélyebb szín, szignifikánsabb génexpressziót jelöl). A génarány a kérdéses folyamatban szerepet játszó összes génhez viszonyítva mutatja meg, mely gének fejeződtek ki az adott folyamatban.



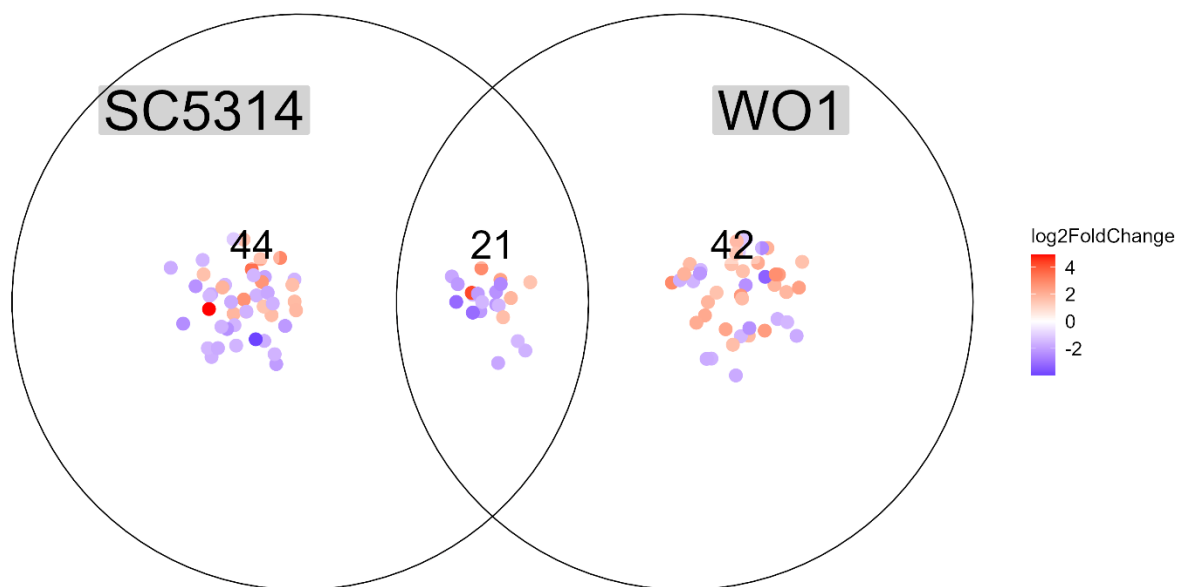
Függelék 8. ábra. Gén ontológiai analízis HaCaT keratinociták *C. albicans* gombával történő fertőzését követően. Az ábra a HaCaT sejtek biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be a megnövekedett génexpressziót mutató gének számát és p-értékét. A kör nagysága a génszámmal arányos, a p-érték a szignifikancia szintet jelöli (mélyebb szín, szignifikánsabb génexpressziót jelöl). A génarány a kérdéses folyamatban szerepet játszó összes génhez viszonyítva mutatja meg, mely gének fejeződtek ki az adott folyamatban.



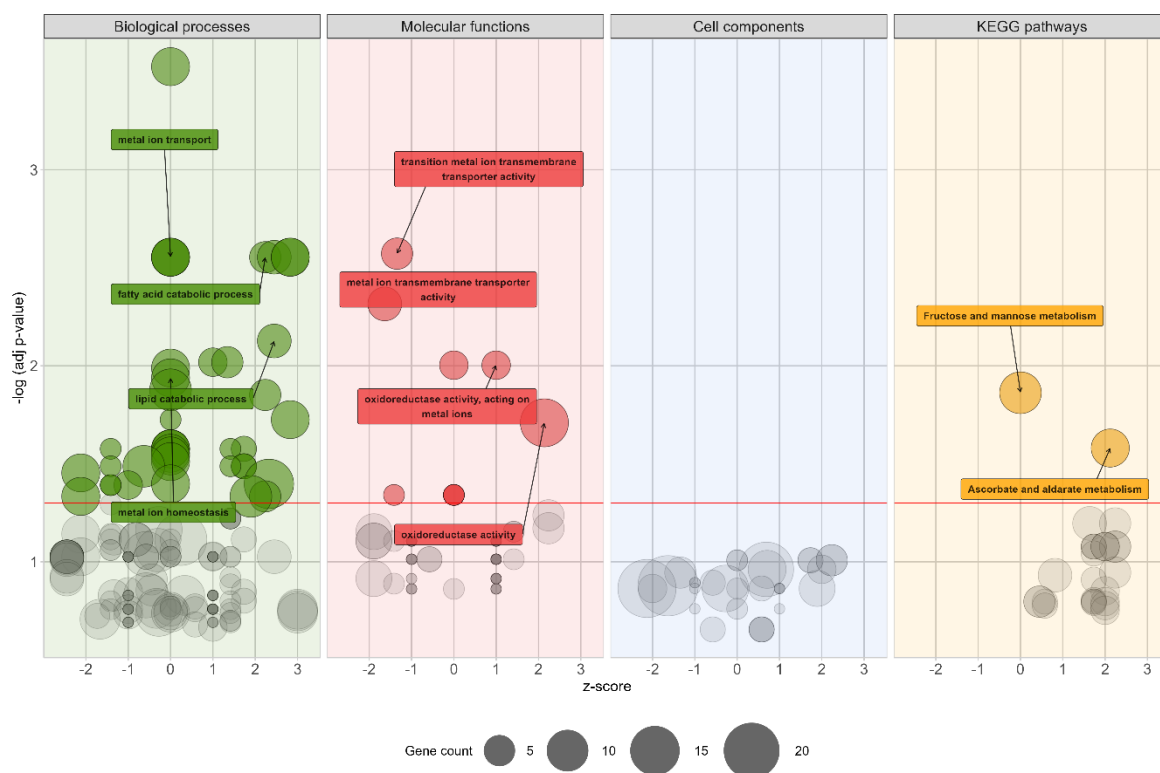
Függelék 9. ábra. Gén ontológiai analízis HPV-KER keratinociták *C. parapsilosis* gombával történő fertőzését követően. Az ábra a HPV-KER sejtek biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be a megnövekedett génexpressziót mutató gének számát és p-értékét. A kör nagysága a génszámmal arányos, a p-érték a szignifikancia szintet jelöli (mélyebb szín, szignifikánsabb génexpressziót jelöl). A génarány a kérdéses folyamatban szerepet játszó összes génhez viszonyítva mutatja meg, mely gének fejeződtek ki az adott folyamatban.



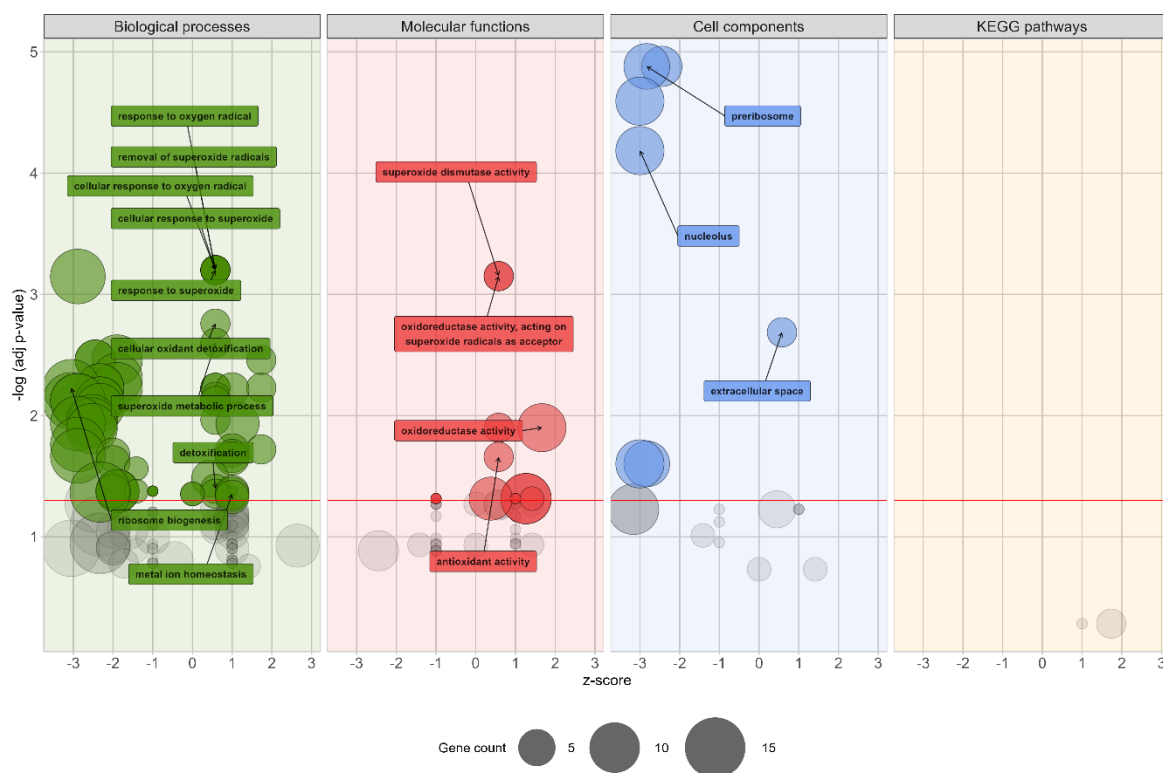
Függelék 10. ábra. Gén ontológiai analízis HPV-KER keratinociták *C. albicans* gombával történő fertőzését követően. Az ábra a HPV-KER sejtek biológiai folyamatai, sejtkomponensei és molekuláris funkciói aspektusában mutatja be a megnövekedett génexpressziót mutató gének számát és p-értékét. A kör nagysága a génszámmal arányos, a p-érték a szignifikancia szintet jelöli (mélyebb szín, szignifikánsabb génexpressziót jelöl). A génarány a kérdéses folyamatban szerepet játszó összes génhez viszonyítva mutatja meg, mely gének fejeződtek ki az adott folyamatban.



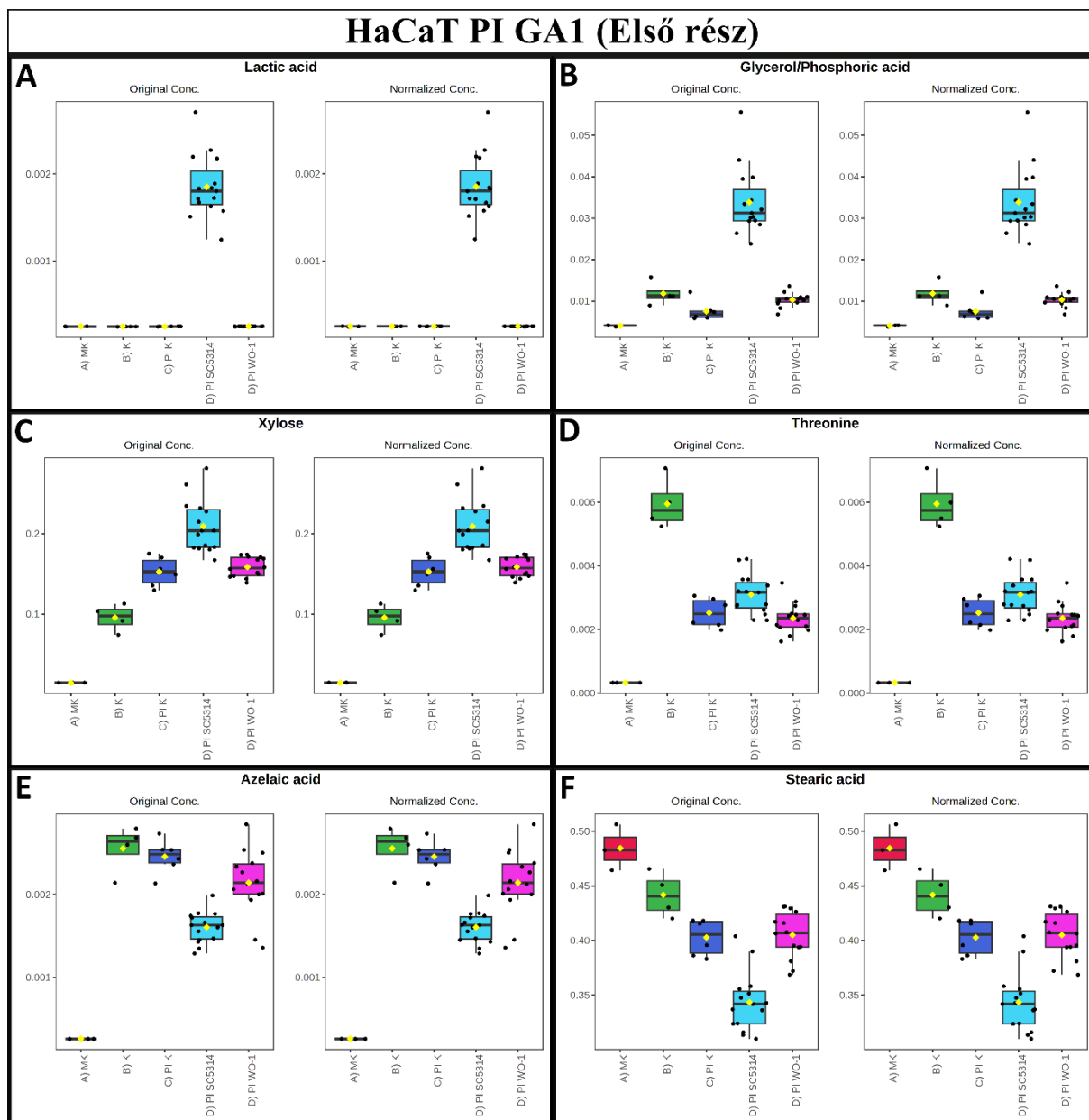
Függelék 11. ábra. A keratinocita sejt-*Candida* gomba interakció során a *C. albicans* törzsek oldaláról változott expressziót mutató gének száma. A közös metszetben jelen lévő 21 gén (AOX2, C1_06340W_A, C1_12910W_A, C3_01540W_A, C5_03440W_A, C5_03710C_A, CSH1, DDR48, FET31, FOL1, FRE30, FRE7, HYR1, PHO89, QDR1, RBT5, SOD3, SOD4, TYE7, YWP1, ZRT2) mindkét törzs esetében megváltozott expressziót mutatott. Piros szín jelöli az emelkedett expressziót, kék szín a csökkent kifejeződést.



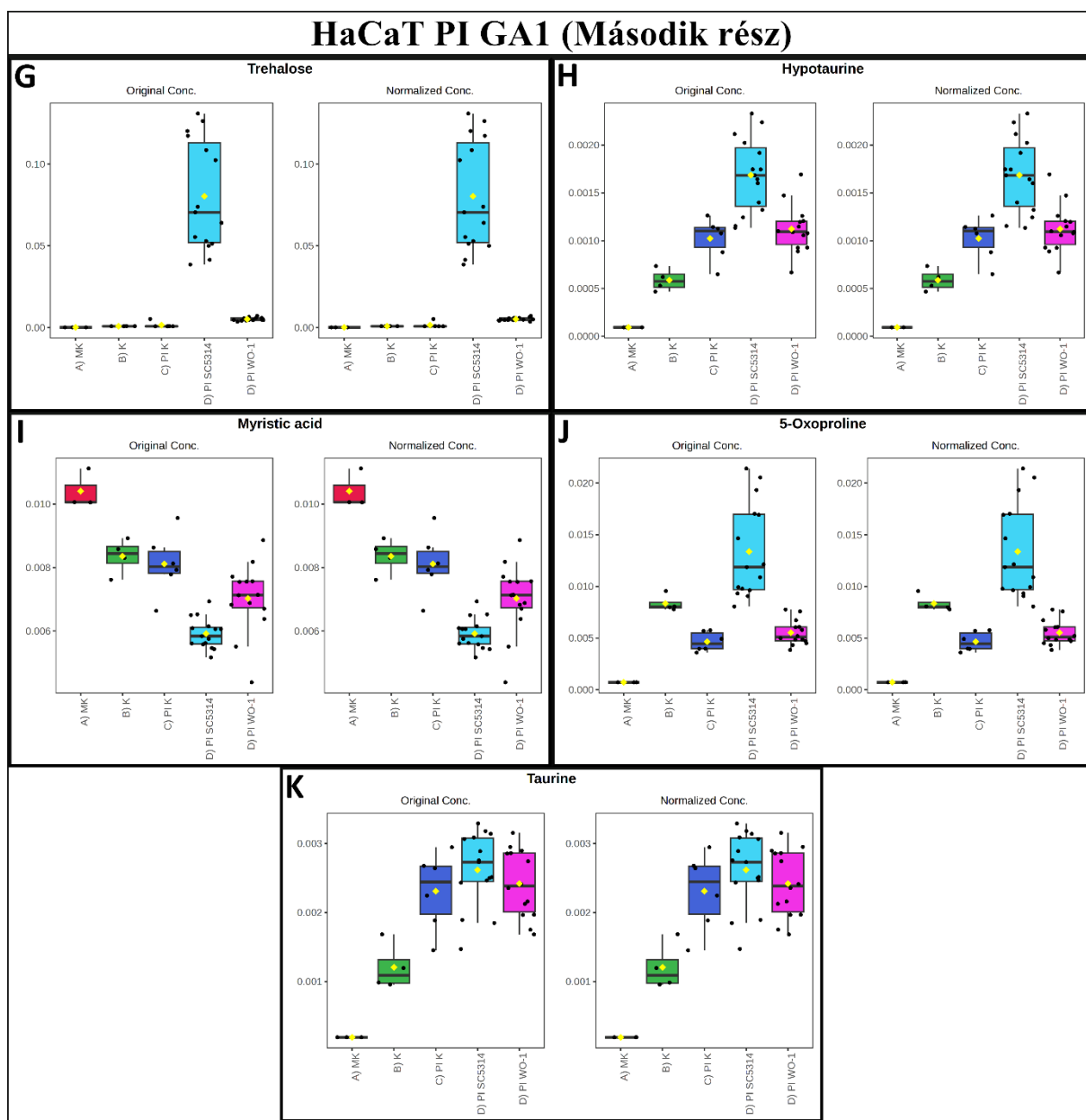
Függelék 12. ábra. A sejt-gomba interakciót követően a gomba oldaláról kapott plot-analízis. Az ábrán a *C. albicans* SC5314 törzsnél vizsgált biológiai folyamatok, molekuláris funkciók, sejtkomponensek és KEGG (Gének és Genomok Kiotói Enciklopédiája) útvonalak láthatóak. A határérték felett látható karikák emelkedett kifejeződést mutató folyamatokhoz kapcsolhatóak. Kiemeltük a jelentősebb változást képviselő folyamatokat. Az y-tengelyen látható a p-érték, amely a szignifikancia szinttel arányos. A z-érték az átlagos szórástól való pozitív és negatív eltérés mértékét határozza meg. A kör mérete az adott folyamatban emelkedett kifejeződést mutató gének számának mennyiségét reprezentálja.



Függelék 13. ábra. A sejt-gomba interakciót követően a gomba oldaláról kapott plot-analízis. Az ábrán a *C. albicans* WO-1 törzsnél vizsgált biológiai folyamatok, molekuláris funkciók, sejtkomponensek és KEGG (Gének és Genomok Kiotói Enciklopédiája) útvonalak láthatóak. A határérték felett látható karikák emelkedett kifejeződést mutató folyamatokhoz kapcsolhatóak. Kiemeltük a jelentősebb változást képviselő folyamatokat. Az y-tengelyen látható a p-érték, amely a szignifikancia szinttel arányos. A z-érték az átlagos szórástól való pozitív és negatív eltérés mértékét határozza meg. A kör mérete az adott folyamatban emelkedett kifejeződést mutató gének számának mennyiségét reprezentálja.

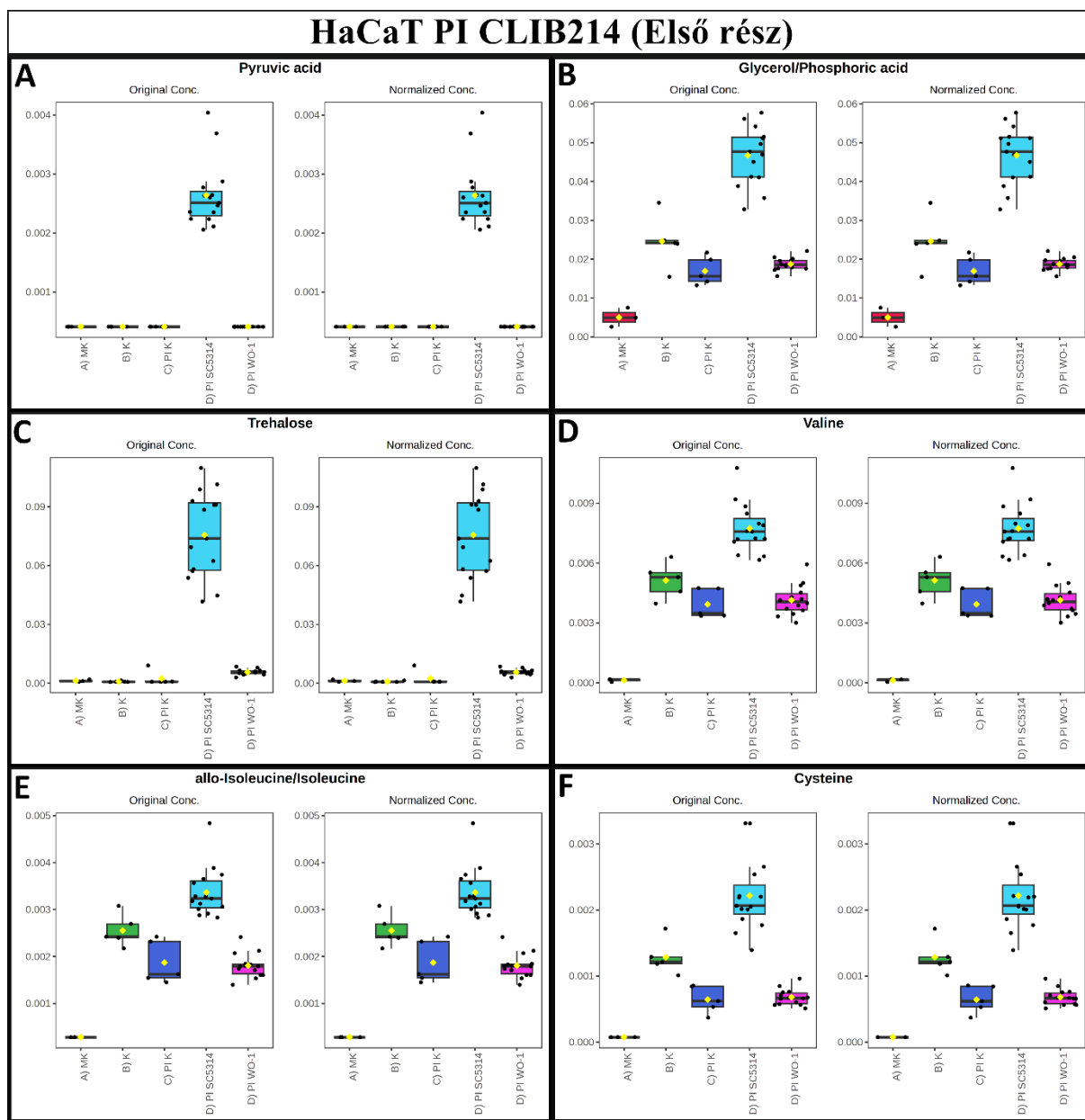


Függelék 14. ábra. Az ábrán a HaCaT sejtek által élő *C. parapsilosis* GA1 törzzsel történt előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok mennyisége látható (első rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-incubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). A: Laktát, B: Glicerín/Foszforsav, C: Xilóz, D: Treonin, E: Azelainsav, F: Sztearinsav.



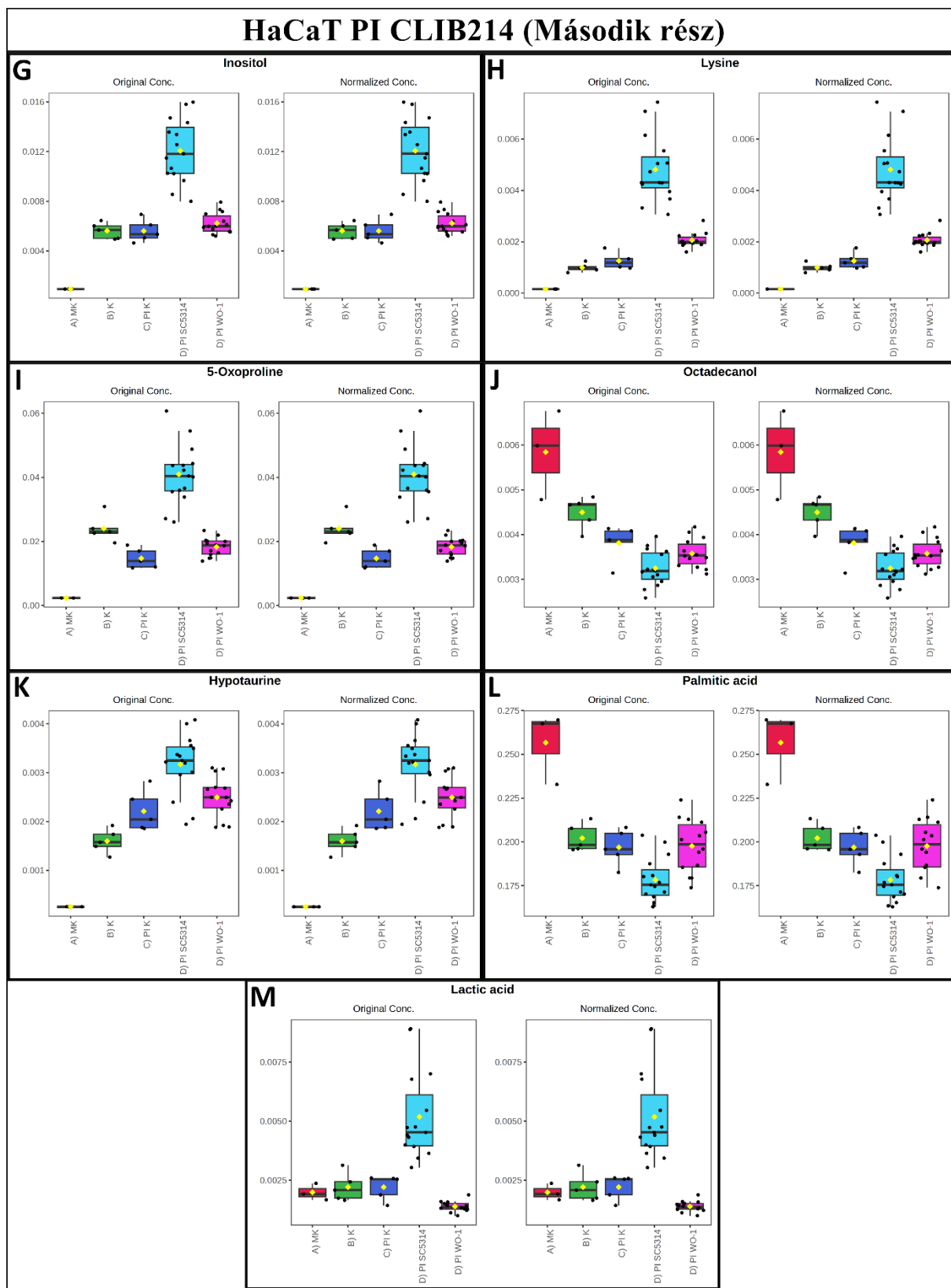
Függelék 15. ábra. Az ábrán a HaCaT sejtek által élő *C. parapsilosis* GA1 törzzsel történt előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok mennyisége látható (második rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C.*

parapsilosis előinkubációs fertőzéssel). G: Trehalóz, H: Hipotaurin, I: Mirisztinsav, J: 5-oxoprolin, K: Taurin.



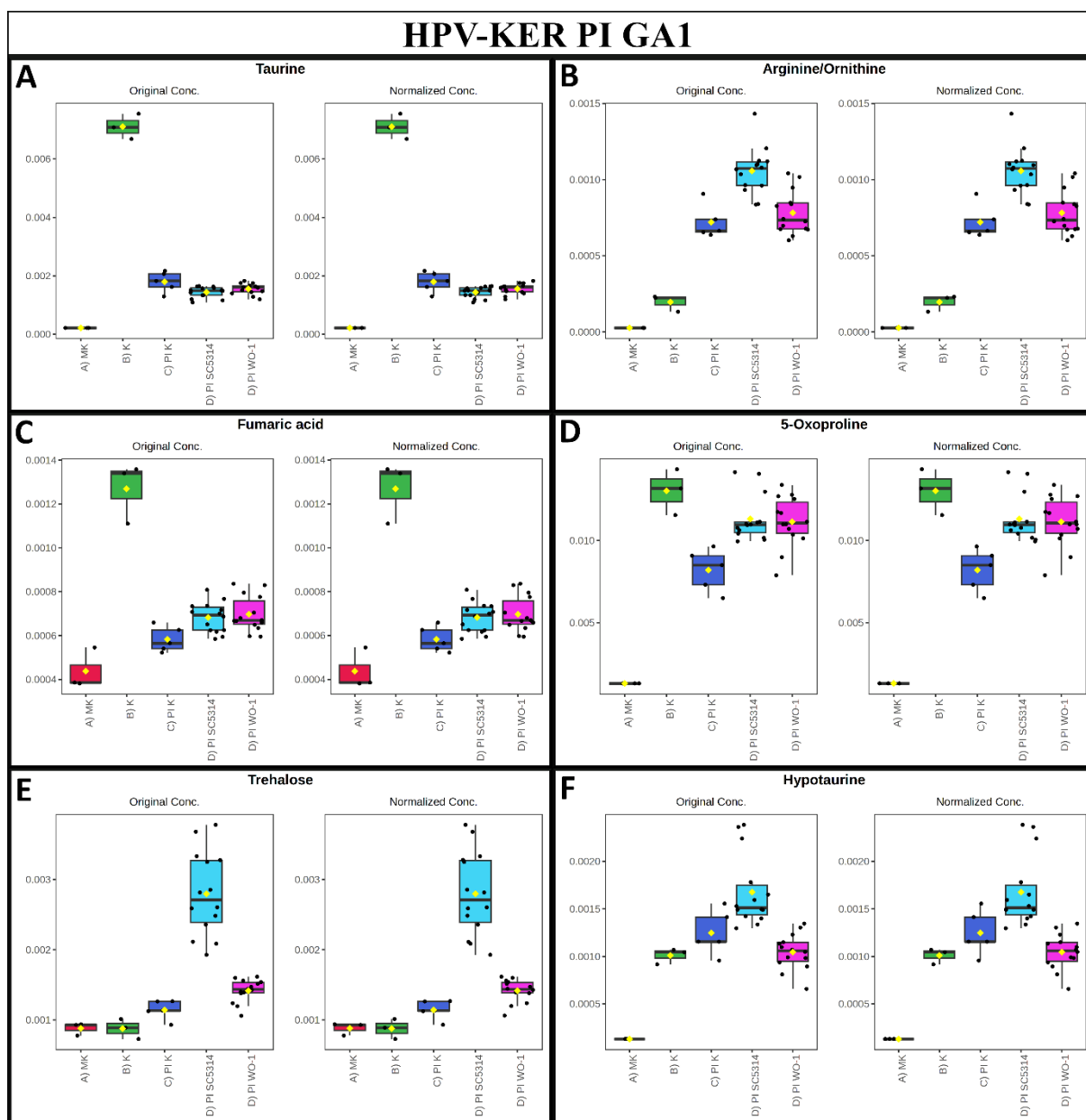
Függelék 16. ábra. Az ábrán a HaCaT sejtek által élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzzsel végzett előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok mennyisége látható (első rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll

(keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). A: Piruvát, B: Glicerín/Foszforsav, C: Trehalóz, D: Valin, E: Allo-izoleucin/Izoleucin, F: Cisztein.



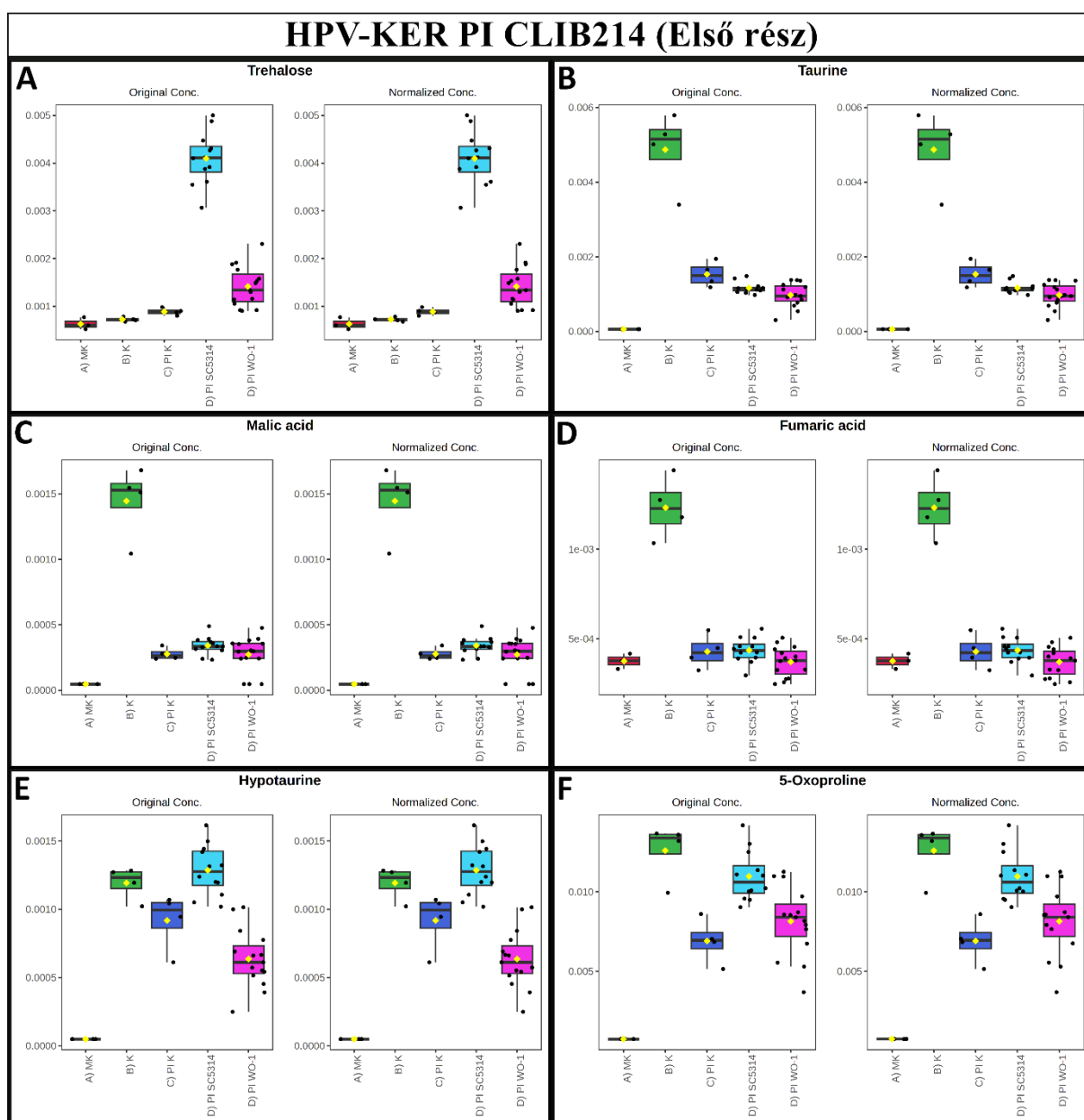
Függelék 17. ábra. Az ábrán a HaCaT sejtek által élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel végzett előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok mennyisége látható (második rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia

négyszetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). G: Inozitol, H: Lizin, I: 5-oxoprolin, J: Oktadekanol, K: Hipotaurin, L: Palmitinsav, M: Laktát.



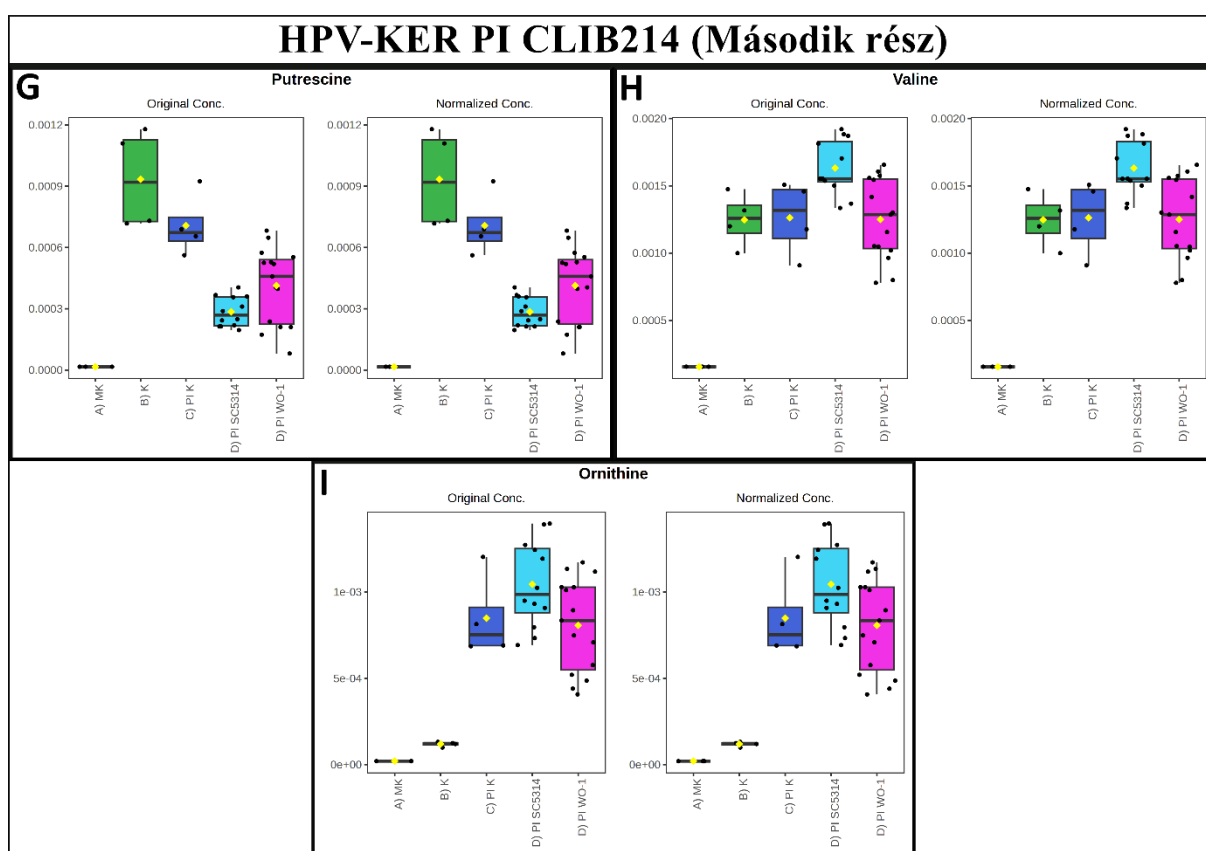
Függelék 18. ábra. Az ábrán a HPV-KER sejtek által élő *C. parapsilosis* GA1 törzzsel végzett előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok

menyisége látható. Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). A: Taurin, B: Arginin/Ornitin, C: Fumársav, D: 5-oxoprolin, E: Trehalóz, F: Hipotaurin.



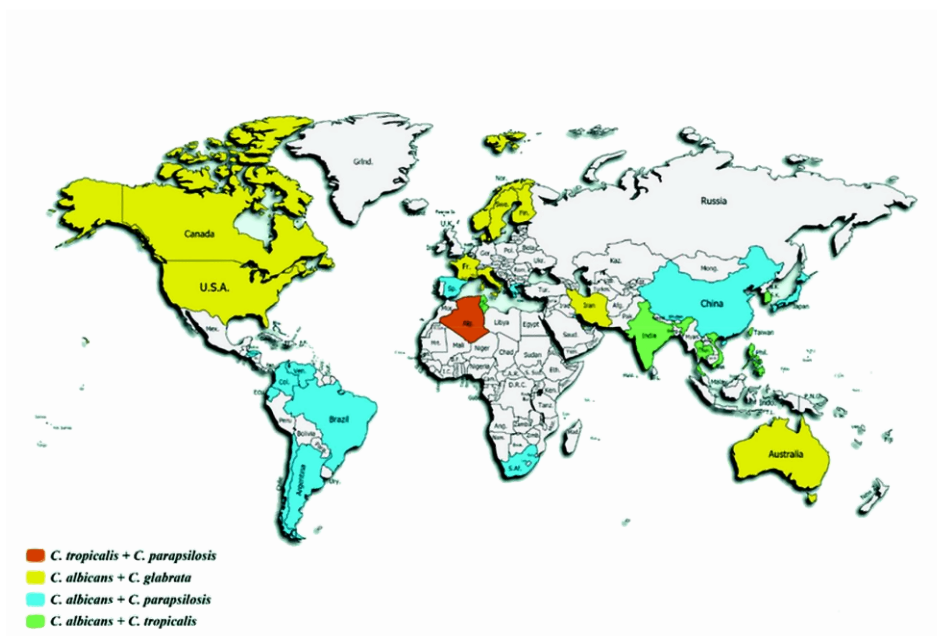
Függelék 19. ábra. Az ábrán a HPV-KER sejtek által élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzsszel végzett előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált

metabolitok mennyisége látható (első rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport), K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). A: Trehalóz, B: Taurin, C: Almasav, D: Fumársav, E: Hipotaurin, F: 5-oxoprolin.



Függelék 20. ábra. Az ábrán a HPV-KER sejtek által élő *C. parapsilosis* CLIB214 törzzsel végzett előinkubációs fertőzést követő *C. albicans* fertőzésre bekövetkező szekretált metabolitok mennyisége látható (második rész). Az adott metabolit szekréciójának mértéke a variancia négyzetek egyenlőségének statisztikai értékelésére szolgáló f-próba alapján történt (az f-próba határértéke 15.0 volt). Az x-tengelyen a kezelések, az y-tengelyen a GC-MS méréssel kapott adott metabolit görbe alatti területe látható, amely arányos a kimutatott metabolit mennyiségével. MK=médium kontroll (csak tápoldatot tartalmazó csoport),

K=kontroll (keratinocita sejtek tápoldatban), PI K=Pre-inkubációs kontroll (keratinocita sejtek csak *C. parapsilosis* előinkubációs fertőzéssel). G: Putreszcin, H: Valin, I: Ornitin.



Függelék 21. ábra. A kandidémiát okozó nem-*albicans* *Candida* fajok globális előfordulása (Arastehfar és mtsai., 2020).