

Humán defenzinek termelődése opportunista *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* hatására

Tiszlavicz Zoltán¹, Gácsér Attila², Németh Tibor², Seprényi György³, Mándi Yvette¹

Szegedi Tudományegyetem ¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet,
²Mikrobiológiai Tanszék, ³Orvosi Biológiai Intézet; Szeged

Bevezetés

Az opportunista *Candida* fajok gyakran megtalálhatóak az egészséges ember bélcsatornájában is anélkül, hogy betegséget okoznának. Számos faktor vezethet a gazdaszervezet csökkent antifungális védelméhez és akár életet veszélyeztető véráram infekciók (sepsis) kialakulásához. Az opportunista patogén sarjadzó gombák képesek a gazdaszervezet immunválaszát befolyásolni azáltal, hogy természetes antimikrobiális peptidok, a defenzinek termelődését indukálják mind a hámsejtekben, mind a neutrofil granulocytákban.

A humán defenzinek a természetes immunválasz fontos komponensei. A humán béta-defenzin 2-t (HBD2) elsősorban epithél sejtek termelik és erősen inducibilis különböző stimulusok hatására, mint például proinflammatorikus cytokinek és mikroorganizmusok. Széles spektrumú antimikrobiális hatással rendelkezik, bizonyítottan hatásos *Candidák* ellen is. A humán neutrofil peptid 1-3-at (HNP1-3, alfa-defenzin) neutrofil granulocyták termelik, és megfelelő stimulus hatására bocsátják ki a praeformált azurofil granulumaikból. Antifungális hatással is rendelkezik.

Célok

Célunk az *in vitro* *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* fertőzés hatásának vizsgálata a humán béta-defenzin 2 termelődésre Caco-2 intestinális epithél eredetű sejteken, illetve az alfa-defenzin felszabadulásra perifériás vérben.

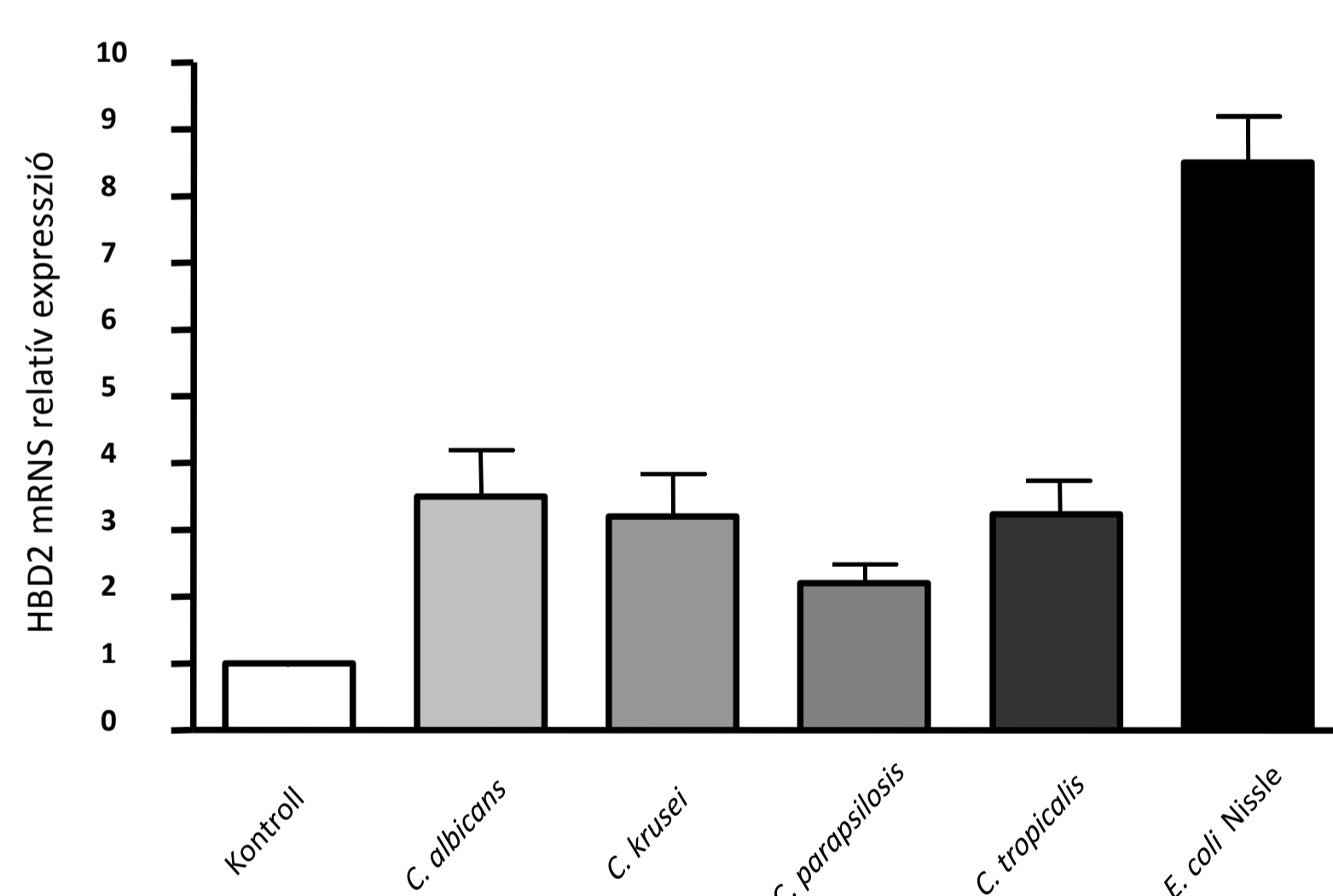
Módszerek

Caco-2 vastagbél epithél eredetű sejteket fertőztünk *in vitro* *Candida albicans*-szal, *krusei*-vel, *parapsilosis*-szal és *tropicalis*-szal 4, illetve 24 órán keresztül. Az inducibilis HBD2 mRNS relatív expresszióját valós idejű kvantitatív PCR-rel határoztuk meg. A sejten belüli HBD2 peptidet Western blot analízissel, illetve indirekt immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. A szekretált HBD2 szintet ELISA kit segítségével határoztuk meg a sejt-kultúrák felülúszóiban. Továbbá, humán perifériás vért is inkubáltunk a különböző *Candida* fajokkal 4 órán keresztül, és a neutrofil granulocytákból származó HNP1-3-at ELISÁ-val detektáltuk.

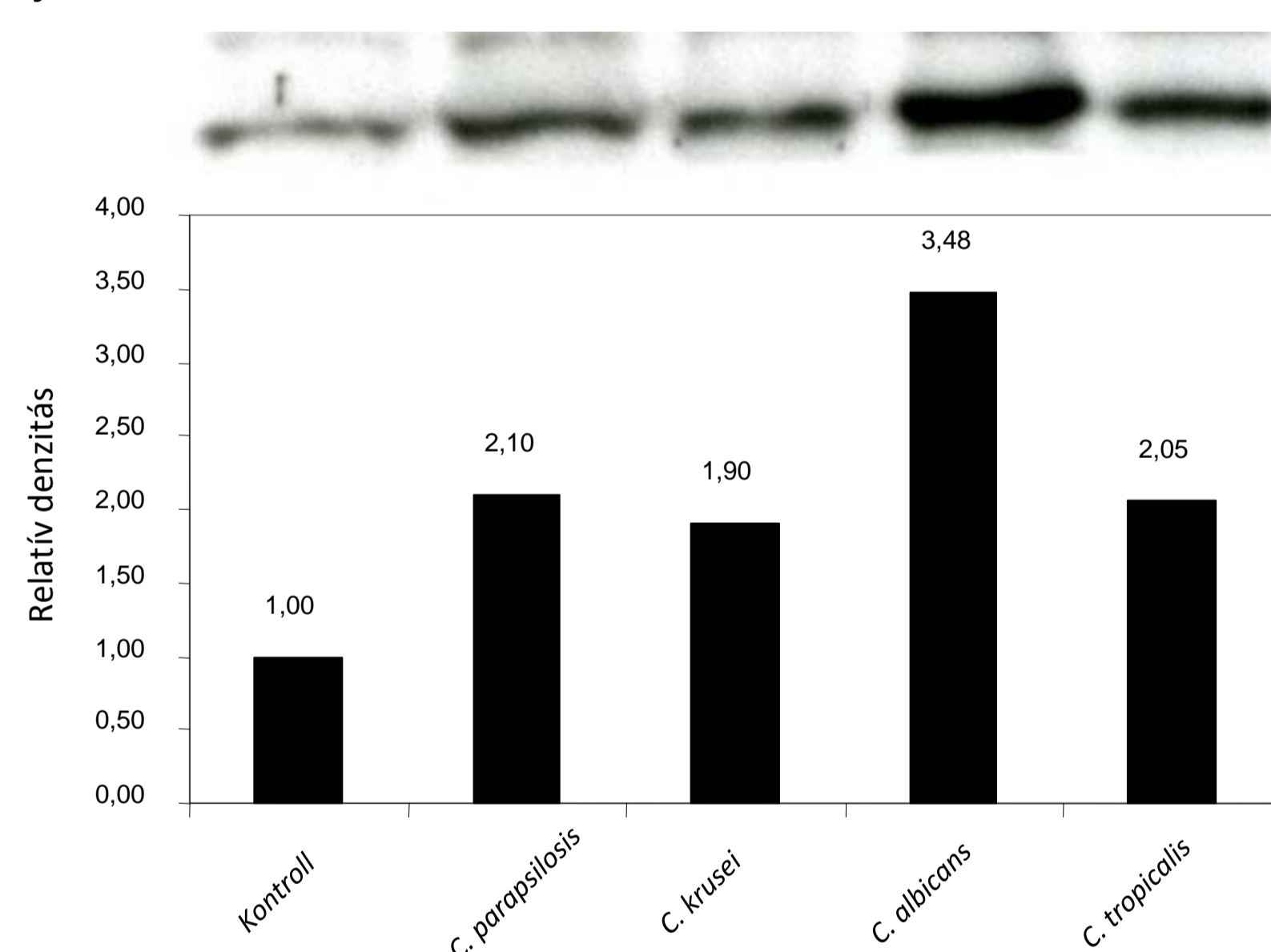
Eredmények

Az inducibilis HBD2 mRNS relatív expressziója fokozódott Caco-2 sejtekben *Candida* fertőzés hatására, legnagyobb mértékben a *C. albicans* fertőzést követően (**1. ábra**). Az *Escherichia coli* Nissle törzsét pozitív kontrollként alkalmaztuk. A HBD2 peptid intracellulárisan is megtalálható a Caco-2 sejtekben *Candida* fertőzés hatására; a legnagyobb jelet szintén a *C. albicans*-szal fertőzött sejtekben mértünk Western blottal (**2. ábra**), ill. immunfluoreszcens festéssel is (**3. ábra**). A **4. ábrán** jól látszik a HBD2 sejten belüli lokalizációja a *C. parapsilosis*-szal fertőzött Caco-2 sejtekben. Hasonlóképpen, a HBD2 peptid szekréció szignifikánsan magasabb volt az *in vitro* *C. albicans* fertőzés hatására ($13,5 \pm 5$ pg/ml), mint a *C. krusei*, a *C. tropicalis* vagy a *C. parapsilosis* fertőzést követően (**5. ábra**). A *C. albicans* fertőzés szignifikánsan nagyobb mennyiségű HNP1-3 peptid szekréciót eredményezett perifériás vérben, összehasonlítva a *Staphylococcus aureus*-szal történő *in vitro* fertőzés eredményével (600 ± 50 ng/ml vs. 150 ± 25 ng/ml) (**6. ábra**).

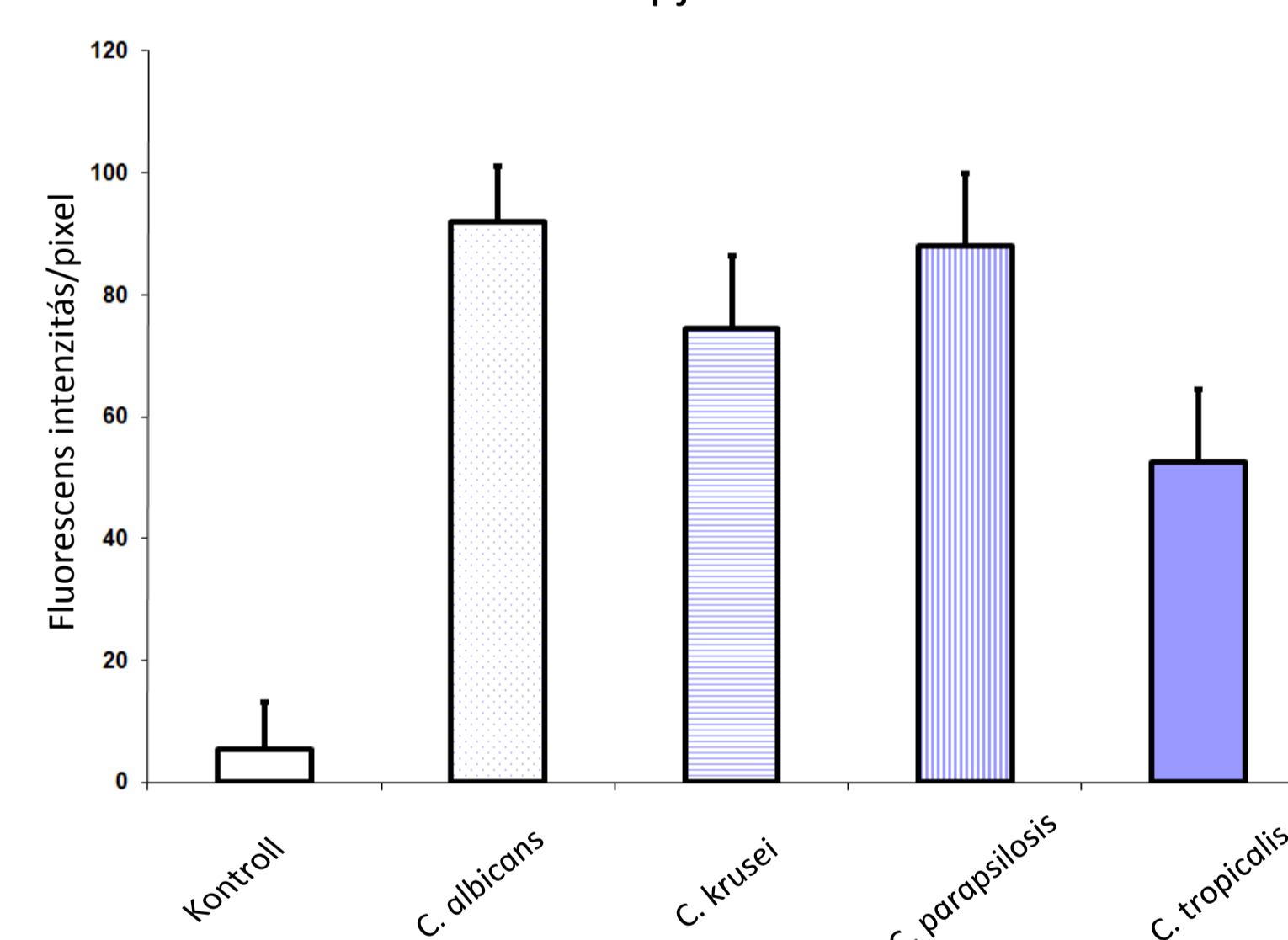
1. ábra HBD2 mRNS relatív expressziója Caco-2 sejtekben *Candida* fertőzés hatására (valós idejű kvantitatív PCR)



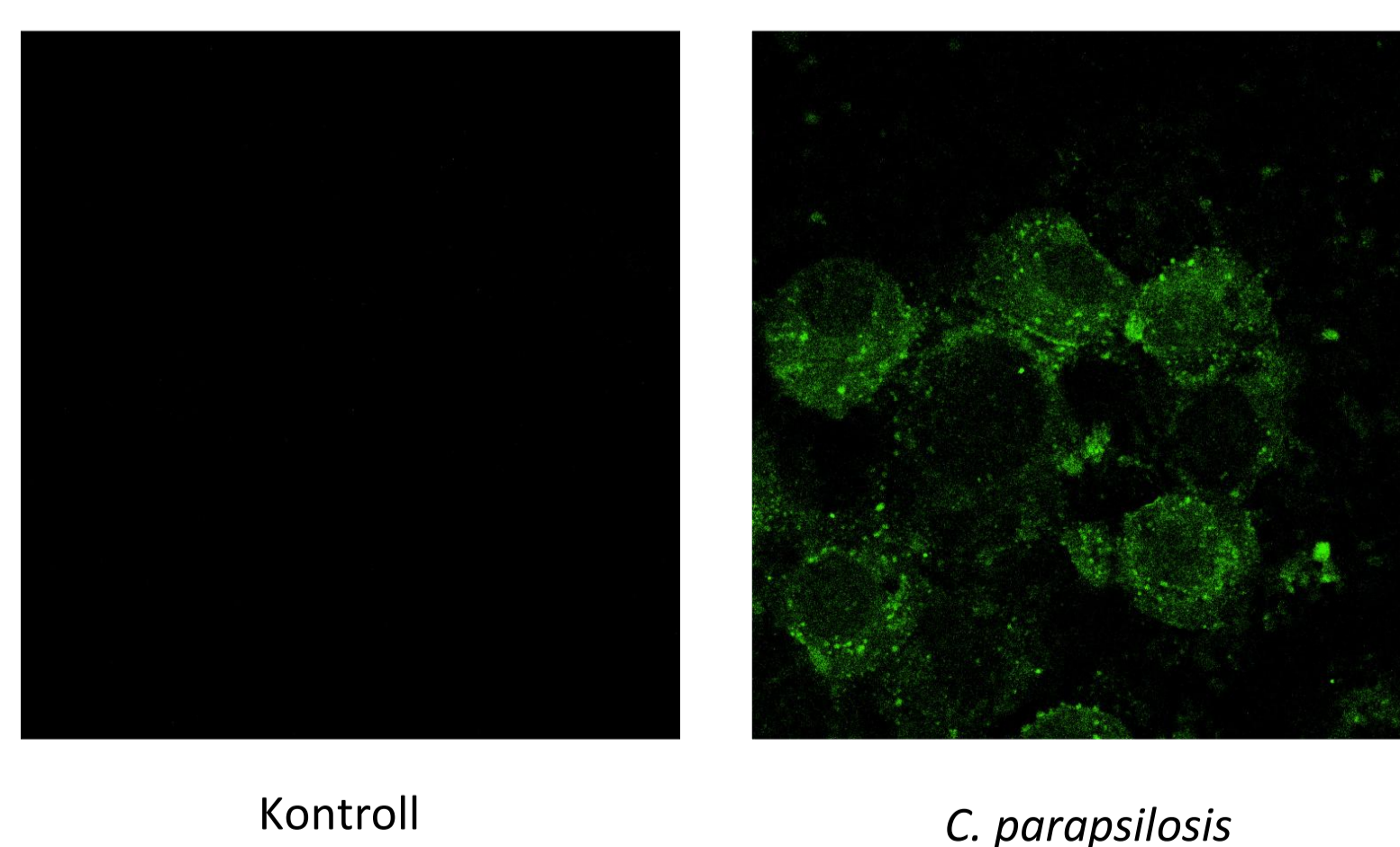
2. ábra Intracelluláris HBD2 peptid relatív denzitása Caco-2 sejtekben Western blot analízissel



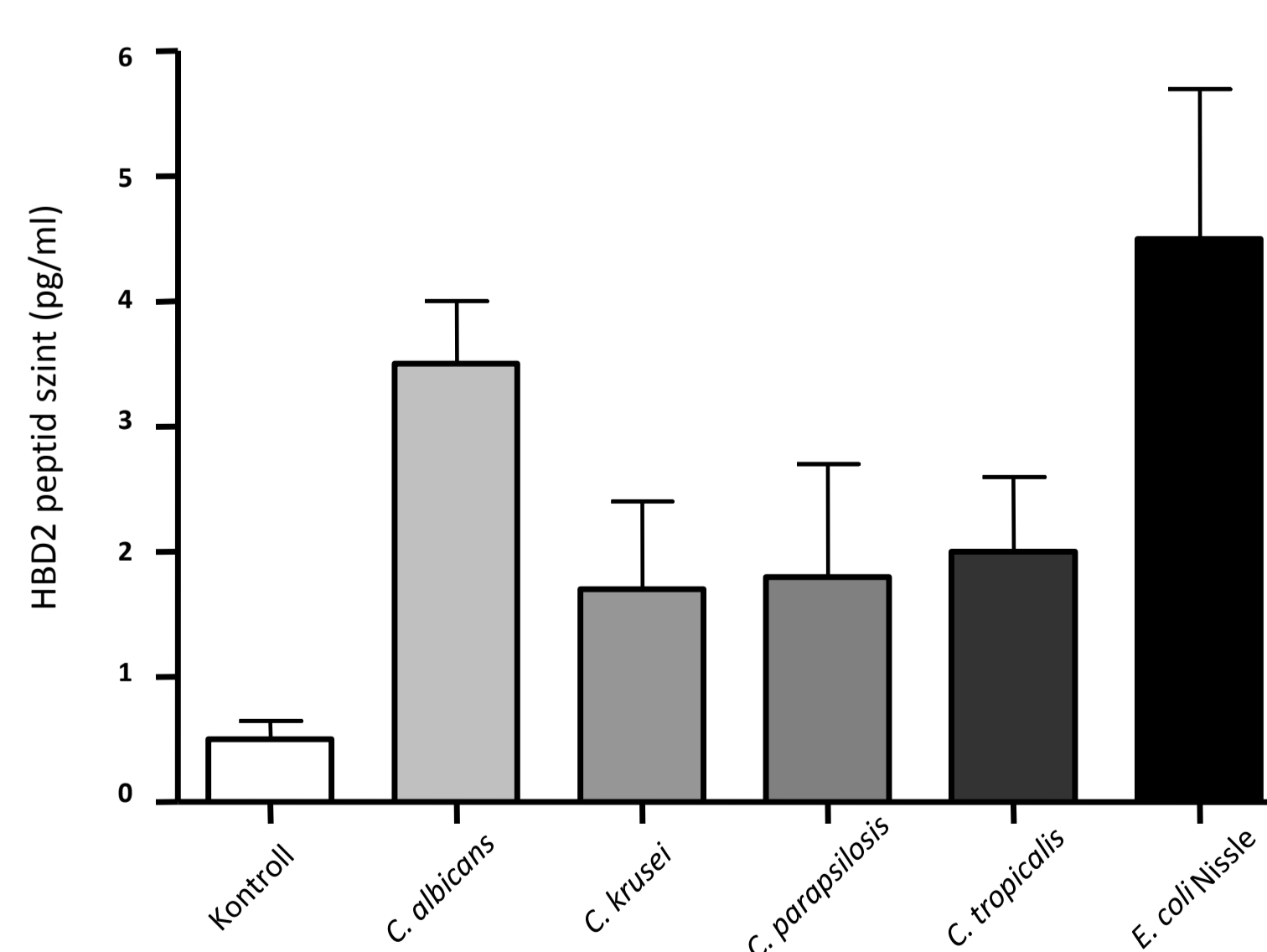
3. ábra Az *in vitro* fertőzött Caco-2 sejtekben termelődött HBD2 peptid kvantitatív kiértékelése az indirekt immunfluoreszcens festés alapján



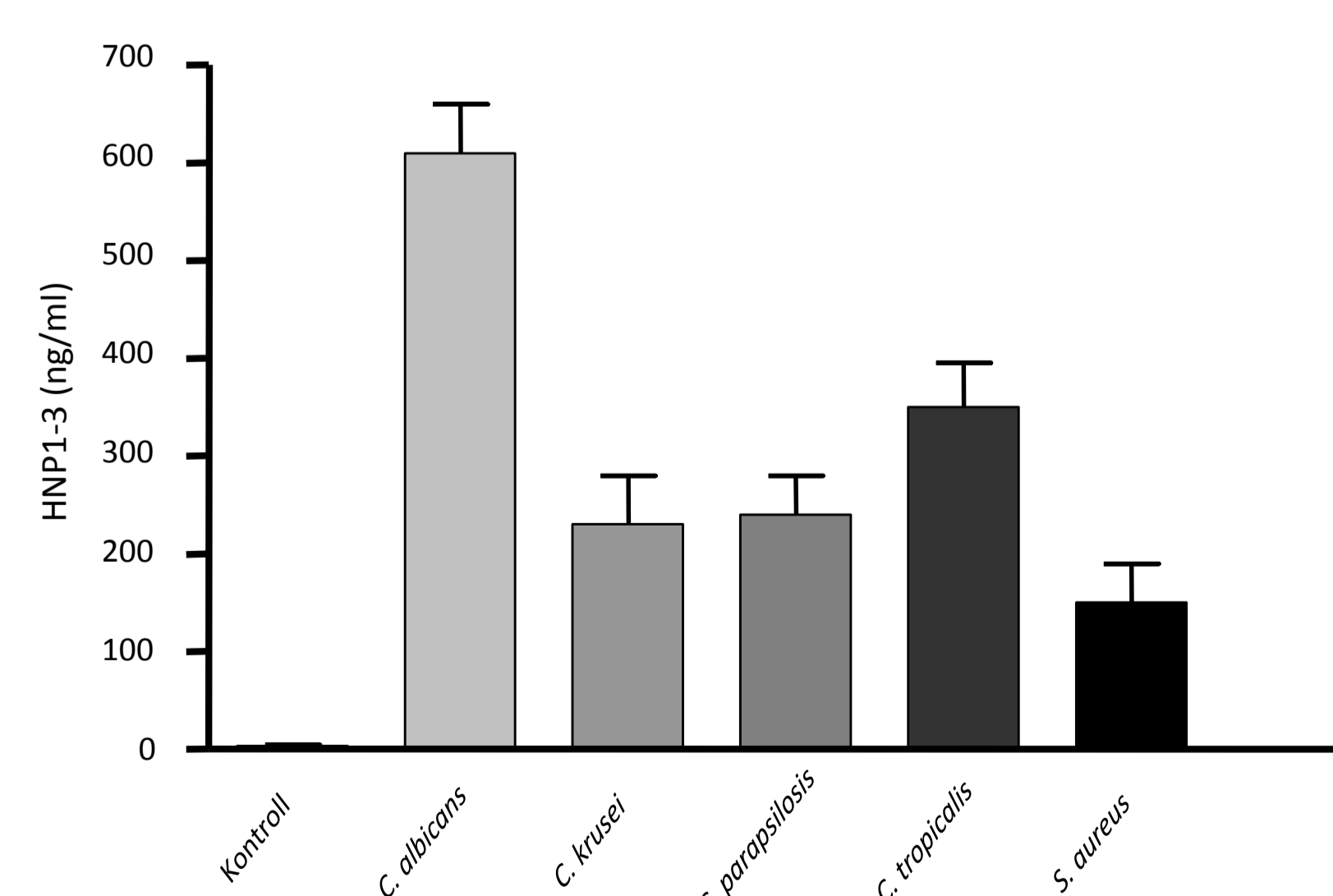
4. ábra Az intracelluláris HBD2 peptid lokalizációja *C. parapsilosis*-szal fertőzött Caco sejtekben (24 h) indirekt immunfluoreszcens festéssel



5. ábra Szekretált HBD2 peptid a *Candida*-val fertőzött Caco-2 sejtek felülúszóiban (ELISA)



6. ábra *In vitro* HNP1-3 indukció perifériás vérből (ELISA)



Következtetések

Vizsgálataink bizonyíthatják az intestinális epithél sejtek kiemelt szerepét a *Candida* infekciók elleni természetes antifungális védelemben. Továbbá, a *Candida* fertőzések szintén központi szerepet játszhatnak a neutrofil granulocyták alfa-defenzin szekréciójának kiváltásában.