



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Мирјана В. Папић

**Утицај сојних разлика Dark Agouti и
Albino Oxford пацова на патогенезу
експерименталних модела оралне
кандидијазе**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Mirjana V. Papić

**Uticaj sojnih razlika Dark Agouti i Albino
Oxford pacova na patogenezu
eksperimentalnih modela oralne
kandidijaze**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Mirjana V. Papic

**Influence of strain differences between
Dark Agouti and Albino Oxford rats on the
pathogenesis of different models of oral
candidiasis**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023

Аутор
Име и презиме: Мирјана Папић
Датум и место рођења: 29.12.1990. године у Крагујевцу
Садашње запослење: асистент за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Утицај сојних разлика Dark Agouti и Albino Oxford пацова на патогенезу експерименталних модела оралне кандидијазе
Број страница: 122
Број слика: 5 фигура, 6 слика, 32 графика и 36 табела
Број библиографских података: 229
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: доц. др Марина Милетић Ковачевић, доцент за ужу научну област Хистологија и ембриологија, Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 31.01.2023. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-423/14 од 14.06.2023. год.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"> 1. Доц. др Раша Младеновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија, председник; 2. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 3. Доц. др Милица Гајић, доцент Стоматолошког факултета у Панчеву Универзитета Привредна академија у Новом Саду за ужу научну област Клиничка стоматологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"> 1. , председник; 2. , члан; 3. , члан.
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Mirjana Papić
Datum i mesto rođenja: 29.12.1990. godine u Kragujevcu
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Preventivna i dečja stomatologija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj sojnih razlika Dark Agouti i Albino Oxford pacova na patogenezu eksperimentalnih modela oralne kandidijaze
Broj stranica: 122
Broj slika: 5 figura, 6 slika, 32 grafika i 36 tabela
Broj bibliografskih podataka: 229
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: doc. dr Marina Miletić Kovačević, docent za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 31.01.2023. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-423/14 od 14.06.2023. god.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none"> 1. doc. dr Raša Mladenović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Preventivna i dečja stomatologija, predsednik; 2. prof. dr Irena Tanasković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, član; 3. doc. dr Milica Gajić, docent Stomatološkog fakulteta u Pančevu Univerziteta Privredna akademija u Novom Sadu za užu naučnu oblast Klinička stomatologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: <ol style="list-style-type: none"> 1. , predsednik; 2. , član; 3. , član.
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Mirjana Papic
Date and place of birth: 29.12.1990. Kragujevac
Current employment: assistant, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Influence of strain differences between Dark Agouti and Albino Oxford rats on the pathogenesis of different models of oral candidiasis
No. of pages: 122
No. of images: 5 figures, 6 images, 32 graphs and 36 tables
No. of bibliographic data: 229
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Assis. prof. Marina Miletic Kovacevic, Assistant Professor, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 31.01.2023.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-423/14 from 14.06.2023.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none"> 1. Assoc. prof. Biljana Lujic, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Preventive and Pediatric Dentistry, President; 2. Assoc. prof. Irena Tanaskovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Histology and Embryology, member; 3. Assis. prof. Milica Gajic, Assistant Professor at the Faculty of dentistry in Pancevo, University Business Academy in Novi Sad, for the narrow scientific field of Clinical Dentistry, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation: <ol style="list-style-type: none"> 1. , President; 2. , member; 3. , member.
Date of Dissertation Defense:

Посебну захвалност дугујем својој менторки доц.др Марини Милетић Ковачевић на позитивној и пријатној атмосфери током израде ове докторске дисертације. Захваљујем јој на разумевању, подршци, поверењу и великој професионалној и стручној помоћи.

Захвалност дугујем проф. др Биљани Љујић на огромној помоћи и саветима како у експерименталном, тако и у научном раду.

Захваљујем се тиму проф. Биљане Љујић, Сандри Николић и доц. др Марини Газдић Јанковић на помоћи у експерименталном раду и пријатељству.

Захваљујем се Декану проф. др Владимиру Јаковљевићу и његовом тиму на челу са проф. др Владимиром Живковићем на слободном и пријатном раду у њиховој лабораторији.

Захваљујем се свом тиму доц. др Сузани Живановић и др Миони Вулетић које су олакшале експериментални рад и у сваком тренутку пружале подршку и пријатељство.

Посебну захвалност дугујем свом супругу доц. др Милошу Папићу који је био део сваког дела ове докторске дисертације, где је још једном показао своју огромну професионалност. Хвала на разумевању, стрпљењу и безусловној подршци.

Захваљујем се и својој породици који су били подршка од самог почетка мог школовања.

Ову докторску дисертацију посвећујем

Свом тати, Вучети Радовићу

САЖЕТАК

Увод: Орална кандидијаза је инфекција слузокоже усне дупље коју изазива опортунистички патоген, *C. albicans*. Најчешће настаје у имунокомпромитованих, али се може јавити и код здравих појединаца. Генске варијације имају утицај на подложност гљивичним инфекцијама и модулацију имунског одговора. Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (АО) пацови су инбредни сојеви са јасно детерминисаним генским профилима и разликама у осетљивости на бројне инфламаторне стимулусе и експерименталну индукцију болести.

Циљ: Испитивање сојних разлика DA и АО пацова у индукцији, прогресији и типу имунског одговора на оралну кандидијазу изазвану различитим експерименталним моделима.

Материјал и методе: Истраживање је обухватило 35 DA и 35 АО пацова, мушког пола, старости 8 недеља. Индукција оралне кандидијазе је извршена употребом три експериментална модела. Брисом је потврђено присуство *C. albicans*. Експеримент је трајао 16 дана, након чега су животиње жртвоване и прикупљени узорци крви и ткива језика за хистолошку, имунохистохемијску, qRT-PCR, ELISA и спектрофотометријску анализу.

Резултати: Већа колонизација *C. albicans*, веће оштећење и већи инфламаторни инфилтрат детектован је у АО соју пацова. АО сој је показао већи број CD45, CD3, CD68, али и мањи број HIS 48 позитивних ћелија у односу на DA сој. Експресије IFN- γ , IL-1 β , TNF α , TGF- β 1 и IL-10 су биле мање у АО соју, док је експресија IL-17 и IL-4 варијирала између два соја пацова зависно од експерименталног модела. Нивои прооксидативних параметара су били већи код АО пацова, док су се нивои антиоксидативних параметара разликовали међу сојевима зависно од експерименталног модела.

Закључак: DA и АО сојеви се разликују у одговору на инфекцију *C. albicans* у оквиру имунокомпетентних или имунокомпромитованих стања.

Кључне речи: орална кандидијаза, Dark Agouti, Albino Oxford, имунски одговор, *Candida albicans*

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is an infection of oral mucosa caused by the opportunistic pathogen, *C. albicans*. It most often occurs in immunocompromised, but it can also occur in healthy individuals. Genetic variations influence the susceptibility to fungal infections and immune response modulation. Dark Agouti (DA) and Albino Oxford (AO) rats are inbred strains with well-defined genetic profiles and differences in sensitivity to numerous inflammatory stimuli and experimental disease induction.

Aim: To study the strain differences of DA and AO rats in the induction, progression and type of immune response to oral candidiasis induced by different experimental models.

Material and methods: This research included 35 DA and 35 AO male rats, aged 8 weeks. Induction of oral candidiasis was performed using three experimental models. Swabs confirmed the presence of *C. albicans*. The experiment lasted 16 days, followed by sacrifice of animals and collection of blood and tongue samples for histological, immunohistochemical, qRT-PCR, ELISA and spectrophotometric analysis.

Results: Greater *C. albicans* colonization, damage, and inflammatory infiltrate were detected in AO strain. A higher number of CD45, CD3, CD68 positive cells, and a lower number of HIS48 positive cells was present in AO compared to DA strain. The expressions of IFN- γ , IL-1 β , TNF α , TGF- β 1 and IL-10 were lower in AO strain, while the expression of IL-17 and IL-4 varied between two strains depending on the experimental model. Levels of pro-oxidative parameters were higher in AO rats, while the levels of antioxidative parameters differed between strains depending on the experimental model.

Conclusion: DA and AO strains differ in response to *C. albicans* infection in both immunocompetent or immunocompromised states.

Key words: oral candidiasis, Dark Agouti, Albino Oxford, immune response, *Candida albicans*

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. C. ALBICANS	2
1.2. ФАКТОРИ ВИРУЛЕНЦИЈЕ C. ALBICANS	4
1.2.1. Полиморфизам.....	5
1.2.2. Адхезија	6
1.2.3. Продирање у ткиво.....	7
1.2.4. Формирање биофилма.....	8
1.2.5. „ <i>Quorum sensing</i> “	8
1.2.6. Тигмотропизам	8
1.2.7. Избегавање имунског одговора и стреса.....	9
1.3. КЛИНИЧКЕ МАНИФЕСТАЦИЈЕ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ	10
1.5. МЕХАНИЗМИ ОДБРАНЕ ОД ИНФЕКЦИЈА ИЗАЗВАНИХ C. ALBICANS ..	15
1.5.1. Пљувачка и епителне баријере	16
1.5.2. Урођени имунски одговор	16
1.5.3. Стечени имунски одговор.....	18
1.5.4. Молекуларни чиниоци реакција на инфекцију <i>C. albicans</i>	20
1.6. УЛОГА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ОРАЛНОЈ КАНДИДИЈАЗИ	22
1.7. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ	23
1.7.1. Грађа језика пацова	23
1.7.2. Експериментални модели оралне кандидијазе на пацовима.....	24
2. ЦИЉ СТУДИЈЕ	28
2.1. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ	31
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ	31
3.2.1. Снага студије и величина узорка	31
3.3. ИЗОЛОАЦИЈА C. ALBICANS	31
3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ	32
3.4.1. Експерименталне и контролне групе.....	33
3.4.2. Жртвовање животиња, прикупљање и припремање узорака крви и изолација језика	34
3.5. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА	34
3.5.1. Припрема ткива	34

3.5.2.	Хистолошка евалуација степена епителне колонизације <i>C. albicans</i> , оштећења епитела и запаљенског инфилтрата	37
3.6.	ИМУНОХИСТОХЕМИЈА	38
3.7.	КВАНТИТАТИВНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ	39
3.7.1	Израчунавање степена експресије гена у односу на друге гене	40
3.8.	ЕНЗИМСКИ ПОВЕЗАНИ ИМУНОСОРЕБЕНТНИ ТЕСТ	41
3.9.	ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА АНТИОКСИДАТИВНИХ И ПРООКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СИСТЕМСКЕ ЦИРКУЛАЦИЈЕ БИОХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ	42
3.9.1.	Индекс липидне пероксидације (TBARS)	43
3.9.2.	Водоник пероксид (H ₂ O ₂).....	43
3.9.3.	Супероксид анјон радикал (O ₂ ⁻).....	43
3.9.4.	Нитрити (NO ₂ ⁻)	44
3.9.5.	Супероксид дисмутаза (SOD)	44
3.9.6.	Редуковани глутатион (GSH).....	44
3.9.7.	Каталаза	44
3.10.	СТАТИСТИЧКО ОБРАЂИВАЊЕ ПОДАТАКА	45
4.	РЕЗУЛТАТИ	47
4.1.	РАЗЛИКА У ЕПИТЕЛНОЈ КОЛОНИЗАЦИЈИ <i>C. ALBICANS</i> ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	47
4.2.	РАЗЛИКЕ У СТЕПЕНУ ОШТЕЋЕЊА ЕПИТЕЛА ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	51
4.3.	РАЗЛИКЕ У ВЕЛИЧИНИ ИНФЛАМАТОРНОГ ИНФИЛТРАТА ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	56
4.4.	ФЕНОТИПСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА У ТКИВУ ЈЕЗИКА DA И АО ПАЦОВА	59
4.4.1.	Имунохистохемијска анализа броја CD45 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика.....	60
4.4.2.	Имунохистохемијска анализа броја CD3 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика	62
4.4.3.	Имунохистохемијска анализа броја CD68 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика.....	64
4.4.4.	Имунохистохемијска анализа броја HIS48 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика.....	67
4.5.	АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА У ОРАЛНОЈ КАНДИДИЈАЗИ DA И АО ПАЦОВА	69

4.5.1.	Експресија гена повезаних са Th1 имунским одговором у оралној кандидијази DA и АО пацова	69
4.5.2.	Експресија гена повезаних са Th2 имунским одговором у оралној кандидијази DA и АО пацова	73
4.5.3.	Експресија гена повезаних са Th17 имунским одговором у оралној кандидијази DA и АО пацова	75
4.6.	АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ DA И АО ПАЦОВА	77
4.7.	АНАЛИЗА ЕФЕКТА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ НА СИСТЕМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА	81
4.7.1.	Концентрација системских прооксидативних параметара код DA и АО пацова	81
4.7.2.	Концентрација системских антиоксидативних параметара DA и АО пацова	85
5.	ДИСКУСИЈА	90
5.1.	РАЗЛИКЕ У СТЕПЕНУ КОЛЕНИЗАЦИЈЕ ТКИВА <i>C. ALBICANS</i> У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	90
5.2.	СТЕПЕН ОШТЕЋЕЊА ТКИВА УЗРОКОВАН ИНФЕКЦИЈОМ <i>C. ALBICANS</i> У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	92
5.3.	РАЗЛИКЕ У ИНФЛИТРАЦИЈИ ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	93
5.4.	РАЗЛИКЕ У АКТИВАЦИЈИ ЦИТОКИНА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	95
5.4.1.	Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th1 имунски одговор	95
5.4.2.	Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th2 имунски одговор	96
5.4.3.	Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th17 имунски одговор	97
5.4.4.	Разлике у серумској концентрацији цитокина	98
5.5.	РАЗЛИКЕ У ПАРАМЕТРИМА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА	99
6.	ЗАКЉУЧАК	102
7.	ЛИТЕРАТУРА	104



1. УВОД

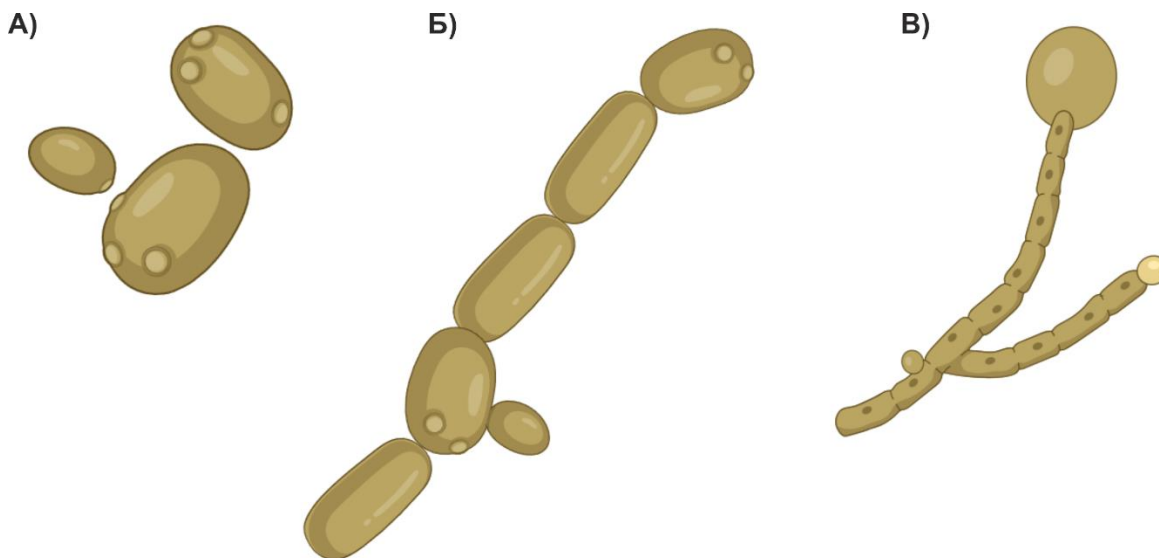
Гљиве се сврставају међу најједноставније еукариотске организме и чине одвојену филогенетску линију од биљног и животињског царства и представљају посебно царство *Fungi*. Род *Candida* спада у ред *Saccharomycetales* унутар колена *Ascomycota* и чини приближно око 150 различитих гљива. Врло су распрострањене, па се могу наћи као уобичајени становници у земљишту, води или као коменсални микроорганизми животиња. Међутим, само мали број гљива из рода *Candida* је повезан са колонизацијом људских ткива из разлога што већина не може да опстане на температури људског тела (37°). Оно што је значајно јесте чињеница да одређене уобичајено коменсалне гљиве из рода *Candida* могу под одређеним околностима да постану опортунистичке и да изазову болест. У опортунистичке гљиве убрајају се *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* и *C. lipolytica*. Свакако, највећи значај се придаје *C. albicans*, због доминантне улоге у изазивању хумане кандидијазе (1).

1.1. *C. ALBICANS*

C. albicans је први пут изолована из спутума болесника са туберкулозом и описана 1844. године (2). Уобичајено, *C. albicans* се налази у микрофлори 30-50% здравих особа. Насељава оралну, дигестивну и вулвовагинална мукозу као и кожу (3). Локализација *C. albicans* у усној дупљи је уједначена, али се најчешће изолује са површине језика (4). Коменсализам *C. albicans* се одржава равнотежом у микробиому, присуством пљувачке, и адекватним урођеним и адаптивним имунским одговорима домаћина (5). Може да изазове кожно, мукозно и системске инфекције, али је најчешће одговорна за изазвање мукозних и системских инфекција (6). *C. albicans* се сматра главним патогеном одговорним за изазвање оралне кандидијазе како код здравих, тако и код имунокомпромитованих особа (7,8). Инциденца оралне кандидијазе је у порасту, а овај пораст је у корелацији са повећањем броја имунокомпромитованих пацијената, старијих људи, као и људи који користе различита стоматолошка помагала попут зубних протеза и ортодонтских апарата (8,9).

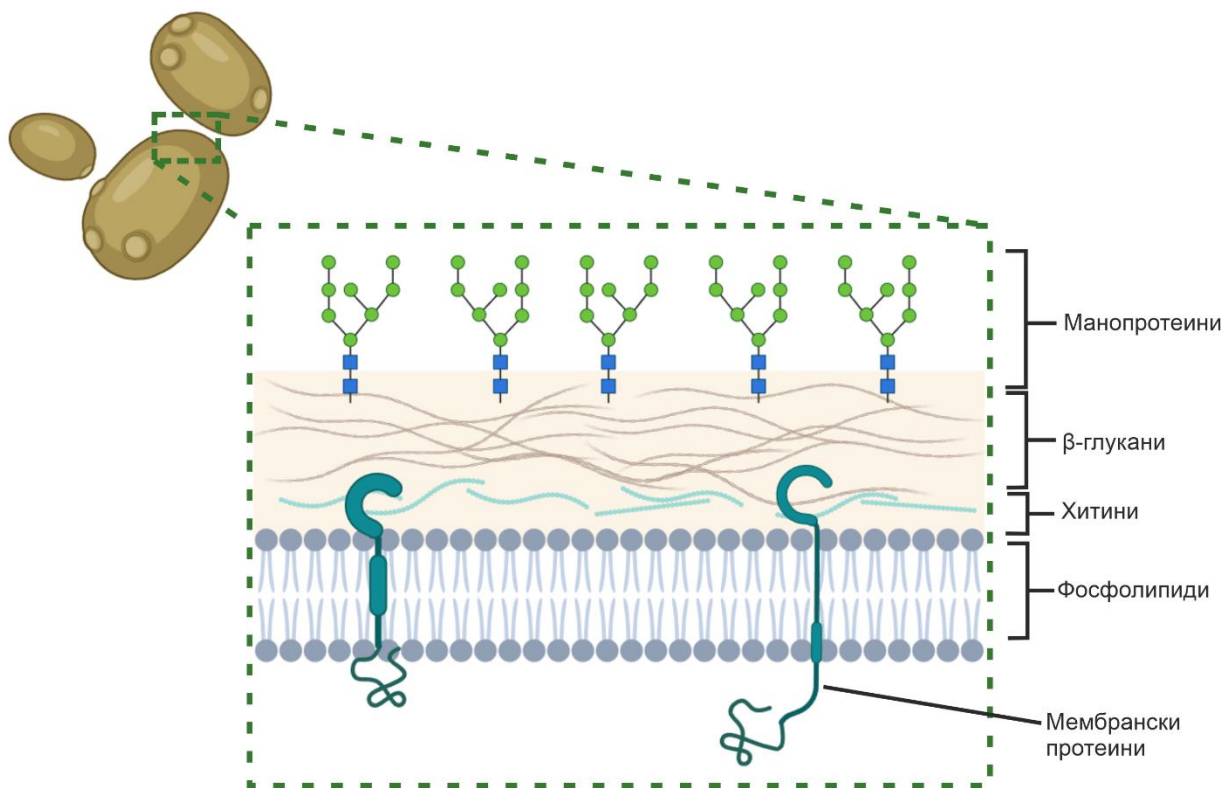
C. albicans је полиморфна гљива, тако да се у току инфекције мења у три различита облика, бластоспора (квасац), псеудохифа и хифа (**Фигура 1**). Сваки од облика је реверзибилан зависно од утицаја спољашње средине. Бластоспоре су основни облик квасца. Делјење бластоспора се одиграва асексуално, пупљењем. Пупљење настаје тако што се на површини бластоспоре ствара нов ћелијски материјал, који се најчешће налази дистално од места ожилка насталог рођењем. Након овог стварања пупољка, започиње фаза раста. Када се фаза раста заврши, тада се ћерка ћелија одваја од родитељске ћелије, и тако постаје самостална јединица која је јајоликог изгледа (10). Псеудохифа морфолошки изгледа као ланац издужених ћелија квасца које остају везане једна за другу преко констрикције које се називају септе. Ћелије су издужене у правцу раста и поларизоване, при чему је врх ужи и шиљатији од базе. Врх сваке ћелије садржи пупољак, који ће се на крају одвојити и формирати нову ћелију квасца. Псеудохифе могу бити неколико пута дуже од једне ћелије. Хифални облик *C. albicans* подсећа на дугачку, цилиндричну и филаментозну структуру која се разликује од квасних ћелија. Чине је ланци издужених ћелија, које се називају хифалне ћелије, а које су спојене крајевима. Међутим, унутрашњост међу појединачним хифалним

ћелијама је предвојена танким септама. Хифе могу нарасти до неколико стотина микрометара у дужину и могу се гранати и формирати сложену мрежу хифа. Морфолошки су уобичајено тање од псеудохифа и имају равномернију ширину по дужини (11).



Фигура 1. Схематски приказ полиморфизма *C. albicans*. *C. albicans* је полиморфна гљива, због чега се у току инфекција може наћи у три различита облика: (А) бластоспоре, (Б) псеудохифе и (В) хифе.

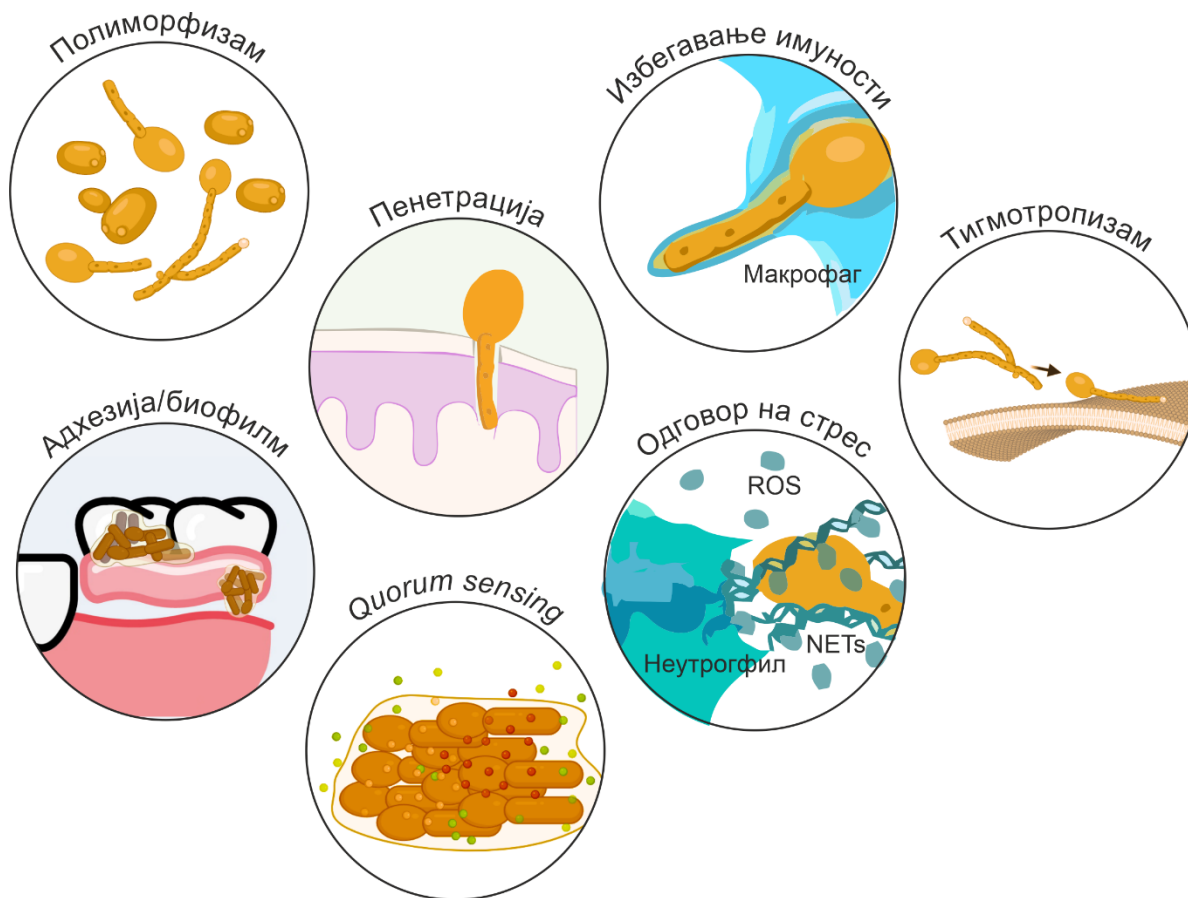
Ћелијски зид *C. albicans* се састоји од три слоја: спољашњег, средњег и унутрашњег слоја (**Фигура 2**). Спољашњи слој се углавном састоји од манопротеина који помаже у формирању ћелијске површине и задужен је за патоген-домаћин интеракцију. Средњи слој је састављен од β -гљукана и хитина који обезбеђује ригидност и структурни интегритет ћелијског зида. Унутрашњи слој такође садржи β -гљукан и хитин, али и протеине и липиде. Овај слој је најближи плазма мембрани и задужен је за ћелијску сигнализацију и регулацију. На тај начин, ћелијски зид штити гљиву од температурних промена, осмотских промена, имунског система домаћина као и од дехидратације. Ћелијски зид такође омогућава гљиви да се помоћу адхезионих протеина веже за ћелије домаћина (12).



Фигура 2. Схематски приказ ћелијског зида *C. albicans*. Спољашњи зид сачињен је од слоја манопротеина, средњи и унутрашњи од β -глюкана и хитина, а плазма мембрана од слоја фосфолипида у којој се налазе многобројни мембрански и трансмембрански протеини.

1.2. ФАКТОРИ ВИРУЛЕНЦИЈЕ *C. ALBICANS*

Фактори вируленције представљају одређене особине микроорганизама помоћу којих могу да развију болест. У факторе вируленције које поседује *C. albicans* убрајају се: полиморфизам, способност адхезије и пенетрације у ткиво домаћина, формирање биофилма, *quorum sensing* и тигмотропизам (Фигура 3). Међу најзначајнијим вирулентним факторима су полиморфизам и способност формирања биофилма.



Фигура 3. Схематски приказ фактора вируленције *C. albicans*. Међу најзначајнијим факторима вируленције описују се полиморфизам, способност пенетрације у ткиво домаћина, адхезија за ткива и површине попут зубне протезе, формирање биофилма, *quorum sensing*, избегавање фагоцитозе, реакције на оксидативни стрес и тигмотропизам

1.2.1. Полиморфизам

Значајним фактором вируленције се сматра полиморфизам гљиве, односно способност гљиве да из стања бластоспоре пређе у друга морфолошка стања као што су псеудохифе и хифе (13–15). Дуго се сматрало да је формирање филаментозних облика (мицелијума) од суштинског значаја за вируленцију *C. albicans*, пошто су мутантни сојеви *C. albicans* који су закључани у било ком од морфолошких облика, као што су квасци или псеудохифе, били ослабљени у својој способности да изазову инфекцију у моделима инфекције миша (16–19). Недавна истраживања указују на то да хипотеза која се ослања искључиво на морфогенезу као кључни фактор вируленције код *C. albicans* може бити превише поједностављена. Ова комплексна интеракција између морфолошких облика и вируленције постаје све јаснија како се више истражује. Истраживања су показала да неки *C. albicans* сојеви који су дефектни у морфогенези и даље задржавају своју вирулентност у системским моделима инфекције код мишева (20–22). Формирање хифа *C. albicans* се сматра комплексним феноменом који је регулисан разним факторима повезаним са вируленцијом овог патогена. То може бити изазовно за одређивање тачне улоге формирања хифа у процесу вирулентности (23). Стога, савремени концептуални модел препознаје и

квасце и хифе као кључне факторе у процесу инфекције *C. albicans*. Ова различита морфолошка стања играју специфичне улоге током различитих фаза инфективног процеса, наглашавајући динамичну и адаптивну природу овог патогена током интеракције с домаћином (23–25). Обе морфолошке форме раста, како квасац тако и хифе, могу се наћи током системских инфекција. Претпоставља се да су облици квасца важни за дисеминацију кроз крвоток, док се чини да је формирање хифа повезано са инвазијом ткива. Ова диференцијација у морфолошким облицима омогућава *C. albicans* да се прилагоди различитим стадијумима инфекције и ефикасно интерагује са домаћином током различитих фаза патогенезе (26–28).

Транзиција квасца у хифе зависи од различитих фактора присутних у окружењу гљиве:

1. **рН средине** - Транзиција гљиве из квасца у хифу зависи од киселости/базности окружења у коме се налази. У киселим срединама ($\text{pH} < 6$) фаворизује се раст квасца, док је у базним срединама ($\text{pH} > 7$) доминантнији раст хифа (29).
2. **Гладовање** - је један од еколошких знакова који покреће транзицију квасац-хифа у *C. albicans*. У недостатку хранљивих материја, покреће се пут трансдукције сигнала који води до активације специфичних транскрипционих фактора, као што су Efg1 и Sph1, који заузврат активирају гене потребне за транзицију квасац-хифа. Сматра се да је овај одговор механизам прилагођавања који омогућава *C. albicans* да истражује нове нише и добија хранљиве материје у новом окружењу. Поред тога, прелазак на хифалну форму је повезан са повећаном вирулентношћу и способношћу да се избегне имунски одговор домаћина, што може бити корисно за преживљавање и отпорност унутар домаћина током периода недостатка хранљивих материја или присуства стреса (30).
3. **Температура** - На температури тела (37°C), *C. albicans* може прећи из квасног у хифални облик, док ниже температуре (30°C) онемогућавају ову транзицију (31).
4. **CO₂** - Присуство CO₂ (нивои од 5-10%) могу да промовишу транзицију квасца у хифе. Међутим, тачан механизам деловања CO₂ још увек није разјашњен (11).

1.2.2. Адхезија

Адхезија *C. albicans* за епителне ћелије је значајан фактор у патогенези мукозне кандидијазе. Адхеренција је посредована специфичним адхезинима експримираним на површини гљивичне ћелије којим се везује за комплементарне рецепторе на површини ћелија домаћина (32).

У току коменсалног стања, *C. albicans* је реверзибилно, помоћу електростатских сила везана за епителне ћелије. У том стању, пљувачка и процес аглутинације лако уклањају гљиву са површине ткива. Међутим, кључни тренутак за стицање патогености је када се *C. albicans* задржи на површини епителних ћелија помоћу својих адхезина. Најважнији адхезин је Als3 који је члан Als (енг. *agglutinin-like sequences*) фамилије протеина која се састоји од осам чланова (Als1-Als7 и Als9). Als3 је велики гликопротеин на ћелијској површини који садржи више адхезивних домена, укључујући „везујући домен“ који посредује у везивању

C. albicans за ћелије домаћина. Једном када се Als3 веже за рецептор ћелије домаћина, молекул Als3 пролази кроз конформациону промену која промовише формирање стабилне адхезивне везе. Ово дозвољава *C. albicans* да колонизује и нападне ткиво домаћина, доводећи до развоја мукозне кандидијазе (14).

Остали адхезини на површини *C. albicans*, као што су протин зида хифе (енг. *hyphal wall protein*, Hwp) 1 и протеин повезан са ETS1 (енг. *ETS1-Associated Protein 1*, Eap1), такође имају важну улогу у адхезији. Међутим, специфични механизми адхезије посредоване овим протеинима се и даље истражују. Свакако, адхезија *C. albicans* за епителне ћелије је комплексан процес који укључује више адхезин-рецептор интеракцију и кључна је за иницијацију и прогресију мукозне кандидијазе (14).

1.2.3. Продирање у ткиво

Продирање *C. albicans* у ткиво домаћина се одиграва на два начина:

- а) Индукованом ендоцитозом
- б) Активном пенетрацијом

Индукована ендоцитоза је процес којим *C. albicans* продире пасивно у ткиво домаћина. Како би процес индуковане ендоцитозе започео, неопходно је да хифа *C. albicans* на својој површини експримира инвазине (Als3 и Ssa1) да би се постигло везивање за рецепторе на површини епителних ћелија (E-кадхерин). На тај начин на епителним ћелијама долази до активирања рецептора епидермалног фактора раста, EGFR (енг. *epidermal growth factor receptor*) и HER2 (енг. *human epidermal growth factor receptor 2*). Експримирани инвазини се везују за активирани EGFR и HER2 рецепторе, чиме се започиње процес индуковане ендоцитозе завистан од клатрина који има централну улогу у формирању ћелијских везикула. На тај начин долази до индукције епителних ћелија да стварају псеудоподе чија је функција у „гутању“ ћелије *C. albicans*, и увлачењу микроорганизама унутар ткива (28,33–35). Овај процес се јавља у раној фази, приближно 4 часова након адхерирања *C. albicans* за површину епителних ћелија (36).

Активна пенетрација је комплексан процес који подразумева активно продирање кроз ткиво домаћина или између епителних веза. Пре свега, да би сам процес активне пенетрације започео, неопходно је да гљива адхерира за ћелије домаћина претходно описаним механизмима адхезије. Затим, неопходно је да секретује различите хидролитичке ензиме, који уништавају ткиво домаћина и тиме гљивици формирају пут за пенетрацију. Једном када је пут формиран, *C. albicans* може да искористи своју хифу да активно пенетрира у ткиво домаћина. Пенетрације и раст хифа узрокују оштећење и инфламацију. Гљива такође може да прелази између облика раста квасца и хифа како би се прилагодила окружењу и избегла имунски одговор домаћина. Током процеса пенетрације, *C. albicans* такође секретује различите токсине и друге молекуле који директно уништавају ћелије домаћина, чиме се олакшава даља инвазија гљива. Ови вирулентни фактори укључују кандидализин, пептидни токсин који руптурира ћелијску мембрану домаћина и активира имунске ћелије, и β -глюкане, компоненте ћелијског зида гљиве које представљају окидач инфламације и имунског одговора домаћина (35,36).

1.2.4. Формирање биофилма

Биофилм је сложена структура која се састоји од екстрацелуларног полисахаридног матрикса унутар кога се налазе микроорганизми (37). Може се формирати како на биотским (живим организмима), тако и на абиотским (различите врсте стоматолошких надокнада и помагала) површинама. Биофилм се може формирати унутар 24 до 48 сати.

Формирање биофилма чине следеће фазе:

- Адхезиона фаза,
- Фаза пролиферације,
- Фаза сазревања биофилма и
- Фаза дисперзионих ћелија.

У *адхезионој фази*, ћелије квасца адхерирају за површину формирајући базални слој.

У *пролиферативној фази* долази до издуживања једноставних ћелија квасца и мењања њиховог морфолошког облика у облик хифе.

Фаза сазревања биофилма се одликује производњом полисахаридног екстрацелуларног матрикса (енг. *extracellular matrix*, ЕСМ) који лучи *C. albicans*. ЕСМ је сложена структура, која се састоји од различитих полисахарида, као што су β -1,6-глукан, β -1,3-глукан и α -манан. Међутим, у ЕСМ се могу наћи и лизирани ћелије домаћина, имунске ћелије, еритроцити и друге супстанце тако да се садржај матрикса разликује зависно од локације на којој се биофилм развија. ЕСМ обезбеђује баријеру, која штити *C. albicans* од деловања спољашњих утицаја.

У *фази дисперзионих ћелија*, ћелије квасца се одвајају из створеног биофилма, како би на удаљеном месту започеле поновно формирање биофилма (38,39).

1.2.5. „*Quorum sensing*“

Quorum sensing је механизам који користе *C. albicans* за међусобну комуникацију и координацију свог понашања као одговор на густину популације. То укључује ослобађање и детекцију сигналних молекула (аутоиндуктори) који помажу овим микроорганизмима да осете када њихова популација достигне критични праг или кворум. Када се достигне овај праг, они могу колективно регулисати експресију гена и обављати специфичне функције или понашања, као што су формирање биофилма, производња токсина или пребацивање између различитих облика раста (40).

1.2.6. Тигмотропизам

Тигмотропизам је одговор организма на механичку стимулацију, у којој организм мења правац раста као одговор на стимуланс. У случају *C. albicans*, тигмотропизам је примећен у хифама, које показују карактеристично понашање „качења“ као одговор на контакт са површином или другим ћелијама. Ово омогућава хифама да преуреде своју

уздужну осовину како би се прилагодили површини и омогућили ефикасну кретњу кроз сложена окружења, као што је ткиво домаћина, пратећи пут најмањег отпора (41,42).

Верује се да је тигмотропизам код *C. albicans* посредован са неколико сигналних путева, укључујући Ras-cAMP-PKA пут и MAPK пут. Ови путеви се активирају као одговор на механичку стимулацију, што доводи до промена у експресији гена и преуређивања цитоскелета. Ово на крају доводи до запаженог понашања хифа као одговор на контакт са површинама или другим ћелијама (42).

Тигмотропизам је важан вирулентни фактор *C. albicans*, који дозвољава гљиви да ефикасно продре кроз ткиво домаћина. Има и улогу у формирању биофилма, јер тигмотропизам дозвољава хифама да се оријентишу и на тај начин да адхерирају за површину као и за остале ћелије (41).

1.2.7. Избегавање имунског одговора и стреса

C. albicans поседује неколико механизма за избегавање имунског одговора домаћина, откривање и елиминисање. На пример, продужење хифа омета фагоцитну активност или општењу фагоцитне ћелије, као и покретање путева одговора на стрес у гљивама и ометање сазревања фагозома.

Бекство из фагозома променом величине и облика ћелије

Различите фагоцитне ћелије поседују конвенционалну величину ћелије, ограничавајући величину микроорганизама којег могу да фагоцитују. Примера ради, *C. albicans* је дијаметра између 5 и 10 μm у квасном облику и преко 20 μm у хифалној фази, што ограничава могућност фагоцитозе хифалног облика гљиве. Својим механизмима, гљива може да покрене раст хифе у фагозому узрокујући перфорацију и уништавање фагоцитне ћелије. Такође, морфогенеза ћелијског зида *C. albicans* може спречити убијање унутар фагозома ометањем улоге RAB протеина који регулише сазревање фагозома у фагоцитним ћелијама. Губитак функције RAB одлаже сазревање фаголизозома, повећавајући могућност „бежања“ *C. albicans* и стопу уништавања макрофага (43). Међутим, показано је да мутанти *C. albicans* без појединих компоненти ћелијске мембране, попут ергостерола, не могу да индукују ћелијску лизу (44). Такође, мутанти којима недостаје ECE1 ген, који кодира кандидализин, могу да формирају хифе, али не могу да униште фагоцитне ћелије (45). Ово наводи на закључак да су специфичне компоненте ћелијске мембране гљива или лучење одређених ензима неопходне за индукцију лизе макрофага, поред морфогенезе.

C. albicans превенира своју идентификацију и убијање променом своје ћелијске структуре

Активација слободних радикала представља окидач за активацију стрес сензора присутних у ћелијском зиду *C. albicans*. Последично, долази до активирања сигналног пута митогеном-активирани протеин киназе из *C. albicans* 1 (енг. MAP kinase from *C. albicans* 1, Mkc1) доводећи до Rlm1-зависне активације хитина који може ојачати ћелијски зид биосинтезом и поправити његова оштећења. Грађа ћелијског зида *C. albicans* такође утиче на функцију фагозома повезану са RAB протеином. Манан присутан у спољашњем слоју ћелијског зида има протективни ефекат на β -глюкан, тако што превенира излагање и идентификацију наведеног гљивичног антигена у фагоцитним ћелијама. Последично, губитак манана узрокује већу доступност β -глюкана чиме повећава фагозомску функцију и

редукује способност гљиве да побегне урођеном имунском систему. β -глюкан је доступнији фагоцитима када је гљивица у облику квасца, док је у облику хифа β -глюкан често прекривен дебљим слојем манана (46).

Превенција уништавања активирањем путева одговора на стрес

Интрацелуларни фагозоми углавном уништавају гљивичне ћелије након ендоцитозе *C. albicans* у фагоцитним ћелијама кроз активност различитих антимикуробних фактора, као што су хидролазе и оксидазе. Студије су показале да је активност NADPH оксидазе у блиској повезаности са уништењем гљивица оксидативним механизмима, ограничавајући раст *Candida* ћелија (47). Као одговор на оксидативни стрес, *C. albicans* покреће тзв. путеве стреса, укључујући MAPK Hog1 (48), транскрипциони фактор Cap1 (енг. *C. albicans* AP1-like transcription factor) (49), и транскрипциони фактор шока 1 (енг. *heat shock transcription factor 1*, Hsf1) (50). Реактивне кисеоничне врсте (енг. *reactive oxygen species*, ROS) и реактивне азотне врсте (енг. *reactive nitrogen species*, RNS) активирају експресију транскрипционог фактора Cap1, индукујући активацију производње и протективне ефекте антиоксидативних ензима, каталазе (енг. *catalase*, CAT), глутатиона (енг. *glutathione*, GSH), и тиоредоксина, у *C. albicans*.

Отпорност *C. albicans* на активност антимикуробних пептида

C. albicans може да избегне или умањи активности антимикуробних пептида посредством неколико механизма. Пре свега, гљивица може регулисати сигналне путеве у својим ћелијама како би одговорила на присуство антимикуробних пептида. Ово ће узроковати да *C. albicans* секретује пептидне молекуле, као што су Sap9 и Sap10, који делују као ефектори са способношћу да модулирају или блокирају активности антимикуробних пептида. Такође, *C. albicans* поседује ефлукс пумпе на својој мембрани које јој омогућавају изbacивање већ активираних антимикуробних пептида из ћелије. Ово спречава нагомилавање пептида у ћелији и штити гљивицу од њиховог деструктивног дејства (51).

Преживљавање у фагозомима

Ћелије *C. albicans* су способне да инхибирају сазревање фаголизозома и производњу азот оксида, што омогућава гљивици да опстане у фагозомима. Опстанак *C. albicans* у фагозому макрофага може да доведе до промене фенотипа из проинфламаторног M1 у антиинфламаторни M2 фенотип. Такође, показано је да *Candida* врсте могу да преузму одређене путеве активације рецептора за препознавање патогених образаца (енг. *pattern recognition receptors*, PRRs) и индуковати имуномодулаторне сигнале који промовишу толерогени профил дендритских ћелија и пролиферацију регулаторних Т ћелија (енг. *T-regulatory cells*, Treg). Додатно, *C. albicans* може да модулира и интрацелуларну мембранску размену, инхибирањем фузије лизозима са фагозомом, као и да се супротстави оксидативном стресу кроз механизме одговора на стрес (46,51).

1.3. КЛИНИЧКЕ МАНИФЕСТАЦИЈЕ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ

Клиничке манифестације гљивичних инфекција се према изгледу деле у групе са белим и црвеним променама. У групу са белим променама се убрајају псеудомембранозна и хронична хиперпластична кандидијаза, док се у црвену групу убрајају ангуларни хеилитис,

акутна и хронична еритематозна кандидијаза, ромбоидни глоситис и линерани гингивални еритем (52).

Најчешћи тип оралне кандидијазе је **псеудомембранозна кандидијаза** или дрозд. Врло често се јавља код новорођенчади и имунокомпромитованих особа. Карактерише се кремасто белим променама које су у виду плака или плоче. Промене су мекане конзистенције и благо издигнуте. Могу се лако уклонити остављајући еритематозну површину за собом (53). Ова карактеристика представља јасан диференцијално дијагностички знак. Плак се састоји од квасаца и хифа, десквамираног епитела, леукоцита, кератина, бактерија, фибрина и некротизирајућих остатака. Најчешће су локализовани на језику, затим букалној слузници, тврдом и меком непцу. Могу бити асимптоматске које су уједно и најчешће, или симптоматске. Код симптоматских, чести симптоми су жарење, нелагодност, лош задах и поремећај укуса (3).

Хронична хиперпластична кандидијаза (нодуларна кандидијаза или кандидијална леукоплакија) се карактерише присуством белих плаковних хомогених лезија или нодуларних лезија које не могу лако да се уклоне. Лезија се обично налази у комисурама усана, билатерално, као и на букалној мукози. Најчешће је асимптоматска. Фактори ризика су лоша орална хигијена, употреба зубних протеза, пушење и системске болести као што су дијабетес и ХИВ/АИДС. Лезија може постати већа и опсежнија током времена када ју је тешко разликовати од других врста оралних лезија. Поседује и потенцијал за малигном алтерацијом (52).

Ангуларни хеилитис је често инфламаторно стање које захвата углове усана. Развој ангуларног хеилитиса може да буде узрокован многобројним факторима, укључујући недостатак витамина и бактеријске инфекције, али често настаје и као последица инфекције *C. albicans*. *C. albicans* може да колонизује влажну, пукотинасту кожу углова усана, доводећи до инфекције и инфламације. Ово посебно погађа имунокомпромитоване особе, особе које носе зубне протезе или оне са лошом оралном хигијеном. Симптоми ангуларног хеилитиса укључују црвенило, пукотине и бол у угловима усана. Некада могу бити присутни и бели плакови (52).

Акутна еритематозна кандидијаза је честа асоцијација на употребу антибиотика широког спектра. Настаје када се услед употребе антибиотика у микрофлори усне дупље смањи број бактерија чиме се фаворизује раст гљива. Манифестује се болним црвеним променама у усној дупљи, најчешће локализованих на језику и палатуму (54). Симптоми акутне еритематозне кандидијазе могу да укључе жарење или болне сензације у устима, црвенило и оток језика и других делова у усној дупљи. То је једини облик оралне кандидијазе коју прати константан осећај боли (52).

Хронична еритематозна атрофична кандидијаза је најчешћа клиничка манифестација оралне кандидијазе, која се често назива и протезни стоматитис, и која погађа чак 75% особа које носе зубне протезе. Асимптоматска је промена. Манифестује се слично као акутна форма и обично настаје као последица перзистентног присуства акутне еритематозне кандидијазе. Ова форма се често јавља и код ХИВ заражених особа. Неадекватна орална хигијена, лоше приањање или пролонгирано ношење протеза, посебно ноћу, су главни предиспонирајући фактори за настанак протезног стоматитиса. Под овим околностима, ограничен проток пљувачке у овој локализацији пружа идеално окружење за раст гљива. Иритација настала трењем услед лоше прилагођене протезе може оштетити

мукозну баријеру, омогућавајући инфилтрацију колонизујуће *C. albicans* у ткиво. Додатно, абиотски акрилни материјал делује као хронични резервоар који омогућава континуирано расејавање *C. albicans* на непчано ткиво; ово заузврат изазива снажан локални инфламаторни одговор који се клинички манифестује као ткивни еритем и хиперплазија. С обзиром на склоност *C. albicans* да адхерира и колонизује протезу, ово стање се сматра класичном инфекцијом узрокованом биофилмом *C. albicans*. Наиме, *C. albicans* се чешће развија на површини протезе него на палаталној слузокожи и зато је клиничко лечење првенствено фокусирано на искорењивање биофилма формираног на протези како би се спречила поновна колонизација и рецидив (52,55).

Медијални ромбоидни глоситис (атрофични глоситис или централна папиларна атрофија) представља централно елиптично или ромбоидно подручје атрофије и еритема средње линије задњег дорзума језика до циркумвалатних папила. Стање је обично повезано са учесталом употребом стероидних инхалатора или учесталом конзумацијом дуванског дима. Иако се порекло ове лезије историјски приписује дефекту у развоју, постоји мала вероватноћа за ову тврдњу јер се педијатријски случајеви ретко сусрећу (55).

Линерани гингивални еритем је клинички облик кандидијазе који најчешће захвата маргинална гингиву, и карактерише се као еритем у облику траке која је ограничена на слободну ивицу гингиве ширине 2-3mm. Асимптоматска је. Најчешће се виђа код ХИВ позитивних особа и сматра се индикатором имуносупресије. Ређе се јавља код пацијената који су под хемотерапијом, као и код особа са неконтролисаним дијабетесом. Сматра се да је лингвални гингивални еритем узрокован комбинацијом прекомерног раста *C. albicans* и имунске дисфункције. Третман обично укључује системске антифунгалне агенсе, заједно са мерама за побољшање оралне хигијене и имунских функција (55).

1.4. ФАКТОРИ КОЈИ ДОПРИНОСЕ РАЗВОЈУ ОПОРТУНИСТИЧКЕ ИНФЕКЦИЈЕ *C. ALBICANS*

Одређена стања и услови доприносе порасту могућности да *C. albicans* постане опортунистичка. Ти фактори могу бити подељени у локалне и системске.

У системске факторе се убрајају:

1. **Употреба антибиотика широког спектра** – Примена антибиотика широког спектра ремети равнотежу оралног микробиома. Осим што циљају на штетне бактерије, ови антибиотици такође елиминишу корисне бактерије које играју кључну улогу у регулисању раста врсте *C. albicans* (56,57).
2. **Имуносупресија** – Имуносупресија представља значајан фактор ризика за настанак оралне кандидијазе. Стање имунодефицијенције може настати као последица ХИВ/АИДС, хемотерапије, терапије зрачењем, трансплантације органа и употребе имуносупресивних лекова као што су кортикостероиди. Код особа које болују од имуносупресије, имунски систем је компромитован, што доводи до смањења броја имунских ћелија и може резултовати тешким и продуженим гљивичним инфекцијама (58).

Колико је имуносупресија значајан фактор у развоју оралне кандидијазе говори и податак да се орална кандидијаза јавља код 90% ХИВ заражених особа. Често може

бити први знак ХИВ инфекције. Ове особе су у повећаном ризику за настанак оралне кандидијазе јер је код њих број CD4+Т ћелија у значајном паду (испод 200/mm³). Инфекција се јавља рано, пре почетка клиничких манифестација болести, и касније код узнапредовалих стадијума АИДС-а. Код ХИВ заражених особа је у значајном паду и количина антимикробних пептида, хистатина, што је још један фактор ризика за настанак оралне кандидијазе (59).

3. **Неконтролисани дијабетес** – због последичне ксеростомије смањује се број IgA антитела, рН је нижи, смањен је број секреторних компоненти и присутни су повишени нивои глукозе у пљувачци што погодује расту и размножавању квасаца. Могући су и дефекти у неутрофилима који смањују њихову антифунгалну улогу. Постоје дефекти у фагоцитози, интрацелуларном уништавању, као и у хемотакси, чиме се повећава инциденца оралне кандидијазе (60,61).
4. **Хемотерапија** – преваленца оралне кандидијазе код ових пацијената износи од 25-40%. Цитотоксична хемотерапија доводи до инфламације мукозе чиме се јавља дисбиоза која промовише прекомеран раст *C. albicans* и одређених микроорганизама у усној дупљи. Протеолитички ензими које секретују бактерије додатно промовишу раст и инвазију *C. albicans* (62).
5. **Узраст** – Преваленца оралне кандидијазе код одојчади је између 4-15%. *C. albicans* колонизује новорођенче било вертикално током вагиналног порођаја или хоризонтално из околине. У повећаном су ризику јер њихов имунски систем није у потпуности ојачан (63,64).
6. **Старост** – Како људи старе, тако њихов имунски систем постаје све слабији, доводећи до повећања ризика за настанак инфекције, укључујући оралну кандидијазу. Старење је повезано са падом функције имунских ћелија, као што су Т ћелије и неутрофили, који су есенцијални за борбу против гљивичне инфекције. Такође, старији могу имати одређене коморбидитете, као што су дијабетес или канцер, или могу узимати одређене лекове, као што су кортикостероиди, који могу додатно да ослабе имунски систем и на тај начин да повећају ризик од оралне кандидијазе. Старије особе могу имати и промене у оралном микробиому, где је могуће формирање окружења које погодује расту *C. albicans*. Промене у микробиому најчешће настају као последица смањене продукције пљувачке, чиме се умањују њене заштитне способности и повећава ризик за настанак оралне кандидијазе (65,66).
7. **Малнутриција, недостатак гвожђа** – Гвожђе је есенцијални нутритијент и за домаћина и за микроорганизме, укључујући *C. albicans*. Раст и опстанак *C. albicans* зависе од доступности гвожђа у окружењу домаћина. Такође, недостатак гвожђа може потенцијално утицати на развој оралне кандидијазе смањењем имунског одговора и повећаном осетљивости на инфекцију. Код особа са недостатком гвожђа долази до смањења броја и функције имунских ћелија, као што су неутрофили и макрофаги. Поред тога, недостатак гвожђа може довести до смањења продукције цитокина, као што су интерлеукин (енг. Interleukin, IL)-17 и IL-22, који су важни у одбрани од инфекција *C. albicans*. Штавише, *C. albicans* има способност да добија гвожђе од домаћина путем секреције молекула који везују гвожђе, званих

сидерофори. Особе са недостатком гвожђа могу имати смањену доступност гвожђа, али то такође може да подстакне прекомерну производњу сидерофора од стране *C. albicans*, што доводи до повећане адхеренције и вируленције (67).

8. **Трудноћа** - Трудноћа доводи до значајних хормоналних промена, посебно, повећања нивоа естрогена и прогестерона. Ове хормонске флукуације могу утицати на различите аспекте физиологије жене, укључујући и усну шупљину. Током трудноће долази до повећања дотока крви у оралну слузокожу, што може резултирати локализованим променама у оралној средини и оралном микробиому. Труднице су склоније гингивитису, што може довести до стварања пародонталних џепова и нише у ткиву десни у којима се врсте *Candida* могу размножавати (68).

У локалне факторе спадају:

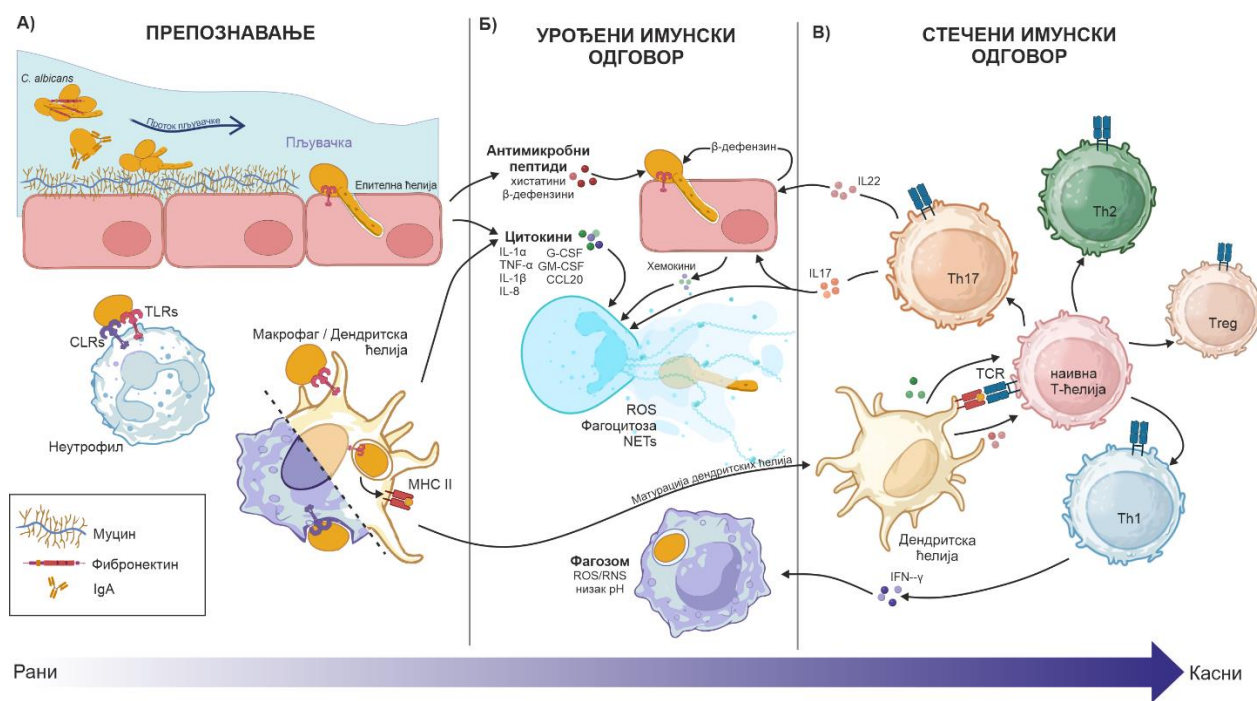
1. **Употреба локалне кортикостероидне терапије** – Употребом кортикостероидне терапије долази до инхибиције миграције и акумулације фагоцита на место инфекције, као и значајног сузбијања функције помоћничких Т ћелија (енг. Т helper cell, Th) и инхибиције синтезе проинфламаторних медијатора запаљења. Поред тога, долази до индукције апоптозе инфламаторних ћелија, посебно еозинофила и лимфоцита Т ћелијске лозе. Сви ови споредни ефекти кортикостероидне терапије повећавају могућност развоја оралне кандидијазе (69).
2. **Зрачење главе и врата** – радиотерапија у пределу главе и врата оштећује пљувачно ткиво доводећи до хроничне хипосаливације. Редукован квалитет и квантитет пљувачке доводи до ксеростомије, чиме се повећава могућност развоја оралне кандидијазе (70).
3. **Ношење зубне протезе** – простор између оралне слузокоже и зубне протезе је микроокружење са врло мало кисеоника, најчешће без присуства пљувачке. Сходно томе, рН средине је низак. Додатно, уколико протезе не налажу адекватно на оралну слузокожу, долази до трауме и иритације ткива. Најчешћи материјал од којег се израђују зубне протезе је акрилат, који је врло пријемчив за дентални плак. Уколико се на све то надовеже лоша орална хигијена и лоше одржавање протеза, ризик за настанак оралне кандидијазе се утолико повећава (71).
4. **Ксеростомија**– Ксеростомија је стање када пљувачне жлезде не производе довољну количину пљувачке. На тај начин се смањује протективна улога пљувачке, у смислу слабијег уклањања остатака хране и микроорганизама. Вредност рН у устима особа са ксеростомијом је низак, долази до атрофије епитела и смањене пермеабилности за ткивну течност, смањен је број антимикробних пептида као што су лактоферин, хистидином богати полипептиди, лизозим, сиалопероксидазе и антикандида антитела што све иде у прилог расту и развоју *C. albicans* (72).
5. **Пушење** – Пушење је фактор ризика за настанак оралне кандидијазе јер може да поремети нормалну микрофлору и да редукује ефекте имунског одговора, чиме се фаворизује раст и развој гљивичне инфекције. Такође, пушење може да доведе до

локалне трауме ткива, чиме се додатно побољшавају услови за колонизацију *C.albicans* (73).

6. **Лоша орална хигијена** – као последица лоше оралне хигијене на зубним површинама почиње да се накупља дентални плак који се састоји од хране, бактерија, пљувачке и др. Унутар денталног плака, *C. albicans* може да се насели, користећи га као извор хране и заштите. Такође, у устима са неадекватном оралном хигијеном, влада кисела средина што фаворизује раст гљивице (74).

1.5. МЕХАНИЗМИ ОДБРАНЕ ОД ИНФЕКЦИЈА ИЗАЗВАНИХ *C. ALBICANS*

Да би се организам изборио са гљивичном инфекцијом, веома је важна уједначена снага и координација између урођеног и стеченог имунског одговора. Главне компоненте урођеног, неспецифичног имунског одговора су пљувачка, епителне ћелије, као и ћелије имунског система (неутрофили, макрофаги, дендритске ћелије) док у стеченом имунском одговору, најзначајнију улогу имају Th ћелије (**Фигура 4**).



Фигура 4. Схематски приказ механизма одбране од инфекције *C. albicans*. А) У раном имунском одговору велику улогу у спречавању адхерирања *C. albicans* за епител имају проток пљувачке, фибронектин и IgA антитела. Када *C. albicans* адхерира за површину епитела, активирају се епителне ћелије које преко рецептора за препознавање патогеног обрасца препознају *C. albicans* и почињу да луче проинфламаторне цитокине и хемокине, и тиме регрутују неутрофиле, макрофаге и дендритске ћелије на место инфекције. Б) Активирани епителне ћелије почињу да луче антимикробне пептиде (хистатин, β -дефензин) који ограничавају раст и инвазију *C. albicans* и хемокине (G-CSF, GM-CSF, CCL20) који регрутују макрофаге и неутрофиле. Активирани епителне ћелије и макрофаги луче проинфламаторне цитокине (IL-1 α , TNF- α , IL-1 β , IL-8). Неутрофил елиминише *C. albicans* преко процеса фагоцитозе, као и ослобађањем NETs, В) Антиген презентујуће ћелије (дендритске ћелије, макрофаг) на својој површини приказују антиген у оквиру МНСII

молекула наивним Т ћелијама. Интеракцијом између антиген презентујућих ћелија и наивних Т ћелија индукује се Т-ћелијска активација и диференцијација у неколико различитих Т ћелијских типова (Th1, Th2, Th17 и Treg). Ове Th ћелије, „између осталог“ стимулишу мукозну одбрану продукцијом IL-17 и IL-22 или активност фагоцитних ћелија продукцијом IFN- γ .

1.5.1. Пљувачка и епителне баријере

Улога пљувачке је незаменљива у одржавању оралне хомеостазе. Она пре свега својом количином и протоком уклања нечистоће и микроорганизме са оралних површина. У пљувачци се, такође, налазе и саливарни протеини укључујући муцин, фибронектин и секреторни IgA који контролишу раст и преживљавање микроорганизма у усној дупљи (75) (**Фигура 4А**). Муцин је гликопротеин који формира заштитни омотач преко мукозне површине, превенирајући адхезију микроорганизма, укључујући *C. albicans*. Фибронектин је екстрацелуларни протеин који се везује за бактеријске и гљивичне ћелије, изазивајући аглутинацију и њихово чишћење из усне шупљине. Пљувачка садржи и различите антимикуробне пептиде међу којима су хистатини, статхерин и дефензини. Показано је да хистатин-5 и хистатин-3 који су продукти паротидне и субмандибуларне жлезде, имају антифунгалну улогу против *C. albicans*. Поред тога, хистатин -3 има значајну улогу и у зарастању рана оралног ткива. Статхерин инхибира формирање хифа *C. albicans*, умањује њену вирулентност, као и пролиферацију ћелија. Такође, поседује способност да преобрази патогено хифално морфолошко стање у стање бластоспоре. Дефензини ремете функцију *C. albicans*. Делују и као хемоатрактанти за дендритске ћелије, неутрофиле и Т ћелије (76–78).

Епителне ћелије слузокоже усне дупље играју круцијалну улогу у одбрани против *C. albicans* обезбеђујући како физичку тако и имунску баријеру у циљу превенције и контроле инфекције. Пружајући првенствено физичку баријеру, епител превенира пенетрацију гљиве у везивно ткиво ламине проприје (**Фигура 4А**). Негативно наелектрисане епителне ћелије одбијају ћелије *C. albicans*, онемогућавајући њихову адхезију за површину оралне мукозе. Оралне епителне ћелије продукују неколико антимикуробних пептида, као што су β -дефензини и хистатини, који могу директно да униште или инхибирају раст *C. albicans*. Оне, такође, продукују цитокине и хемокине које регрутују имунске ћелије, као што су неутрофили и Т ћелије на место инфекције (79,80). Епителне ћелије имају способност и да продукују β -дефензине као одговор на излучене IL-22 од стране Th17 ћелија (81) (**Фигура 4Б**). Додатно, оралне епителне ћелије могу да препознају и покрену реакције на *C. albicans* експримирајући PRRs, као што су *Toll-like* рецептори (енг. *Toll-like receptors*, TLRs), који активирају даљу сигнализацију за започињање продукције проинфламаторних медијатора и антимикуробних пептида (79).

1.5.2. Урођени имунски одговор

Урођени имунски одговор домаћина представља брз, неспецифичан и иницијални имунски одговор у одбрани од *C. albicans* (**Фигура 4А и Б**). Активирање урођеног имунског одговора на присуство *C. albicans* је омогућено преко PRRs који су присутни на ћелијама епитела и ендотела, као и на моноцитима/макрофагима, неутрофилима и дендритским ћелијама. Најпознатији рецептори одговорни за препознавање компоненти *C. albicans* су лектински рецептори C-типа (енг. *C-type lectin receptors*, CLR), TLRs, и рецептори слични

NOD (енг. *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*, NLRs), од којих су најзаступљенији CLRс и TLRс (76,79).

Молекуларни обрасци које поменути рецептори препознају су саставни делови ћелијског зида гљиве, у које спадају N- и O-повезани манани, β-гљукани и фосфолипманани. Када се рецептори активирају, долази до продукције хемокина и цитокина, који привлаче ћелије имунског система на место инфекције. Од ових молекула, најзначајнији су фактор стимулације колоније гранулоцита (енг. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), фактор стимулације колонија гранулоцита-макрофага (енг. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 и хемокински лиганд 5 (енг. *chemokine ligand 5*, CCL5). Епителне ћелије имају способност да препознају различите морфолошке облике *C. albicans* и да сходно томе усмере различите путеве активације имунског одговора (82).

Неутрофили - Најзначајније имунске ћелије у иницијалном имунском одговору на присуство *C. albicans* су неутрофили. Хемотакса неутрофила се може остварити ослобађањем хемокина из епителних ћелија (IL-1α, IL-1β, IL-8, G-CSF, GM-CSF, CCL20 и β-дефензинима) или директним доласком након препознавања секреторних аспартил протеиназа порекла *C. albicans*. На месту инфекције, неутрофили преко PRRс (TLR2, TLR4, TLR9, Dectin-1-3, DC-SIGN (енг. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) и MINCLE (енг. *macrophage inducible Ca-dependent lectin receptor*)) препознају садржај ћелијског зида гљиве и везују се за њега. Везивањем рецептора и ћелијског обрасца патогена покреће се процес фагоцитозе. Током процеса фагоцитозе неутрофил увлачи *C. albicans* у цитоплазму и формира фагозом. Након формирања фагозома долази до активације антимикуробних механизма за уништавање ингестиране *C. albicans*. Антимикуробни производи су ROS, антимикуробни пептиди и ензими, (дефензини и лизозими). Ове супстанце уништавају ћелију гљиве и превенирају њихову пролиферацију (82).

Други битан механизам који неутрофил користи у одбрани од *C. albicans* је формирање неутрофилних екстрацелуларних замки (енг. *neutrophil extracellular traps*, NETs). NETs се састоје од ДНА, хистона, и антимикуробних протеина које ослобађају неутрофили како би заробили и уништили *C. albicans*, која није фагоцитована. Антимикуробни протеини присутни у NETs су дефензини, мијелопероксидазе, азуроцидин и кателицидин. NETs поседују и способност да спрече стварање биофилма, као и адхезију гљива, кроз повећање производње ROS и спречавање апоптозе неутрофила. NETs имају улогу и у успоравању раста хифе, кроз ограничавање доступности микронутритијената попут цинка. Иако се NETs покрећу у присуству оба морфолошка облика *C. albicans*, неутрофили су осетљивији на присуство хифа. То су једине ћелије које могу да инхибирају транзицију морфолошког облика квасца у хифе (83).

Макрофаги поседују способност фагоцитозе *C. albicans*. Они користе специјализоване рецепторе на њиховој површини како би препознали и везали ћелије квасца. Једном када је *C. albicans* у фагозому, макрофаги активирају различите механизме како би уништили ћелије квасца, првенствено ROS и RNS. Макрофаги обрађују и презентују делове антигена *C. albicans* на својој површини користећи главни комплекс хистокомпатибилности (енг. *major histocompatibility complex*, MHC). Овим презентовањем антигена, активирају се друге имунске ћелије, као што су Т ћелије, које играју важну улогу у даљој координацији имунског одговора. Макрофаги продукују и ослобађају различите

цитокине зависно од своје поларизације. У случају инфекције *C. albicans*, макрофаги се поларизују у М1 проинфламаторни облик када секретују IL-1, IL-6 и фактор некрозе тумора (енг. *tumor necrosis factor*, TNF) - α . Ови цитокини помажу у регрутовању и активирају друге имунске ћелије, промовишући инфламацију и елиминацију инфекције (82).

Дендритске ћелије су такође важне у одбрани против инфекције *C. albicans*. Оне су специјализоване антиген-презентујуће ћелије које представљају мост између урођеног и стеченог имунског одговора. На месту инфекције, бивају привучене хемокинима (CCL206-8) и антимикуробним пептидима (β -дефензинима) које секретују епителне ћелије у реакцији на *C. albicans*. Као и неутрофили и макрофаги, дендритске ћелије могу да препознају и фагоцитују ћелије *C. albicans* специфичним PRRs, као што је Dectin-1, који препознају компоненте ћелијског зида гљива и β -гlukan. Након препознавања, дендритске ћелије фагоцитују *C. albicans*. После интернализације *C. albicans*, дендритске ћелије обрађују гљивичне антигене унутар фагозома и презентују их на својој површини у склопу МНС молекула. Презентацијом антигена дендритске ћелије активирају наивне Т ћелије и усмеравају њихову поларизацију првенствено према CD4+ Th ћелијама. Успостављањем стеченог имунског одговора и регулацијом равнотеже између имунске активације и толеранције, дендритске ћелије доприносе одбрани од инфекција *C. albicans* и помажу у координацији укупног имунског одговора како би се отклонила инфекција. Активирани дендритске ћелије секретују специфичне цитокине, као што су IL-12 и IL-23, који промовишу диференцијацију CD4+ Т ћелија у Th1 и Th17 подтип. Th1 ћелије продукују интерферон (енг. *interferon*, IFN)- γ , који покреће активацију макрофага и елиминацију интрацелуларних ћелија *C. albicans*, док Th17 ћелије продукују IL-17, који помаже у регрутовању и активацији неутрофила (57,82).

1.5.3. Стечени имунски одговор

У стеченом имунском одговору, најзначајнију улогу имају Т помоћничке ћелије које зависно од окружења и присутних цитокина могу да диферентују у Th1, Th2, Th17 и Treg подскуп ћелија (80).

Th1 имунски одговор

Након фагоцитовања *C. albicans* облика квасца, дендритске ћелије луче IL-12, активирајући Th1 имунски одговор (84). Поред IL-12, за активацију Th1 ћелија потребно је и присуство IFN- γ , TNF- α , IL-6 и TGF- β , уз одсуство антиинфламаторних цитокина, IL-4 и IL-10, који су показани да инхибирају активацију Th1 ћелија (85). Активирани Th1 ћелије, у одговору на *C. albicans*, почињу да луче проинфламаторне цитокине који укључују IFN- γ , TNF- α и GM-CSF. Најважнији цитокин је IFN- γ који подстиче даље активирање макрофага на остваривање својих основних функција, фагоцитозе и уклањања инфицираних ћелија (86) (87). Исту улогу, Th1 ћелије остварују и путем експресије TNF- α , док GM-CSF олакшава антифунгалну реакцију тако што спроводи секвестрацију цинка из интрацелуларног квасца и стимулише ROS у фагозома (88). (**Фигура 4Б и В**).

Th2 имунски одговор

Лучењем цитокина IL-4 од стране дендритских ћелија, покреће се имунски одговор посредован Th2 ћелијама. Активирани Th2 ћелије луче IL-4, IL-5 и IL-13 цитокине. IL-4 и

IL-13 су одговорни за покретање алтернативне активације макрофага (M2 поларизација), што отежава уклањање гљивица, а показано је да може да подстиче њихово размножавање (89). Алтернативно активирани макрофаги имају повишене нивое ензима аргиназе који смањују количину азот оксида и на тај начин слабе имунски одговор у борби против *C. albicans*. Додатно, IL-4 има кључну улогу у модулирању интеракције између имунских ћелија и гљивичних патогена. Овај цитокин може да индиректно утиче на приступ микронутријентима који су важни за гљивични раст унутар макрофага тако што регулише експресију рецептора за трансферин на површини макрофага, што резултује појачаним уносом гвожђа у ћелије. Ово повећава доступност гвожђа гљивицама, које је важно за њихов раст и преживљавање (90).

Th17 имунски одговор

Th17 ћелије су подскуп CD4+ Т ћелија које су развојно различите од Th1 и Th2 ћелија. Почетна диференцијација овог типа ћелија зависи од TGF- β и IL-6, док је за сазревање и завршну диференцијацију Th17 одговора неопходан IL-23 (91). Овај одговор се идентификује експресијом цитокина IL-17A, IL-17F и IL-22. Антифунгалну функцију у мукозном ткиву остварује тиме што производњом IL-17 подстиче епителне ћелије и кератиноците да луче антимикуробне пептиде (хистатине и дефензине) који опет директно уништавају ћелије *C. albicans*. Такође, учествује у регрутовању и активацији неутрофила. Додатно, IL-22 подстиче лучење антимикуробних пептида и одржава интегритет мукозне баријере за спречавање ширења инфекције (92) (**Фигура 4Б и В**).

У оралној слузокожи, недавно је идентификована категорија Th17 ћелија позната као природне Th17 ћелије (енг. *natural Th17*, nTh17), које се по свом фенотипу разликују од стандардних CD4+ Th17 ћелија. Као урођени стражари, nTh17 ћелије раде у синергији са $\gamma\delta$ Т ћелијама у производњи IL-17 када детектују *C. albicans*. Важно је напоменути да $\gamma\delta$ Т ћелије испуштају IL-17 у значајној количини, потврђујући интимну повезаност између урођеног препознавања *C. albicans* и последичних реакција стечене имуности (93).

Treg ћелије

Treg су подкласа помоћничких Т ћелија. Оне су део имунског система и имају значајну улогу у одржавању имунске равнотеже и спречавању нежељене аутоимунске реакције. Активирају се под утицајем TGF- β и IL-2. TGF- β утиче на диференцијацију Treg ћелија и помаже у одржавању супресивне функције. IL-2 учествује у пролиферацији и одржавању Treg ћелија, а помаже и у одржавању њихове супресивне функције (94).

Улога Treg ћелија у инфекцији са *C. albicans* може бити двострука и комплексна. Пре свега, Treg супримирају неједнак имунски одговор. Контролишу преживљавање и активност других Т ћелија и имунских ћелија тако да Treg могу да супримирају активацију Т ћелија, макрофага и других ћелија имунског система. Управо зато, ово за последицу може имати двосмеран ефекат:

- Прекомерна активност Treg ћелија може да супримира имунски одговор на *C. albicans*, што би могло допринети преживљавању и ширењу гљивица у ткивима и инфекцији.

- Умерена активност Treg ћелија може спречити неједнаки или прекомеран имунски одговор који би изазвао ткивну инфламацију и оштећење. Ово је важно у контролисању инфламаторних одговора и спречавању ткивних оштећења.

Регулација активности Treg ћелија је кључна у постизању баланса између толеранције и контроле инфекције *C. albicans*. Механизми помоћу којих остварује ту улогу је пре свега преко лучења регулаторних цитокина, IL-10 и TGF- β . Међутим, поред имунорегулаторне функције, Treg могу и да промовишу активацију Th17 одговора, секвестрацијом IL-2, који делује инхибиторно на диференцијацију Th17 ћелија (95).

1.5.4. Молекуларни чиниоци реакција на инфекцију *C. albicans*

У одговору домаћина на инвазију и инфекцију *C. albicans* продукују се и луче различити молекули, попут проинфламаторних и имунорегулаторних цитокина, који имају важно место у координацији реакција. У неке од најистакнутијих убрајају се:

- **Антимикробни пептиди:** Антимикробни пептиди су мали протеини које организми природно производе као део свог одговора у борби против бактерија, гљивица, вируса и других микроорганизама. Ови пептиди представљају важан део урођене имуности и карактерише их универзална активност (делују на широки спектар микроорганизама), кататонички ефекат (аминокиселине које изграђују ове пептиде су позитивно наелектрисане што их привлачи ка негативно наелектрисаним мембранама микроорганизама) и брза реакција. У ове молекуле убрајају се α и β – дефензини, хистатин, кателицидин и др. (96). У усној дупљи производе их пљувачне жлезде, епителне ћелије оралне слузнице, неутрофили и макрофаги, као и дендритске ћелије (97). Своју антимикробну функцију остварују путем оштећења мембране микроорганизама или инхибицијом њихових интрацелуларних процеса. Такође, ови пептиди делују и као стимулуси за активацију других ћелија имунског система на месту инфекције (96,97).
- **Интерлеукин 1 β (IL-1 β):** је проинфламаторни цитокин кога производе различити типови ћелија и важан је медијатор инфламације током инфекције. Синтеза, обрада и отпуштање IL-1 β строго су контролисани путем два механизма. Први, представља стимулацију микробима кроз интеракцију са PRRs која доводи до повећања интрацелуларних резерви прекурсорског облика pro-IL-1 β . Други механизам, је стимулација мултипротеинског комплекса састављеног од NLRs, назван инфламазом, који активира каспазе и формирање активне форме IL-1 β (98). У реакцијама на *C. albicans*, најбоље су описани механизми активације NLRP3 инфламазома и каспазе-1 кроз стимулацију TLR2 и дектина-1 дендритских ћелија и макрофага од стране β -глюкана гљивичног ћелијског зида, као и механизам активације мултипротеинског комплекса инфламазома и каспазе-8 стимулацијом екстрацелуларног дектина-1 на дендритским ћелијама (80,99). Активација инфламазома и последична експресија IL-1 β показана је и у оралним епителним ћелијама (99). Улога IL-1 β у реакцијама на *C. albicans* је вишеструка и укључује способност овог цитокина да ступи у интеракцију са одговарајућим рецептором (IL-1R) на површини различитих имунских ћелија и да стимулише производњу других цитокина попут TNF- α и IL-6 (100). Затим, IL-1 β може да стимулише експресију адхезионих молекула у ендотелним ћелијама и појача хемотаксу леукоцита и

производњу протеина запаљења, као што су простагландини. Такође, у садејству са IL-18, IL-1 β усмерава активацију и диференцијацију Th ћелија, посебно Th17 (99,101).

- **Интерферон γ (IFN- γ):** представља важан цитокин протективног Th1 одговора на инфекцију кога првенствено производе активирани Т лимфоцити и NK ћелије. Продукција IFN- γ у току оралне инфекције *C. albicans* најважнија је за активацију макрофага и стимулацију фагоцитозе. Показано је да IFN- γ стимулише продукцију азот оксида у макрофагима, што директно оштећује ћелијску мембрану гљиве. Такође, IFN- γ појачава активност антиген презентујућих ћелија и активацију Th1 одговора, а важан је и стимулус запаљенских процеса (102).
- **Фактор некрозе тумора α (TNF- α):** је плеиотропни цитокин који производи различите имунске и инфламаторне одбрамбене одговоре домаћина. Већина инфламаторних стимулуса, инфекција и стреса доводе до производње TNF- α . Производе га макрофаги, неутрофили и Т лимфоцити након стимулације и представља важан фактор хемотаксе моноцита и неутрофила. TNF- α представља један од важних проинфламаторних цитокина који у садејству са IL-1 β , стимулише продукцију IL-8, важног за хемотаксу неутрофила. Додатно, TNF- α подстиче дегранулацију неутрофила и отпуштање ROS (103). Стимулација ових ћелија са TNF- α индукује фагоцитозу и додатну продукцију хемокина који промовишу акумулацију макрофага на месту запаљења (104). Резултати студија су показали да TNF- α делује протективно у анималном моделу системске кандидијазе код мишева (105). TNF- α се производе током системске инфекције *C. albicans* код гранулоцитопеничних мишева, што додатно сугерише на његов значај за антифунгалну активност гранулоцита *in vivo* (106). Такође, студијама на TNF- $\alpha^{-/-}$ дефицијентним мишевима показана је његова значајна улога у одржавању уобичајеног имунског одговора на орофарингеалну инфекцију *C. albicans* (107).
- **Интерлеукин 6 (IL-6)** – је плеоморфни цитокин укључен у процесе одговора ткива на трауму или инфекцију. Производе га многе ћелије укључујући макрофаге, неутрофиле, кератиноците, фибробласте и ендотелне ћелије (108). IL-6 има улогу у иницијалној активацији имунског одговора и координацији запаљенских процеса током одговора на оралну кандидијазу. Овај цитокин доприноси мобилизацији имунских ћелија, производњи антитела, и регулацији протеина запаљења како би се организам ефикасно борио против инфекције *C. albicans* (109).
- **Интерлеукин 4 (IL-4):** има важну улогу у регулацији имунског одговора, посебно у контексту алергијских реакција и Th2 типа одговора. Међутим, његова улога у оралној инфекцији *C. albicans* може бити сложена и контроверзна. Налази већине претходних публикација сугеришу повезаност присуства IL-4 са погоршањем оралне кандидијазе (80). Наиме, студије су показале да Th2 одговор, који карактерише производња IL-4 и сличних цитокина, може ослабити ефикасност имунског одговора на *C. albicans* и инхибирати протективне ефекте Th1 одговора. Прекомерно присуство IL-4 и Th2 ћелија може довести и до несразмерног запаљења и слабљења способности тела да се бори против инфекције (46). Међутим, поједине студије сугеришу да IL-4 такође може имати и позитивне ефекте у одговору на оралну кандидијазу (89). На пример, IL-4 може помоћи у стимулацији производње специфичних антитела против *C. albicans* (110). Такође, IL-4 је важан у одржавању

равнотеже између различитих типова имунских одговора, стимулацији Th1 одговора и спречавању прекомерног запаљења (111).

- **Интерлеукин 10 (IL-10):** Интерлеукин-10 је најзначајнији имунорегулаторни цитокин. Једна од главних улога IL-10 је имуносупресија и инхибиција активације Т-ћелија и макрофага, чиме се спречава претерани имунски одговор (112,113). У случају оралне кандидијазе, ово може имати двоструки ефекат. С једне стране, инхибиција прекомерног запаљења може помоћи у смањењу оштећења ткива изазваног инфламаторним одговором, док с друге стране, може ослабити способност тела да се ефикасно бори против инфекције (114). Резултати клиничких студија су показали да постоји позитивна корелација између повишених серумских вредности IL-10 и повећане учесталости оралне кандидијазе код пацијената са типом 2 дијабетеса (115). Такође, IL-10 има кључну улогу у балансирању инфламаторних одговора кроз модулацију Th1 и Th2 ћелија, као и других компоненти имунског система (112). IL-10 може утицати и на развој Th17 одговора, али и Th9 и Th22 ћелија, које су последње деценије стекле велику пажњу због ефеката у мукозној одбрани од патогена (89).
- **Интерлеукин 17 (IL-17):** Интерлеукин -17 представља потенцијално најзначајнији цитокин у реакцијама оралних ткива на инфекцију *C. albicans*. Претходна истраживања показала су да су мишеви и људи који имају оштећење у сигнализацији посредованој рецептором за IL-17, веома подложни развоју орофарингеалне кандидијазе (116). Главни извори IL-17 у одговору на инфекцију *C. albicans* су неутрофили, макрофаги и, најважније, Th17 ћелије. У случају оралне кандидијазе додатни извор IL-17 су $\gamma\delta$ -Т и nTh17 ћелије (80,117). Антифунгална улога IL-17 је вишеструка. Пре свега, IL-17 је потентни активатор неутрофила кроз индукцију експресије значајних цитокина и хемокина G-CSF, CXCL1/2 и 5 у оралним ткивима (118). Следеће, IL-17 индукује продукцију антимикуробних пептида, најзначајније β -дефензина-1 и -3 (118). Такође, показано је да IL-17 може да утиче и на пљувачне жлезде повећавајући концентрацију антимикуробног пептида, хистатина у излученој пљувачки (119).
- **Трансформишући фактор раста β (TGF- β):** TGF- β има сложenu улогу у регулисању имунског одговора на оралну кандидијазу. Доприноси одржавању равнотеже између супресије запаљења и очувања интегритета ткива, подржава развој Th17/IL-17 имунског одговора и стимулише производњу антимикуробних пептида (120,121). Такође, TGF- β је значајан у контроли развоја Treg ћелија и меморијских Т ћелија (122). Наведене функције означавају TGF- β као важан фактор у одбрани од инфекције *C. albicans* у усној дупљи.

1.6. УЛОГА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ОРАЛНОЈ КАНДИДИЈАЗИ

Током дејстава домаћина против инвазије *C. albicans* ћелијама урођене имуности, активирани фагоцити покрећу одбрамбене механизме који за ту намену продукују велике количине ROS кроз процес назван „респираторни прасак“. Након цитокинске стимулације, фагоцити активирају комплекс NADPH оксидазе резултујући стварањем супероксидног анјона (O_2^-). Супероксид се путем Хабер-Вајс (енг. *Haber-Weiss*) реакције претвара у водоник пероксид (H_2O_2) дејством супероксид дизмутазе (енг. *superoxide dismutase*, SOD) (123). Показано је да особе са хроничном грануломатозном болешћу, стање које је повезано

са дефицијенцијом комплекса NADPH оксидазе, поседују већу осетљивост на инфекције кандидом (47). Фагоцитне ћелије у којим се ствара ROS, ове молекуле користе и у фагозому, али их отпуштају и у околну средину. У фагозомима генерисани ROS ствара токсичну средину за *C. albicans* узрокујући оксидативни стрес у ћелијама гљиве. ROS узрокују иреверзибилна оштећења на ћелијама *C. albicans* кроз интеракције са протеиним, липидима и нуклеинским киселинама. Процеси пероксидације липида узроковане ROS доводе до оштећења ћелијског зида гљиве, док ROS отпуштене у околну средину могу да изазову и програмирану ћелијску смрт *C. albicans* (124). Додатно, осим порекла фагоцита, ROS продукују и микроорганизми оралне микрофлоре као што су *Enterococcus faecalis* (125) и врсте *Lactobacillus* (126). Ово омогућава да *C. albicans* буде изложена оксидативном стресу још пре фагоцитозе, што може, са једне стране, да допринесе већем отклањању гљивичних ћелија, док са друге стране, може да подстакне кандиду да покрене механизме одбране од оксидативног стреса (127). *C. albicans* поседује различите софистициране механизме одбране од оксидативног стреса попут активације антиоксидативних ензима (CAT1, SOD, GSH, пероксидазе и др.) и морфогенезе током фагоцитозе (чиме доприноси разарању фагоцитне ћелије) (123).

Продукција ROS од стране фагоцитних ћелија може утицати и на друге ћелије, како локално, тако и системски. Локално, ROS може узроковати додатну хемотаксу и активацију фагоцитних ћелија (128). Међутим, ако постоји дисбаланс у продукцији ROS и антиоксидативних ензима, који за циљ имају да их неутралишу, може доћи и до оксидативног стреса у локалном ткиву узрокујући оштећење ћелија домаћина (129). Такође, показано је да лезије оралне мукозе могу да поремете локалне оксидативне механизме доводећи до оксидативног стреса који се може регистровати и у другим ткивима, попут крви (129,130).

1.7. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ

Пацови се веома често користе као анимални модели за индуковање оралне кандидијазе. Врло су слични физиологији човека. Деле много физиолошких сличности са људима, посебно у структури и функцији њихове оралне мукозе и имунског система. Пацови су лако доступни, лаки за руковање и релативно исплативи у поређењу са неким другим животињским моделима. Њихова мања величина их такође чини практичним у истраживачке сврхе. Генетски су варијабилни, а могућа је и манипулација њиховим имунским системом. Могу бити имуносупримирани или подвргнути другим имуномодулирајућим интервенцијама, чиме је могуће истражити утицај имунског статуса на развој оралне кандидијазе (131).

1.7.1. Грађа језика пацова

Језик је мишићни орган пацова, чија је горња површина (дорзална страна) прекривена делимично орожалим плочасто слојевитим епителом. Доња површина језика (вентрална страна) је прекривена плочасто слојевитим епителом без орожавања. Испод епитела, налази се растресито везивно ткиво ламине проприје које прожимају крвни судови. Испод везивног ткива, налазе се пругасти мишићи, груписани у снопове. У задњем делу мишићних влакана, смештене су и мале мукозне и серозне пљувачне жлезде. Слузокожа

дорзалне стране језика је неравна због присуства језичних папила. Према облику разликују се:

Опшанчене папиле (лат. *Papillae circumvallate*) су највеће, папиле које су смештене у задњем делу језика, близу тонзила. Састоје се од плочасто слојевитог епитела и ламине проприје. Епител горње површине папиле показује знаке кератинизације, док су бочне стране прекривене плочасто слојевитим епителом без кератинизације и садрже велики број густативних папила. Смештене су дуж линије познате као „V појас“ и распоређене су у облику слова „V“ или „U“ на задњој површини језика. Обично се простиру од средине задњег дела језика према корену језика. Ове папиле имају бројне функције, укључујући перцепцију укуса и регулацију гутања хране.

Кончасте папиле (лат. *Papillae filiformis*) су ситне трнасте структуре које су дифузно распоређене по читавој дорзалној површини језика. Најбројније су и најмање папиле на површини језика. Помажу у мастикацији хране и спадају у механичке папиле јер не садрже густативне корпускуле.

Печуркасте папиле (лат. *Papillae fungiformes*) се налазе на површини језика, обично у предњем делу, ближе врху. Уобичајено се простиру дуж предње трећине језика, формирајући густо распоређене, тачкасте или кончасте папиле које се издвајају од околног ткива језика. Обично су црвене боје због богате васкуларизације у том подручју. Садрже густативне корпускуле који играју кључну улогу у перцепцији укуса (131).

1.7.2. Експериментални модели оралне кандидијазе на пацовима

Наследни фактори обликују имунску реакцију, па сходно томе, појединци могу имати разноврсне реакције на идентичне спољашње стимулусе (132). Варијације гена, познате као генетски полиморфизми, могу имати различит утицај на развој многобројних болести, укључујући кандидијазу (133). Ипак, механизми који стоје иза ових генетских фактора и њихов утицај на осетљивости нису потпуно разјашњени.

Претходним студијама је показано да су особе осетљивије на развој оралне кандидијазе зависно од доби, степена одржавања оралне хигијене и других фактора ризика (66). Такође, полиморфизми појединачних нуклеотида у генима који кодирају TLR1 и TLR2 су повезани са повећаном осетљивошћу на гљивичне инфекције (134). Разоткривање генетских фактора, као и других ризичних фактора који могу утицати на повећану склоност ка формирању оралне кандидијазе, кључно је за ефикасну превенцију, дијагностику и адекватан терапеутски приступ овом обољењу. За ове потребе успостављени су многобројни протоколи за изазивање и проучавање оралне кандидијазе на експерименталним животињама:

Орална инокулација *C. albicans* – *C. albicans* се култивише и припрема у суспензији. Суспензија се директно апликује у усну дупљу животиње. Апликација се може извршити помоћу пипете, штапића за брис, или помоћу неких других помоћних метода. Инокулирана доза и фреквенција зависе од студијског дизајна и жељене тежине инфекције (131).

Имуносупресија: Да би се опонашала стања у којима се орална кандидијаза често јавља код људи, имунски систем животиње може бити супримиран пре инокулације.

Имуносупресивни агенси као што су кортикостероиди или циклофосфамид се често користе за слабљење имунског система. Ослабљена имунска одбрана чини животиње подложнијим инфекцији *C. albicans*, а орална кандидијаза се може развити спонтано или након инокулације (135).

Предтретман антибиотиком: Примена антибиотика може пореметити природан орални микробиом код животиња. Промене у оралном микробиому стварају окружење које је погодније за колонизацију *C. albicans*. Након претходног третмана антибиотиком, инокулација *C. albicans* може лако довести до оралне кандидијазе (136).

Постављање зубне протезе (за изазивање протезног стоматитиса): Протезе могу створити повољно окружење за колонизацију *C. albicans*, посебно у областима које су покривене акрилатном плочом протезе (137).

Генетски модел: Могу се користити и пацови са нарушеним имунским одговором или специфичним генским мутацијама како би биле подложније настанку инфекције *C. albicans*. Ти модели омогућавају да се истражи утицај специфичног гена на осетљивост оралне кандидијазе (138).

Индуковање хипосаливације: Хипосаливација ствара окружење у којем је орална слузокожа подложнија инфекцији *C. albicans*. Хипосаливација се може постићи уклањањем великих пљувачних жлезда, сиалоаденектомијом, након чега се врши инокулација *C. albicans* (139).

Оваријектомија: Оваријектомија доводи до хормонског дисбаланса код пацова, чинећи их подложнијим инфекцији *C. albicans*. Након спроведеног поступка оваријектомије и истека времена опоравка експерименталних животиња, врши се инокулација *C. albicans* (140).

1.8. МЕЂУСОЈНЕ РАЗЛИКЕ У ОСЕТЉИВОСТИ НА РАЗВОЈ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ МОДЕЛА БОЛЕСТИ

Генетичка варијабилност различитих сојева глодара који се користе у експерименталним студијама, може одразити генетички диверзитет који постоји у људској популацији. Животињски модели болести су добар начин испитивања генских предиспозиција јер је познато да генска подлога различитих сојева животиња утиче на патогенезу болести услед наслеђених разлика у поларизацији специфичног имунског одговора. (141–143). Такође, установљено је да је однос између Th1 и Th2 имунског одговора кључан за коначни исход обољења. BALB/c и C57BL/6 мишеви представљају сојеве најчешће коришћене за испитивање имунорегулација у разноврсним моделима болести, док су Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (AO) сојеви пацова који се најчешће користе у имунолошким истраживањима како би се испитали различити аспекти имунског одговора. Иако се оба соја сваке врсте уобичајено користе и појединачно, они се често упоређују у истраживањима како би се доказале разлике у имунском одговору због различите генетске позадине и физиолошких карактеристика. Упоредном анализом различитих сојева мишева показано је да C57BL/6 мишеви доминантно развијају Th1 имунски одговор, док BALB/c мишеви развијају имунски одговор посредован Th2 ћелијама. Сходно томе, показано је да C57BL/6 мишеви продукују више IFN- γ , а IL-4 смањено у моделу болести у односу на BALB/c сој, што их чини потенцијално отпорнијим на

бактеријске, вирусне и гљивичне инфекције. Варијабилности у расподели имунских ћелија у многобројним метаболичким ткивима различитих мишјих сојева су суштинске и наследне. Ово је доказано претходним истраживањем других аутора где су показане наследне различитости у метаболичким процесима, инфламацији, фибрози и имунском одговору ова два соја мишева када су подвргнути исхрани богатој мастима (142).

За испитивање имунског система у оквиру различитих болести, поред мишева, често су коришћени и упоређивани инbredни DA и AO сојеви пацова (143–146). Сојне разлике детаљно су испитиване у моделима дијабетес мелитус типа I и аутоимунског енцефаломијелитиса где је показано да постоје разлике у величини и саставу запаљенског инфилтрата, као и разлике у цитокинској продукцији у испитиваним ткивима (141,143,145). На основу налази ових студија, AO пацови се сматрају резистентнијим на испитиване болести јер је код њих доминантнији Th2 имунски одговор и значајна регулације Th1/Th17 ћелија уз ниску производњу INF- γ и IL-2. Насупрот томе, код DA пацова доминантно је изражен имунски одговор предвођен Th1/Th17 ћелијама што је узроковало већи степен запаљења у испитиваним моделима болести (143,145). Сличне налазе показује и студија Zivanovic *et al.* (146), у којој су DA пацови показали значајно јачи имунски одговор и појачано запаљење уз присуство веће деструкције ткива у односу на AO сој у експерименталном моделу апикалног пародонтитиса. Међутим, наведени експериментални модел подразумева запаљење узроковано бактеријским инфективним агенсима, што резултате поменуте студије чини мање примењивим у тумачењу потенцијалних имунских реакција на инфекцију изазвану гљивицама. У доступној литератури, једино истраживање које је за циљ имало упоређивање разлика у одговорима на гљивичну инфекцију између ова два соја је студија Mirkov *et al.* (147) где су на моделу пулмоналне инфекције гљивицом *Aspergillus fumigatus* показали већу осетљивост AO соја на гљивичну инфекцију у односу на DA сој.

На основу свега наведеног, поставља се претпоставка да генетске варијације могу утицати на развој оралне кандидијазе путем њихове потенцијалне улоге у регулацији имунског одговора на гљивичне инфекције. Стога је сврха овог истраживања била истражити утицај генетских разлика између сојева на имунски одговор у патогенези експерименталне оралне кандидијазе код DA и AO пацова.



2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања је да се испитају сојне разлике Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (AO) пацова у индукцији, прогресији и типу имунског одговора на оралну кандидијазу изазвану различитим експерименталним моделима.

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су следећи експериментални задаци:

1. Дефинисати и квантификовати степен колонизације епитела *C. albicans* у оралној слузници селективним хистолошким бојењима код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
2. Дефинисати и квантификовати степен оштећења епитела код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
3. Дефинисати и квантификовати инфламаторне промене у оралној слузници хистолошким бојењима код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
4. Испитати фенотипске карактеристике ћелија које посредују у инфламацији оралне слузнице имунохистохемијским бојењима код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
5. Испитати експресију гена за цитокине који посредују у процесу инфламације: IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-17, TGF- β код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
6. Испитати концентрације цитокина IFN- γ , TNF- α , IL-6 и IL-10 у серуму DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе
7. Утврдити концентрацију параметара оксидационог стреса (индекса липидне пероксидације (TBARS), азот монооксида NO⁻ (у облику нитрита), супероксид анион радикала (O₂⁻), водоник пероксида (H₂O₂), каталазе (CAT), супероксид-дизмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH)) код DA и AO пацова у различитим моделима оралне кандидијазе

2.1. РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

Постоји разлика у карактеристикама обољења и у типу имунског одговора на оралну кандидијазу између Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (AO) сојева пацова.

Уочене разлике могу бити последица:

1. Различитих степена колонизације епитела *C. albicans* у оралној слузници DA и AO пацова као одговор на оралну кандидијазу.
2. Различитих степена оштећења епитела у оралној слузници DA и AO пацова као одговор на оралну кандидијазу.
3. Величине и састава инфламаторног инфилтрата у оралној слузници DA и AO пацова као одговор на оралну кандидијазу.
4. Разлике у експресији релевантних цитокина (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TGF- β) код DA и AO пацова у моделима оралне кандидијазе.
5. Разлике у концентрацији цитокина IFN- γ , TNF- α , IL-6 и IL-10 у серуму DA и AO пацова у моделима оралне кандидијазе.
6. Различитих концентрација параметара оксидативног стреса у системској циркулацији DA и AO пацова у моделима оралне кандидијазе.

МАТЕРИЈАЛ
И МЕТОДЕ



3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЕТИЧКО ОДОБРЕЊЕ

Сви експерименти су спроведени у складу са одобрењем Етичке комисије за добробит огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија (број протокола: 01-7677, број одобрења: 01-7993). Сви експериментални поступци су били у складу са директивом Европске уније за добробит лабораторијских животиња (2010/63/ЕУ), директивом Савета европских заједница (86/609/ЕЕЗ), принципима добре лабораторијске праксе и смерницама за истраживања на животињама и извештавање експеримената *in vivo* (енг. *animal research: reporting in vivo experiments*, ARRIVE) (148).

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

У експерименталном истраживању коришћени су пацови соја DA (n=35) и АО (n=35), мушког пола, старости 8 недеља, добијени из установе за узгој пацова Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду. Све животиње су одгајане у стандардним условима у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Србија, уз стандардну исхрану и неометаним приступом води и храни, у стандардним условима виваријума (температура 22-25°C и влажност ваздуха од 50%) са циклусима дан/ноћ од 12 часова.

3.2.1. Снага студије и величина узорка

Величина узорка за сваку групу одређена је према резултатима претходне студије сличног дизајна (149). За потребе одређивања величине узорка коришћен је бесплатан софтвер доступан на интернету (*G*Power v.3; Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Dusseldorf, Germany*). Прорачуни су спроведени узимајући у обзир снагу студије од 0,80 и вероватноћу грешке α од 0,05, за услове Т-теста који укључују два независна узорка. На основу резултата прорачуна, утврђено је да је за ову врсту студије потребно 5 експерименталних животиња за сваку групу. Узимајући у обзир могућност губитка узорка у току експеримента, у студију је укључено укупно 70 пацова.

3.3. ИЗОЛОАЦИЈА *C. ALBICANS*

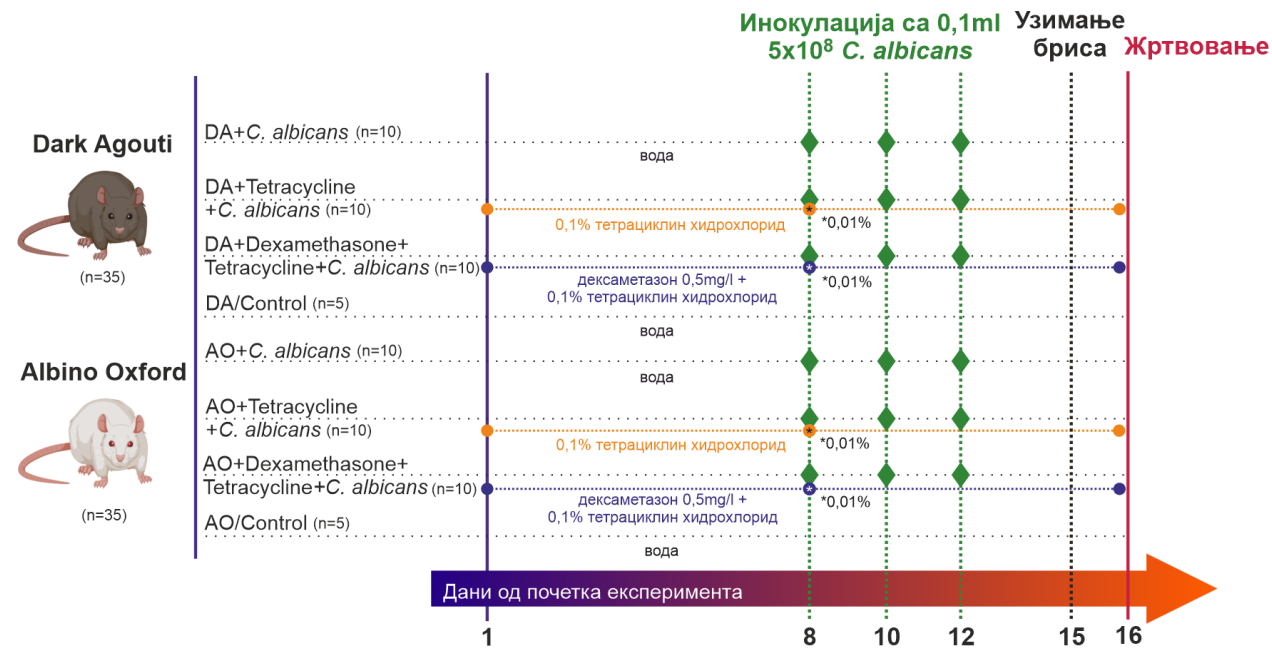
Узорци *C. albicans* за потребе овог истраживања добијени су узимањем бриса непца пацијената оболелих од протезног стоматитиса. Сакупљени узорак је обрађиван у лабораторији, пре свега, наношењем бриса на подлогу која инхибира раст бактерија и подстиче раст врста *Candida* (*Sabouraud Dextrose Agar; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*) како би се издвојила *C. albicans*. Затим, плоче са инокулисаним културама су инкубиране на одговарајућој температури (37°C), током периода 24-48 сати. Раст *C. albicans* се видео као кремасто бела колонија, што је потврђено микроскопским испитивањем према претходно описаном методу (150).

3.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ

У овом истраживању коришћена су три претходно описана експериментална модела индуковања оралне кандидијазе (131,151) и то:

- Орална инокулација *C. albicans*
- Предтретман антибиотиком и орална инокулација *C. albicans*
- Изазивање имуносупресије, предтретман антибиотиком и орална инокулација *C. albicans*

Орална кандидијаза је изазвана према једном од претходно описаних метода (131,151). Укратко, у групама које су примале кортикостероиде, експерименталне животиње су биле подвргнуте имуносупресији коришћењем дексаметазона свакодневно кроз воду за пиће у концентрацији од 0,5mg/l, почевши од 1. дана до краја експерименталног периода. Такође, групе које су биле подвргнуте антибиотицима су првих седам дана примале водени раствор 0,1% тетрациклин хидрохлорида, а од осмог дана до краја експеримента, концентрације су смањене на 0,01% тетрациклин хидрохлорида. Остале животиње добијале су само чисту воду за пиће. Инокулација *C. albicans* је урађена 8. дана. Пре инокулације, животиње у свим експерименталним групама анестезиране су интраперитонеалном инјекцијом кетамин хидрохлоридом (100mg/kg) и ксилазином (10mg/kg) и стављене на плочу за отварање вилица. Орална инокулација *C. albicans* је извршена помоћу натопљеног памучног штапића у количини од 0,1ml раствора који садржи 5×10^8 ћелија *C. albicans*. Овај поступак је поновљен још два пута у интервалима од 48 сати (10. и 12. дана). После три дана (дан 15), узети су брисеви са оралне слузокоже експерименталних животиња како би се потврдило присуство *C. albicans*. Следећег дана све животиње су жртвоване. Укупан експериментални период од имуносупресије до жртвовања је био 16 дана. Експериментални протокол наше студије представљен је графички на Фигури 5. Након жртвовања животиња у атмосфери zasiћеној диетил етром (БЕТА ХЕМ, Београд, Србија), изоловани су језици који су коришћени за хистолошку, имунохистохемијску и анализу квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену. За анализу параметара оксидативног стреса и концентрација одговарајућих цитокина коришћени су узорци крви. (Фигура 5)



Фигура 5. Схематски приказ експерименталних модела индукције оралне кандидијазе

3.4.1. Експерименталне и контролне групе

Експерименталне животиње су зависно од метода индукције оралне кандидијазе подељене у 6 експерименталних и 2 контролне групе на следећи начин:

- I. DA+*C. albicans* – пацови DA соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом оралне инокулације *C. albicans*;
- II. DA+Tet+*C. albicans* – пацови DA соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом предтретмана антибиотиком (Tet) и оралне инокулације *C. albicans*;
- III. DA+Dex+Tet+*C. albicans* – пацови DA соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом изазивања имуносупресије (Dex), предтретмана антибиотиком (Tet) и оралне инокулације *C. albicans*;
- IV. AO+*C. albicans* – пацови AO соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом оралне инокулације *C. albicans*;
- V. AO+Tet+*C. albicans* – пацови AO соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом предтретмана антибиотиком (Tet) и оралне инокулације *C. albicans*;
- VI. AO+Dex+Tet+*C. albicans* – пацови AO соја (n=10) којима је индукована орална кандидијаза методом изазивања имуносупресије (Dex), предтретмана антибиотиком (Tet) и оралне инокулације *C. albicans*;
- VII. DA/Control– пацови DA соја (n=5) којима није индукована орална кандидијаза (DA контролна група);
- VIII. AO/Control– пацови AO соја (n=5) којима није индукована орална кандидијаза (AO контролна група);

3.4.2. Жртвовање животиња, прикупљање и припремање узорака крви и изолација језика

Жртвовање животиња обављено је 16. дана експеримента. Жртвовање је извршено у атмосфери засићеној диетилетром (*BETA NEM, Belgrade, Serbia*), цервикалном дислокацијом.

По жртвовању, прикупљени су узорци крви и стављени у епрувету са антикоагулантним средством, а затим центрифугирани 10 минута на 3000 обртаја по минути (енг. *revolutions per minute, rpm*). Центрифугирањем се одвајају црвени слој (доња фаза) коју сачињавају еритроцити и жути слој (горња фаза), која представља крвну плазму. Жути слој је одливан у нове епрувете од 1,5ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*), које су затим стављене у замрзивач на -20°C до даље анализе.

Преостали слој еритроцита подвргнут је даљим поступцима испирања ради добијања лизата; пре свега, растварањем охлађеним физиолошким раствором у запремини која је 3 пута већа од преосталог талоба крви и центрифугирањем у трајању од 10 мин на 3000rpm. Овај процес је поновљен још два пута. Након сваког испирања, одливан је супернатант, а на преостали талог је наливен хладан физиолошки раствор, да би на крају последњег испирања преостали талог био наливен хладном дестилованом водом у размери 1:3. Крвна плазма је одложена у замрзивач на -20°C до даље анализе.

Узорци језика су изоловани од осталих ткива орофацијалног система помоћу малих хируршких маказа. Узорци језика су уздужно подељени и стављени у бочице са одговарајућим раствором за даље анализе.

3.5. ХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА

Након еутаназије пацова, узети су узорци ткива језика који су подељени уздужно на две половине и једна половина је фиксирана у 4% формалину, а затим укалупљена у парафин (енг. *formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE*) како би се извршила хистопатолошка анализа тежине оралне кандидијазе и имунохистохемијска анализа. После калупљења, ротирајућим микротомом су сечени узорци на пресеке димензије 5 μm , а затим су обојени хематоксилином и еозином како би се одредила локализација инфламаторних инфилтрата, интезитет инфламаторне инфилтрације и степен оштећења епитела. У циљу визуелизације квасаца и хифа у узорцима језика, извршено је бојење периодичном киселином по Шифу (енг. *periodic acid Schiff, PAS*).

3.5.1. Припрема ткива

3.5.1.1. Фиксација ткива

Ради спречавања разградње ткива од стране протеолитичких ензима попут катепсина из лизозима и ткивне деградације узроковане ензимима сапрофитских бактерија, ткиво се подвргава процесу фиксације. Фиксација ткива има за циљ деактивацију ензима присутних у лизозомима, спречавање њиховог ширења у цитоплазми ћелија и изазивање промена у пермеабилности ћелијске мембране. Путем фиксације осигурава се очување протеинске структуре унутар ћелије, задржава се ћелијска морфологија, чува се аутентична позиција хемијских супстанци и онемогућава насељавање микроорганизмима.

Фиксација ткива може бити изведена на два начина, физичким (попут топлоте, микроталасног зрачења или замрзавања) и хемијским методама (путем потапања у фиксатив или перфузијом). Хемијска фиксација ткива се најчешће примењује када се препарати планирају за посматрање ткива помоћу светлосног микроскопа. Користећи 4% неутрални формалин, постиже се процес хемијске фиксације ткива. Формалин стабилизује ткиво путем интермолекуларног повезивања протеина, креирајући мултипле метиленске везе између формалинских молекула и протеина. У оквиру експерименталног истраживања, узорци половине језика од 70 експерименталних животиња фиксирани су у 4% раствору параформалдехида, припремљеног разблаживањем *Formaldehydum sol.* са концентрацијом од 37-40%. Ткива језика потопљена су у параформалдехид и остављена су око 24 сата у условима собне температуре. Након завршетка фиксације, ткиво се подвргава даљим процесима обрађивања, у циљу да се вода из ткива замени парафином. Постфиксациони поступак укључује дехидратацију, уклањање алкохола ксилолом и импрегнацију ткива парафином течног стања.

3.5.1.2. Дехидратација

У ткиву се вода може наћи као слободна или везана. Док слободна вода чини 97% укупне количине, 3% представља вода повезана с макромолекулима попут протеина и угљених хидрата. Дехидратација представља поступак замене слободне воде алкохолом, док вода везана за молекуле остаје унутар ткива. Поступак дехидратације се обавља како би се ткиво припремило за парафинску импрегнацију. Процедура дехидратације укључује потапање исечака ткива у посуду напуњену алкохолом различитих концентрација, крећући се од најниже до највише концентрације.

3.5.1.3. Осветљавање ткива у ксилолу

Након завршеног поступка дехидратације, слободна вода је замењена алкохолом. Пошто се парафин и алкохол не мешају, потребно да је да алкохол из ткива буде уклоњен, а затим замењен медијумом са којим се може мешати парафин. Ово се постиже коришћењем ксилола, органског растварача који се налази у истој групи као и парафин, а то је група угљоводоника. Ксилол, као органски растварач са високим коефицијентом преламања светлости, не само да елиминише алкохол, већ и отапа део липида, али и уља из ткива, чинећи ткиво прозирним.

3.5.1.4. Парафинска импрегнација ткива

Како би се узорци ефикасно исекли на серије секција помоћу микротоме, потребно је да ткиво буде импрегнирано парафином. Парафин, који је дериват прераде минералних уља и угља, пружа потпору ткивним формацијама и омогућава прецизно и лако сечење ткивних узорака на микротому. Температура од 56-60°C је потребна за процес импрегнације ткива парафином, при чему је избегнуто оштећење ткива од топлотних и хемијских фактора. Процесом парафинизације, постиже се потпуна замена ксилола импрегнираним парафином. Након тога, ткиво језика је уграђено у парафинске калупе.

Калупљење у парафинске блокове постиже се утискивањем исечака ткива језика у металне посуде које садрже смешу воска и парафина. Из уграђених ткивних узорака језика, помоћу микротоме, добијени су танки сегменти исечка ткива дебљине 5µm. Након тога, ткивни исечци су пренесени у водену купку чија је температура износила 45 °C. Из воденог купатила, предметним стаклима су сакупљени исечци ткива, која су онда постављена у термостат температуре 56 °C где су сушени 12 часова.

3.5.1.5. Бојење исечака хематоксилин-еозином (H/E)

H/E бојење је једно од често коришћених хистолошких бојења. Једра ћелије (базофилне структуре) боји црно, плаво или сиво, а цитоплазму (ацидофилне структуре) боји у црвену или розу боју. Хематоксилин се не убраја у боје. Хематоксилин се претвара у хематеин који има улогу у бојењу једра, док еозин боји ћелијску цитоплазму.

Да би се постигло H/E бојење, пре свега, потребно је уклонити парафинску импрегнацију. Ово је постигнуто излагањем ткивних исечака језика температурном третману на 56°C у трајању од 45 минута и потапањем у кивете са ксилолом. Након елиминације парафина, уследила је рехидратација ткивних узорака. Овај процес је извршен потапањем ткивних исечака у серијама опадајућих концентрација алкохола, где се ткиво два пута потапало у 100% алкохол, а затим једном у 96% алкохол, 70%, и на крају у 50% алкохол, сваки пут у трајању од пет минута. После третмана алкохомом, сечени узорци ткива су урођени у дестиловану воду у трајању од пет минута.

По завршетку поступка рехидратације, ткиво је бојено десет минута Мајеровим раствором хематоксилина (*Sigma Aldrich, SAD*) и затим испрано дестилованом и текућом водом током пет минута. Хематоксилином обојени исечци ткива су након тога били изложени алкохолном раствору еозина на два минута (*Sigma Aldrich*). Након H/E бојења, ткивни исечци су били подвргнути поступку дехидратације: потапањем у 70% алкохол током шездесет секунди, а затим у 96% и 100% алкохол по два пута, сваки пут по педесет секунди. Следећи корак је био потапање исечака ткива језика у комбинацију ксилола и алкохола у односу 1:1, током шездесет секунди. Након тога, ткивни исечци су премештени у две различите посуде испуњене ксилолом где су задржане још шездесет секунди. Завршна фаза бојења укључивала је примену канадске смоле (*Canada balsam, Centrohem, Serbia*) и прекривање препарата покровним стаклима, а потом сушење 24 сата у условима собне температуре. Анализа и фотографисање ткивних исечака језика обављени су светлосним микроскопом (*DM4000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) и дигиталном камером (*DMC295; Leica Microsystems*).

3.5.1.6. Бојење исечака периодичном киселином по Шифу (PAS)

Након што је обављена фиксација, дехидратација и парафинизација, ткивни парафински узорци су исечени микротомом на ткивне исечке дебљине 5µm као што је претходно описано. Део исечака ткива језика припремљен је за реакцију са периодичном киселином, претходно описаним поступком депарафинизације. Танки депарафинизирани исечци узорка су третирани 0,5% раствором периодичне киселине (0,5g периодичне киселине у 100 ml дестиловане воде) у трајању од 5 минута. Периодична киселина

хидролизује гликогене и друге полисахариде у ћелијским зидовима гљивица, чинећи их реактивним за даље бојење. Након тога, исечци су испрани и третирани Шифовим реагенсом (*BS-OT-X; Biognost, Zagreb, Croatia*) у трајању од 15 минута. Ткивни исечци постају светло розе боје током овог процеса. Након реакције са Шифовим реагенсом, исечци су испрани млаком водом током пет минута како би се уклонио вишак реагенса, при чему се боја ткивних исечака мења у тамно розе боју. Затим, ткиво је бојено Мајеровим раствором хематоксилина у трајању од једног минута, а потом, поново испрано обичном водом у трајању од пет минута. На крају, ткиво је дехидрирано и прекривено покровним стаклом, а обојени исечци су анализирани и фотографисани под светлосним микроскопом као што је претходно описано.

3.5.2. Хистолошка евалуација степена епителне колонизације *C. albicans*, оштећења епитела и запаљенског инфилтрата

У циљу квантификације и скорирања хистолошких промена у ткиву језика коришћен је скор модификован према Junqueira *et al.* (152). Микроскопирање је извршено слепом методом од стране два независна истраживача (М.П. И М.М.К.)

За квантификацију епителне колонизације *C. albicans* коришћен је скор од 0 до 4 који показује различиту заступљеност квасаца и хифа у ткиву језика пацова (**Табела 1.**)

Табела 1. Скор систем за квантификацију епителне колонизације *C. albicans*.

Скор	Опис скорa
0	Одсуство квасаца и хифа
1	Присутно 1 до 5 квасаца или хифа
2	Присутно 6 до 15 квасаца или хифа
3	Присутно 16 до 50 квасаца или хифа
4	Присутно више од 50 квасаца или хифа

Сваки исечак ткива је био оцењен према овој скали, а укупан скор за сваки исечак је добијен сабирањем бодова за број квасаца/хифа.

Процена степена оштећења епитела језика је извршена детектовањем следећих промена: хиперкератозе, присуства интраепителних микроапсцеса, егзоцитозе, губитак или одсуство филиформних папила, хиперплазије епитела, спонгиозе, као и присуства дезорганизованог базалног слоја (**Табела 2.**)

Табела 2. Скор систем за квантификацију оштећења епитела ткива језика

Скор	Опис промена
0	одсуство лезије
1	дискретна лезија
2	наглашена лезија

Просечна оцена је добијена сабирањем резултата добијених за сваку присутну промену на епителу из три непреклапајућа видна поља сваког узорка обојена хематоксилин еозином и увећана 40 пута (x400).

За испитивање инфламаторне инфилтрације у испитиваним ткивима коришћен је „инфламаторни инфилтрацијски скор“ (Табела 3.)

Табела 3. Скор систем за квантификацију интензитета инфламаторне инфилтрације

Скор	Интезитет инфламаторне инфилтрације
0	Одсуство инфламаторних ћелија
1	Дискретна инфламаторна инфилтрација
2	Интензивна инфламаторна инфилтрација

3.6. ИМУНОХИСТОХЕМИЈА

Имунохистохемијско бојење је коришћено како би се испитале фенотипске карактеристике инфламаторног инфилтрата и проценио степен њихове инфилтрације. Да би се анализирале фенотипске особине инфламаторног инфилтрата и оценио степен њихове инфилтрације, коришћена је имунохистохемијска техника бојења. За идентификацију ћелија које експримирају CD68, CD45, CD3 и HIS48, ткивни узорци језика су третирани имунохистохемијски применом одговарајућих специфичних антитела пацовског порекла (*Abcam, Cambridge, UK*).

Пре спровођења имунохистохемијског бојења, парафински блокови ткива језика исечени су на микротому у серијске пресеке дебљине 5µm. Након тога, извршена је депарафинизација ткивних узорака у ксилолу. Затим су узорци ткива језика рехидрирани према поступку наведеном у претходним одељцима.

Да би се открили епитопи, ткивни исечци су потопљени у раствор натријум-цитрата и изложени температурном третману у трајању од 21 минута. Након овог поступка, ткивни исечци су у PBS-у испрани три пута. Да би се спречила активност ендogene пероксидазе,

исечци ткива језика су третирани додавањем 100µl Hydrogen Peroxide Block-а и инкубирани су десет минута на собној температури. Након инкубације, препарати су два пута испрани у PBS-у. Да би се избегло неспецифично бојење, ткивни исечци су третирани додавањем 100µl Protein Block-а. Након нашошења, препарати су инкубирани десет минута, такође, на собној температури. Затим је уследило кратко испирање узорака ткива у PBS-у. Након испирања, на хистолошке препарате је додато 150µl примарног антитела (CD45 (*FNab01484; Wuhan Fine Biotech Co, Ltd*); CD68 (*MS 397-PO; Thermo Fisher Scientific*), CD3 (*ab16669; Abcam, Cambridge, UK*) HIS48 (*ab33760; Abcam*)) Раствор за примарна антитела је припремљен у PBS-у са додатком 1% BSA (енг. *bovine serum albumin*), у размери 1:200. Примарна антитела су инкубирана са препаратима у трајању од шездесет минута, у условима собне температуре, а затим су остављени у влажној комори. После инкубације од једног сата, ткивни исечци су три пута испрани у PBS раствору. Након тога, на ткивне исечке је додато 100µl Streptavidin Peroxidase и обављена је десетоминутна инкубација. Затим је уследило испирање три пута у PBS-у. После испирања, на сваки ткивни исечак насуто је 100µl DAB реагенса (радни раствор). Поменути раствор је припремљен мешањем 1000µl DAB Substrate и 0,02ml DAB Chromagen. Овај радни раствор користи се за визуелизацију реакције циљног антигена и примарног антитела, чинећи је видљивом. Дужина инкубације са DAB реагентом варирала је између 30 секунди и неколико минута, зависно о којем примарном антителу је реч. Брзина бојења препарата у браон нијансу контролисана је праћењем под микроскопом. Инкубација је прекинута када је примећено да су позитивне ћелије добиле браон боју. Препарати су три пута испрани дестилованом водом.

Ткивни исечци језика су, после испирања, потопани у Mayer-ов хематоксилин (*Sigma Aldrich*) у трајању од два минута. После тога, исечци су испирани у текућој и затим у дестилованој води. Уследила је дехидрација и просветљавање исечака у складу са раније описаном методом. На ткивне исечке је нанет водени медијум, након чега су покривени покровним стаклима. Тако припремљени препарати су остављени да стоје на собној температури ради сушења у периоду од 48 сати. Након 48 сати, препарати су били прегледани и снимани помоћу светлосног микроскопа (*DM4000B; Leica Microsystems*) опремљеног дигиталном камером (*DMC295; Leica Microsystems*). Током анализе бројене су браон пребојене ћелије Ова анализа је спроведена на 10 различитих, непреклапајућих видних поља под увећањем 40 пута (x400).

3.7. КВАНТИТАТИВНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ

За квантификацију експресије гена за цитокине од интереса (Табела 4) коришћена је метода квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енг. *quantitative real time - polymerase chain reaction, qRT-PCR*) из језика пацова.

До процеса хомогенизације, половина ткива језика пацова је чувана у епрувети од 1,5ml (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) са RNAlater Stabilization Solution (*Thermo Fisher Scientific*) у замрзивачу, на -80°C. Узорци ткива језика су хомогенизовани у хомогенизатору са перлама (*Precellys; Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France*) који применом перли различитих величина и TRIzol Reagent (*Thermo Fisher Scientific*) у количини од 1ml хомогенизује ткиво. На собној температури, у трајању од 5 минута инкубирано је

хомогенизовано ткиво. Након инкубације, додат је хлороформ (*Serva, Heidelberg, Germany*) у количини од 0,2ml. Узорак ткива је затим центрифугиран 15 минута на 15000rpm и температури од +4°C. Центрифугирањем су издвојене три фазе ткивног узорка:

- 1) Органска фаза (која садржи RNA),
- 2) Интер-фаза (која садржи протеине) и
- 3) Водена фаза (садржи остале компоненте)

Органска фаза је пребачена у епрувете од 1,5ml (Eppendorf AG) са изопропанолом (*Serva*) од 0,5ml и остављене 10 минута на собној температури, након чега су центрифугиране на 12000rpm у трајању од 10 минута, на температури од +4°C. Одливен је супернатант, а преосталој RNA је додат 70% етанол алкохол (*Hedera-Vita, Belgrade, Serbia*) у количини од 1ml. Благо су вортесовани узорци, након чега је уследило центрифугирање на 7500rpm у трајању од 5 минута, на температури од +4°C. Супернатант је одливен, а епрувете су инкубирани 10 минута у условима собне температуре. Талог из епрувета је ресуспендован са 20µl воде која не поседује нуклеазе (*Sigma Aldrich*). Затим је уследила инкубација узорака у воденом купатилу 15 минута, на температури од +55-60°C. Растворена RNA је чувана на -80°C.

Мерење концентрације RNA и оцена чистоће је извршена помоћу Multiskan SkyHigh UV/VIS спектрофотометра (*Thermo Fisher Scientific*). Користећи RevertAid and First Strand cDNA Synthesis китове (*Thermo Fisher Scientific*), комплементарна DNA (cDNA) је била синтетисана из 1,5µg укупне RNA уз примену oligo(dT) прајмера, у складу са упутствима произвођача. Процес је укључивао инкубацију мешавине RNA и oligo(dT) прајмера на 42°C током 60 минута, пратећи деактивацију ензима на 70°C за 5 минута користећи MultiGene OptiMax Thermal Cycler апарат (*Labnet International, Edison, USA*).

3.7.1 Израчунавање степена експресије гена у односу на друге гене

Експресија циљаног гена мерена је кроз релативну експресију mRNA у поређењу са housekeeping геном у сваком узорку.

За qRT-PCR анализу коришћено је 10µl SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) са додатком одговарајућих прајмера који су наведени у Табели 4. у концентрацији од 500nM (*Integrated DNA Technologies, Coralville, USA*), 100ng cDNA и воде која не садржи нуклеазу (*Sigma-Aldrich*) до укупне запремине од 20µl, пратећи препоруке произвођача. Нормализација је обављена коришћењем β -actin као housekeeping гена, а експерименти су изведени на Gentier 96E qRT-PCR уређају (*Xi'an Tianlong, Xi'an City, China*). Анализа qRT-PCR је започела са почетном денатурацијом на температури од 95°C током 30 секунди, након чега је извршено 40 циклуса са два корака: денатурација на температури од 95°C током 15 секунди и анилинг/елонгација на температури од 60°C током 30 секунди. По завршетку циклуса, обављена је анализа криве топљења, а квалитет реакција проверен је коришћењем NTC контрола. Релативни нивои генске експресије одређени су користећи методу 2- $\Delta\Delta C_t$.

Табела 4. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу

Назив прајмера	Секвенца (5'-3')
Rat IL-1 β Primer Pair	F: TGATGTTCCCATTAGACAGC R: GAGGTGCTGATGTACCAGTT
Rat IFN- γ Primer Pair	F: GCTAGATTCTGGTGACAGCTGGTG R: CACCAGCTGTCACCAGAATCTAGC
Rat TNF- α Primer Pair	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC
Rat IL-6 Primer Pair	F: CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT R: GACAGCATTGGAAGTTGGGG
Rat IL-4 Primer Pair	F: TGCACCGAGATGTTTGTACC R: GGATGCTTTTTAGGCTTTCC
Rat IL-10 Primer Pair	F: CAGTCAGCCAGACCCACAT R: GCTCCACTGCCTTGCTTT
Rat IL-17 Primer Pair	F: CTACCTCAACCGTTCCACT R: TTCTCAGGCTCCCTCTTC
Rat TGF- β 1 Primer Pair	F: TTTAGGAAGGACCTGGGTTG R: CAGACAGAAGTTGGCATGGT
Rat β -actin Primer Pair	F: ACGGTCAGGTCATCACTATCG R: GGCATAGAGGTCTTTACGGATG

3.8. ЕНЗИМСКИ ПОВЕЗАНИ ИМУНОСОРБЕНТНИ ТЕСТ

Приликом жртвовања, прикупљени узорци крви су стављени у епрувету са коагулантним средством, а затим центрифугирани 10 минута на 30000rpm. Из центрифугираних епрувета, супернатант је помоћу пипете одливен у епендорфице које су затим чуване у замрзивачу за даље анализе.

Серумске концентрације TNF- α , IFN- γ , IL-6, и IL-10 су мерене коришћењем комерцијалних китова за ензимски повезани имуносорбентни тест (енг. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) специфично намењених за детекцију цитокина пацова (*RnD Systems, Minneapolis, USA*). Дан уочи испитивања, у свако бунарче микротитарске плоче додавано је 100 μ l Capture антитела. Плоче су потом покривене и инкубиране на собној температури током 18-19 сати. По завршетку инкубације са Capture антителом, бунарчићи плоче су три пута испрани са 250 μ l Wash Buffer раствора. После процедуре испирања, Block Buffer је додат у специфичне бунарчиће микротитарске плоче, означене за анализу

концентрација појединачног цитокина у серуму. За све друге бунарчиће на плочи употребљен је Reagent Diluent, додајући по 150µl у сваки појединачни. Након тога, плоче су затворене са адхезивном траком и држане на собној температури на у трајању од једног сата. После завршетка инкубације, плоче су испране три пута користећи Wash Buffer. У првим бунарчићима сваке колоне за одређени цитокин додавано је 200µl релевантног стандарда. У остатак бунарчића те исте колоне додавано је 100µl Reagent Diluent-а. За сваки цитокин, концентрације стандарда у првим бунарчићима су биле следеће: IL-4 и TNF-α имали су концентрацију од 1000 pg/ml; IL-10 и IFN-γ имали су концентрацију од 2000 pg/ml. За креирање серије растављених концентрација стандарда, узимано је 100µl из првог бунарчета и додавано у следеће бунарче у истој колони. Следећи корак је био растварање стандарда. За то, из другог бунарчића прве колоне је узимано 100µl и пребацивано у трећи, и тако редом до седмог бунарчета, тако да се концентрација стандарда смањивала. Осмо бунарче је крај његове серије растварања и садржало је само 100µl Reagent Diluent-а.

У осталим бунарчићима, додавани су узорци серума према задатом распореду. У свако бунарче је наливено 20µl узорка серума и 80µl дестиловане воде. Микротитар плоче које су наливене садржајем покриване су заштитном фолијом и остављене да стоје два сата на собној температури. По истеку инкубационог времена, течност из плоча је одливена, а затим је свако бунарче темељно испрано три пута коришћењем 250µl Wash Buffer-а. После процеса испирања, у сваки бунарч додато је 100µl Detection антитела. Плоче су поново покривене фолијом и остављене на столу на собној температури још два сата. После инкубације од два сата, течност у плочи је одливена, а затим је свако од бунарчића три пута испрано коришћењем 250µl Wash Buffer-а. Следећи корак је био додавање 100µl раствора Streptavidin-HRP у свако бунарче. Затим су плоче покривене заштитном фолијом и остављене да се инкубирају на столу у мраку двадесет минута. После инкубације од двадесет минута, течност из плоче је одливена, а затим је сваки бунарч опран три пута коришћењем 250µl Wash Buffer-а. У наредном кораку, у сваки бунарч је додато 100µl раствора супстрата. Уследила је инкубација од 20 минута у мрачној просторији, собне температуре. Интензитет плаве боје у бунарчићима одређивао је потребно време инкубације. Када је инкубација завршена, у сваки бунарч је додато стоп раствор у количини од 50µl, а затим је цела плоча мешана на мешалици на 100rpm у току пет минута. Плоча је анализирана на Microplate reader уређају (Biochrom Anthos Zenyth 340r; Biochrom, Cambridge, UK) користећи ADAP Plus софтвер (Biochrom), са поставкама да чита на величини апсорпције од 450nm.

3.9. ОДРЕЂИВАЊЕ НИВОА АНТИОКСИДАТИВНИХ И ПРООКСИДАТИВНИХ ПАРАМЕТАРА ИЗ СИСТЕМСКЕ ЦИРКУЛАЦИЈЕ БИОХЕМИЈСКИМ ПУТЕМ

Као што смо већ напоменули, одмах након жртвовања животиња, сакупљен је узорак крви и припремљен у облику плазме и лизата у циљу одређивања концентрације антиоксидативних и прооксидативних маркера. Нивои индекса липидне пероксидације (енг. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), водоник пероксида (H₂O₂), супероксид анион радикала (O₂⁻), и нитрита (NO₂⁻) су мерени у плазми, док су нивои супероксид дисмутазе (SOD), редукованог глутатиона (GSH) као и каталазе (CAT) изведени из лизата еритроцита.

Одређивање концентрације прооксидативних и антиоксидативних параметара извршена је помоћу спектрофотометра (*UV 1800; Shimadzu, Kyoto, Japan*).

3.9.1. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације је израчунат кроз индиректно мерење производа реакције између липидне пероксидације и тиобарбитурне киселине, тј. концентрације TBARS.

У нове епендорфице је уз помоћу пипете стављено 0,4ml плазме, као и 0,2ml 28% трихлорацетатне киселине (енг. *trichloroacetic acid*, TCA). Након тога, епендорфице су вортексоване, а затим остављене у замрзивачу 15 минута. Након истеклог времена, уследило је центрифугирање на 6000rpm у трајању од 15 минута. За даљи ток анализа, коришћен је супернатант у количини од 0,4ml, као и 0,1ml 1% тиобарбитуратне киселине у натријум хидроксиду (TBA in NaOH) при чему су коришћене стаклене епрувете. У воденом купатилу, сједињена смеша у стакленим епруветама, затворена је кликерима и кувана 15 минута на температури кључања (100 °C). Потом су инкубиране у условима собне температуре, у трајању од 10 минута. Апсорбанца је измерена спектрофотометријски на таласној дужини светлости $\lambda=530\text{nm}$, коришћењем дестиловане воде као контролне пробе. Резултати су изражени у вредностима pmol TBARS/ml плазме.

3.9.2. Водоник пероксид (H_2O_2)

У пластичној епрувети, 200 μl узорка плазме смештено је помоћу пипете и додато је 800 μl фенол црвеног реагенса, заједно са 10 μl пероксидазе у односу 1:20. Овако припремљен узорак је инкубиран на собној температури у трајању од 10 минута.

Концентрације H_2O_2 у узорцима одређене су коришћењем стандардне криве изведене из стандардног раствора H_2O_2 . Три епрувете су попуњене са 5, 10 и 20 μl H_2O_2 стандарда, 200 μl дестиловане воде, 800 μl фенол црвеног и 10 μl ренове пероксидазе. После инкубацијског периода, финалне концентрације су утврђене. Фактор апсорбанце је израчунат на основу односа између финалне апсорбанце узорка и стандардне криве. Користећи тај фактор и финалну апсорбанцу узорка, одређене су коначне концентрације и представљене су као pmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$ плазме.

3.9.3. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

У пластичној епрувети сједињено је 50 μl узорка плазме и 950 μl есејне смеше, а затим је апсорбанца три пута мерена на сваких минут времена. Есејна смеша представља 0,1mM нитротетразолијум плавило, 50mM TRIS-HCl пуфера и 0,1mM етилендиаминтетраацетат. Апсорбанца је утврђена на таласној дужини од 550nm троструким мерењем у интервалима од 60 секунди. Као контролни узорак употребљена је дестилована вода, а резултати су изражени као pmol O_2^-/ml крвне плазме.

3.9.4. Нитрити (NO_2^-)

Мерење количине нитрита у узорку служи као индиректна техника за процену количине испуштеног азот монооксида.

У епендорфицама су сједињени 0,1ml перхлорне киселине, 0,4ml 20mM етилендиаминтетраацетатне киселине (ЕДТА), а потом 0,2ml плазме. Епендорфице су вортексоване, након чега су стављене у замрзивач у временском трајању од 10 до 15 минута. Након замрзавања, уследило је центрифугирање (6000rpm) у временском трајању од 15 минута. Одливен је супернатант, а за даљу анализу, коришћен је талог у који је додато 220 μ l K_2CO_3 . Из те смеше, пипетирано је 0,2ml екстракта плазме и стављено у пластичну епрувету. У исту епрувету додато је 125 μ l 1% сулфонилне киселине, 125 μ l 0,1% Nitrite Elimination and Detection Agent и 125 μ l пуфера специфичног за NO. Затим је читава смеша, инкубирана у условима собне температуре, у временском трајању од 15 минута. Апсорбанца је измерена спектрофотометријски при таласној дужини од 550nm. Дестилована вода коришћена је за слепу пробу. Резултати су представљени као pmol NO_2 /ml крвне плазме.

3.9.5. Супероксид дисмутаза (SOD)

100 μ l лизата еритроцита и 1000 μ l карбонатног пуфера сједињено је у пластичној епрувети, након чега су вортексовани. У вортексовану смешу додато је 100 μ l адреналина и тиме је смеша била спремна за мерење концентрације супероксид дисмутазе. Апсорбанца је измерена при таласној дужини од 470nm, а мерење је извршено у дупликату. Слепу пробу је представљала иста смеша, само без узорка лизата еритроцита. Резултати су приказани у форми $\text{U/g Hb} \times 10^3$.

3.9.6. Редуковани глутатион (GSH)

Први део анализе је обухватао процес сједињавања 50 μ l лизата еритроцита, 200 μ l 0,1% ЕДТА, као и 385 μ l преципитационог пуфера у епендорфицама. Епендорфице су одложене у замрзивач, у временском трајању од 15 минута. Уследило је центрифугирање (4000rpm), у временском трајању од 10 минута. Тиме је добијен екстракт. Други део анализе је обухватао 300 μ l лизата, 750 μ l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 100 μ l DTNB. Све је то инкубирано у условима собне температуре, у временском трајању од 10 минута. Апсорбанца је мерена при таласној дужини од 412nm. Слепу пробу је представљала смеша 750 μ l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 100 μ l DTNB и дестиловане воде. су представљали слепу пробу. Рачунање концентрације GSH-а у узорцима је вршена помоћу калибрационе криве и четири стандарда за које се знају концентрације глутатиона. Резултати су приказани у форми pmol GSH/ml еритроцита.

3.9.7. Каталаза

Први део анализе је обухватао сједињавање 100 μ l лизата еритроцита, 10ml дестиловане воде и 100 μ l 70% етанола у стаклене епрувете. Из добијене смеше, у пластичне епрувете је пребачено 100ml узорка, додато 50 μ l Buffer for CAT и 1ml 10 mM H_2O_2 , након чега је уследило мерење концентрације каталазе у узорку. Слепу пробу је чинила

дестилована вода. Узорци су 6 пута мерени узастопно при таласној дужини од 230nm. Резултати су приказани у форми U/g Hb \times 10³.

3.10. СТАТИСТИЧКО ОБРАЂИВАЊЕ ПОДАТАКА

Подаци су статистички обрађени користећи софтвер IBM SPSS Statistics верзије 23.0 (IBM Corp., Armonk, USA). Прво се извршила провера нормалности расподеле добијених вредности. Ако је број анализираних вредности био већи од 50 коришћен је Kolmogorov-Smirnov тест, а уколико је био мањи од 50 за проверу коришћен је Shapiro-Wilk тест. У зависности од нормалности расподеле коришћени су Kruskal-Wallis H и Mann-Whitney U тестови (непараметарски) или One-Way ANOVA и Independent Samples T-тест (параметарски). Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (енг. *Standard Deviation, SD*). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматрано је када је $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

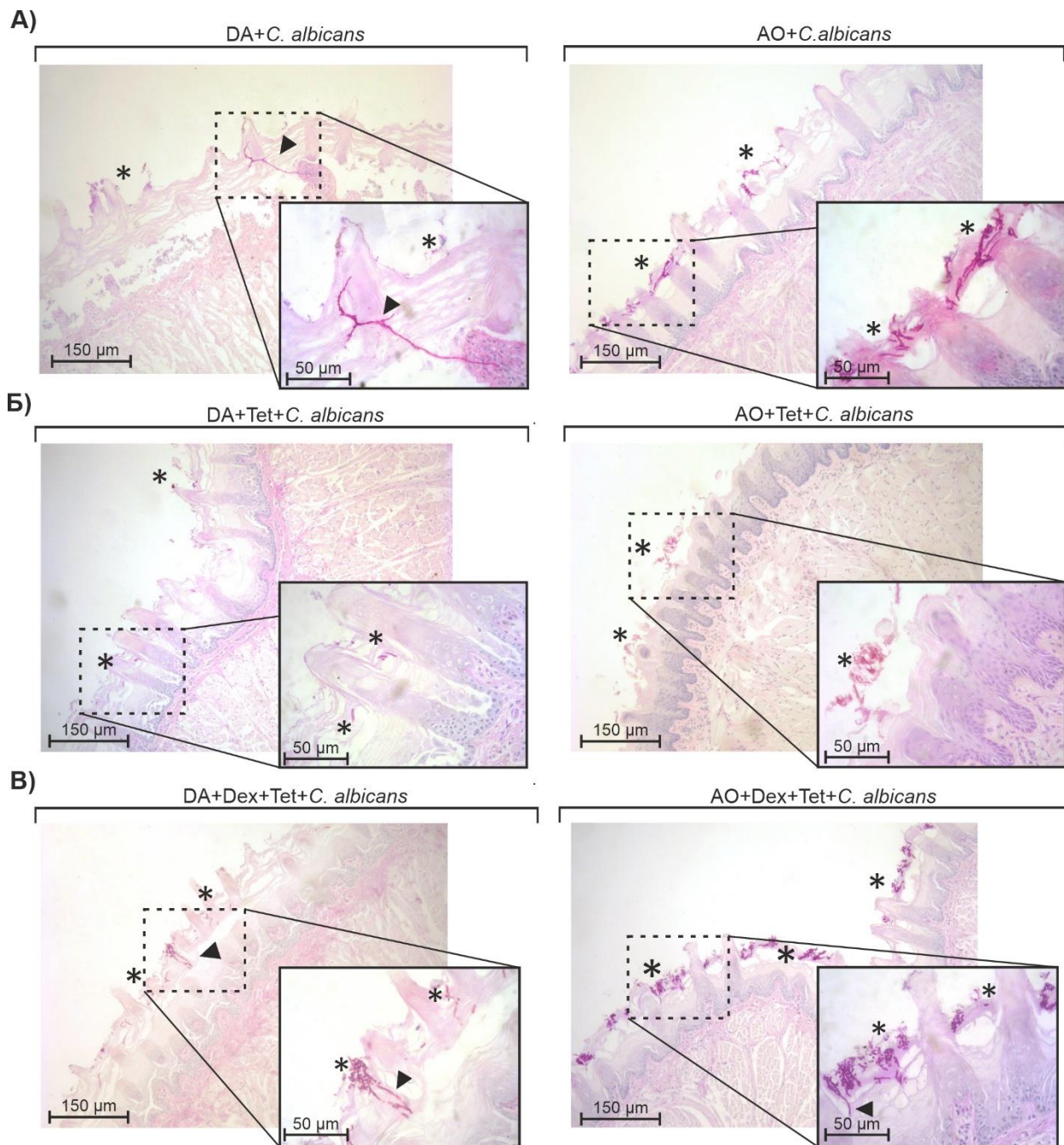


4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. РАЗЛИКА У ЕПИТЕЛНОЈ КОЛОНИЗАЦИЈИ *C. ALBICANS* ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА

PAS хистохемијско бојење представља поуздан метод за потврђивање оралне кандидијазе и визуелну диференцијацију морфолошких облика *C. albicans* у епителу језика. Овом дијагностичком процедуром се детектује глукански материјал који је присутан на ћелијском зиду *C. albicans* који се прецизно и специфично боји помоћу PAS технике, што омогућава јасну диференцијацију ових глуканских структура од преосталог ткива језика, због чега је ова метода врло ефикасна и специфична.

Анализом парафинских ткивних исечака обојених методом PAS хистохемијског бојења уочено је да су језици оба соја пацова (DA и АО), без обзира на начин индукције оралне кандидијазе, колонизовани *C. albicans*. У свим експерименталним групама детектовано је присуство квасца, као и хифа, најчешће локализованих у кератинизованом слоју дорзалне стране језика (**Слика 1**).



Слика 1. Епителна колонизација *C. albicans* у ткиву језика DA и AO пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених PAS методом (увеличање 10x, размера=150 µm (унутрашњи панели) и увеличање 40x, размера=50µm (спољашњи панели). Епителна колонизација је означена као звездаца (квасац) или врх стрелице (хифе).

Квантификационом анализом епителне колонизације *C. albicans* детектована је статистички значајна разлика у средњим вредностима присуства квасаца/хифа између DA и AO соја са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C.*

albicans. Статистичком анализом показане су значајно ниже ($p < 0,05$) средње вредности скова епителне колонизације у DA+C. *albicans* у поређењу са АО+C. *albicans* групом (Табела 5, График 1).

Табела 5. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*.

Средња вредност скова епителне колонизације	Групе		<i>p</i>
	DA+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
	1,05±0,74	1,75±0,86	0,032*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

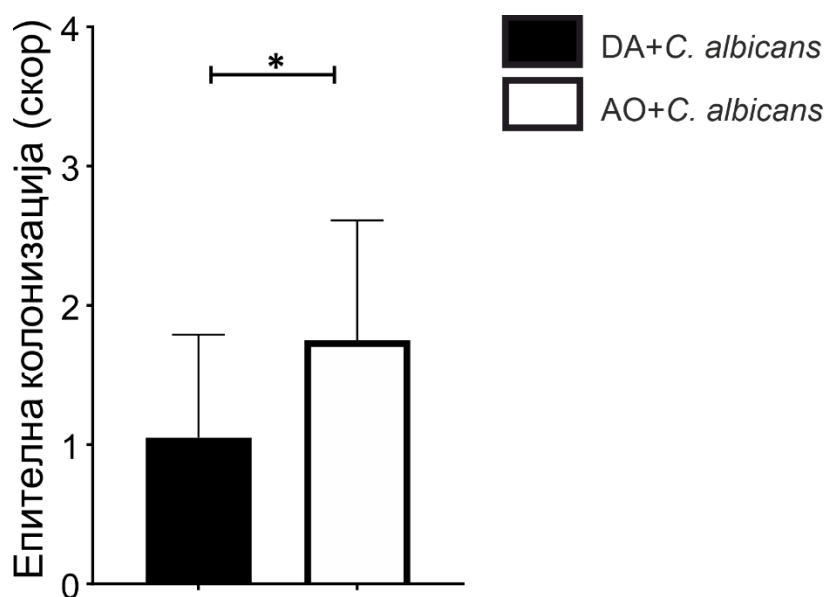


График 1. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова.

Постојала је статистички значајна разлика између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

Између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans* (DA+Tet+C. *albicans* насупрот АО+Tet+C. *albicans*) није уочена статистички значајна разлика ($p > 0,05$; Табела 6, График 2).

Табела 6. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

	Групе		<i>p</i>
	DA+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
Средња вредност скора епителне колонизације	1,03±0,10	1,22±0,41	0,072

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD).

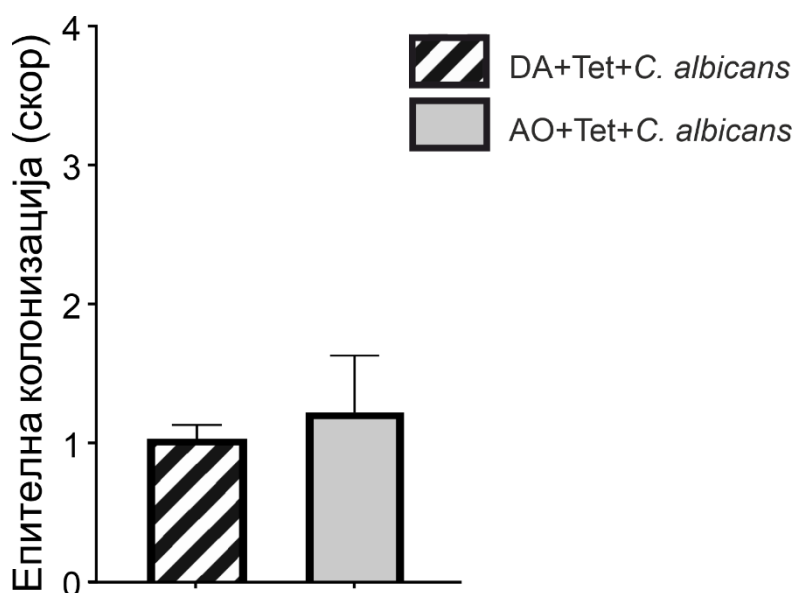


График 2. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD).

Такође, између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans* (DA+Dex+Tet+*C. albicans* насупрот АО+Dex+Tet+*C. albicans*) није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$; Табела 7, График 3).

Табела 7. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

	Групе		<i>p</i>
	DA+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
Средња вредност скора епителне колонизације	2,01±1,28	2,17±1,25	0,725

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

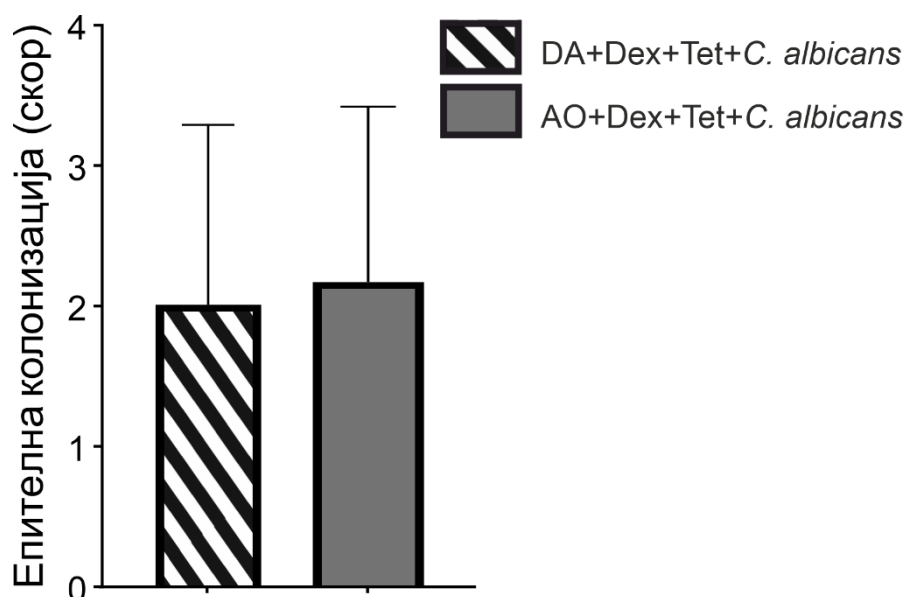
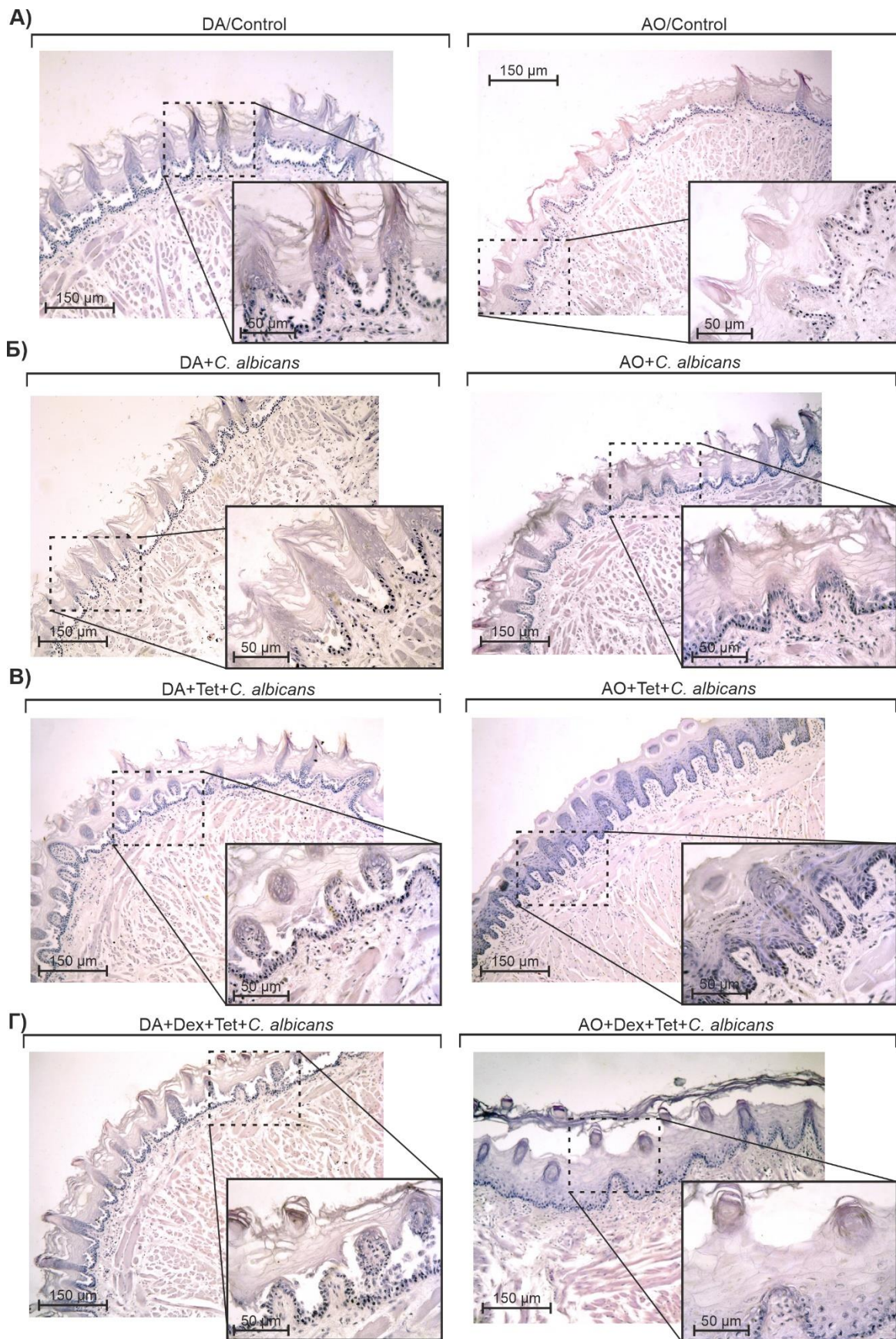


График 3. Квантификациона анализа епителне колонизације *C. albicans* између DA и АО пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD).

4.2. РАЗЛИКЕ У СТЕПЕНУ ОШТЕЋЕЊА ЕПИТЕЛА ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА

Након што смо детектовали присуство квасаца и хифа (Слика 1.) у наставку истраживања испитивали смо степен оштећења епитела. Хистолошка анализа парафинских ткивних исечака ткива језика, обојених хематоксилин еозиним, контролних група DA и АО пацова показала је очувану хистолошку грађу. На дорзалној страни језика уочавају се бројне кончасте и печуркасте папиле прекривене делимично орожалим плочасто слојевитим епителом. Испод епитела је смештена *lamina propria* коју чини густо везивно ткиво са бројним еластичним влакнима и крвним судовима (Слика 2А). Индукцијом оралне кандидијазе, било којом експерименталном методом инокулације *C. albicans* у оба соја

пацова (DA+C. *albicans*, AO+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans*, AO+Tet+C. *albicans*, DA+Dex+Tet+C. *albicans* и AO+Dex+Tet+C. *albicans* групе) детектовани су патохистолошки знаци оштећења епитела. Детаљном анализом уочени су различити типови епителних лезија од којих су највише заступљене епителна хиперплазија, дезорганизација базалног слоја, губитак филиформних папила и хиперпаракератоза, као што је приказано на **Слици 2Б-Г**.



Слика 2. Оштећење епитела ткива језика DA и АО пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених хематоксилин еозином ((увеличање 10x, размера=150µm (унутрашњи панели) и увеличање 40x, размера=50µm (спољашњи панели)).

Када су епителне лезије квантификоване и упоређене између сојева, уочене су статистички значајно ниже вредности у DA+C. *albicans* у поређењу са АО+C. *albicans* групом ($p < 0,05$; Табела 8, График 4).

Табела 8. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе оралном инокулацијом *C. albicans*.

Средња вредност скора оштећења епитела	Групе		<i>p</i>
	DA+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
	1,53±0,52	2,33±0,50	0,002*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

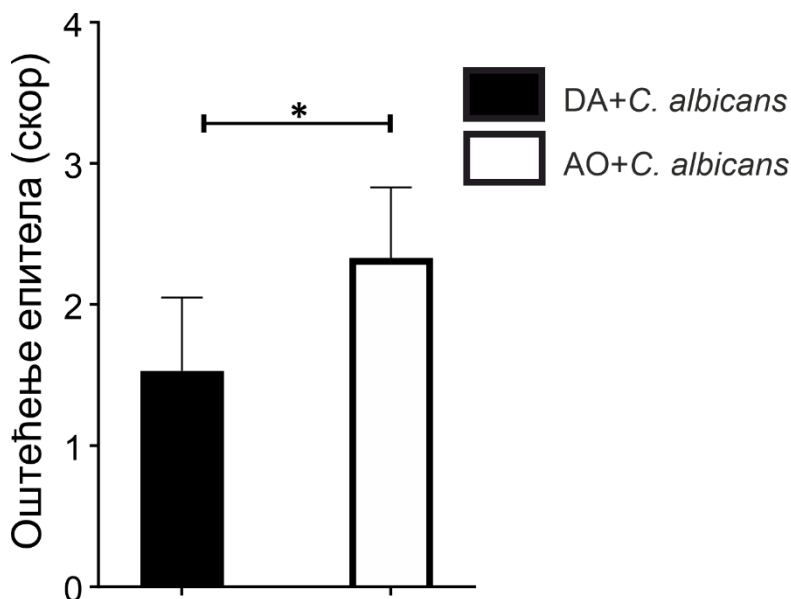


График 4. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

Статистички значајна разлика уочена је и између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, где

је група DA+Tet+C. *albicans* показала ниже вредности оштећења епитела у односу на АО+Tet+C. *albicans* групу ($p<0,05$; Табела 9, График 5).

Табела 9. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

Средња вредност скора оштећења епитела	Групе		<i>p</i>
	DA+Tet+C. <i>albicans</i> (mean ± SD)	АО+Tet+C. <i>albicans</i> (mean ± SD)	
	1,02±0,10	1,42±0,51	0,009*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

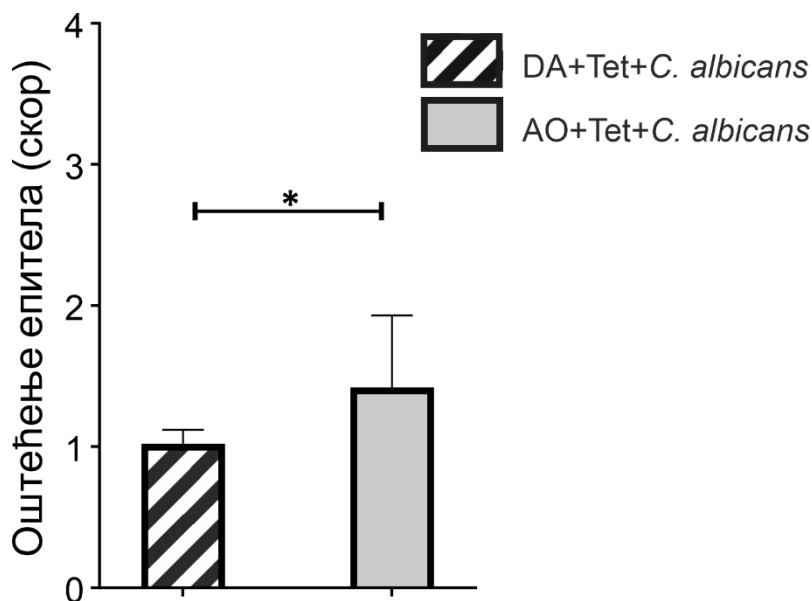


График 5. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p<0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

Статистички значајно нижа вредност показана је и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* у односу на АО+Dex+Tet+ *C. albicans* групу ($p<0,05$; Табела 10, График 6).

Табела 10. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

Средња вредност скора оштећења епитела	Групе		<i>p</i>
	DA+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
	1,02±0,10	1,42±0,51	0,009*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

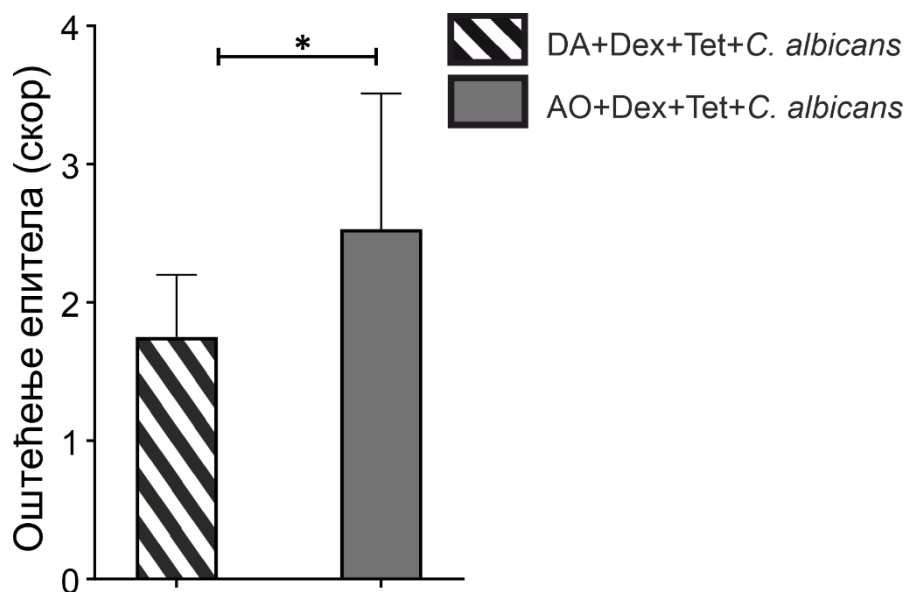


График 6. Квантификациона анализа оштећења епитела између DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

4.3. РАЗЛИКЕ У ВЕЛИЧИНИ ИНФЛАМАТОРНОГ ИНФИЛТРАТА ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА

Хистолошка анализа исечака ткива језика обојених ХЕ методом код инфицираних животиња оба соја (DA и АО) открила је запаљење епитела коју карактерише претежно мононуклеарни инфламаторни инфилтрат у оштећеним подручјима, заједно са делимично присутном конгестијом крвних судова у ламини проприји (Слика 2). Квантификацијом интензитета инфламаторне инфилтрације забележене су статистички значајно ниже

вредности у DA+C. *albicans* групи у поређењу са DA+C. *albicans* групом ($p < 0,05$; Табела 11, График 6).

Табела 11. Квантификациона анализа интензитета инфламаторне инфилтрације ткива језика између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*.

	Групе		<i>p</i>
	DA+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	AO+C. <i>albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
Средња вредност скорa интензитета инфламаторне инфилтрације	0,75±0,87	1,75±0,86	0,010*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

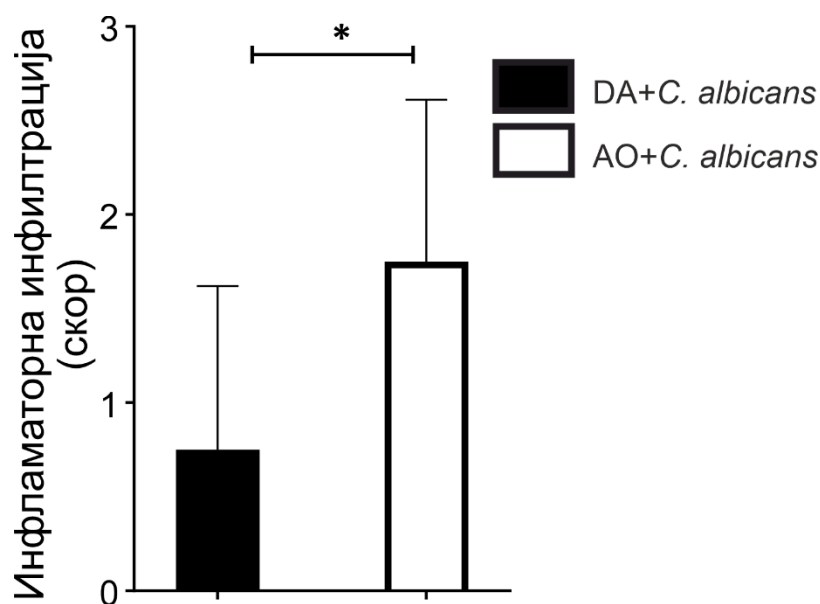


График 7. Квантификациона анализа инфламаторне инфилтрације ткива језика између DA и AO пацова. Постојала је статистички значајна разлика између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

Међутим, статистичка анализа није показала значајне разлике ($p > 0,05$) међу групама у којима је орална кандидијаза изазвана применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans* (DA+Tet+C. *albicans* и AO+Tet+C. *albicans* групе) (Табела 12, График 8).

Табела 12. Квантификациона анализа интензитета инфламаторне инфилтрације ткива језика између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

Средња вредност скова интензитета инфламаторне инфилтрације	Групе		<i>p</i>
	DA+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
	1,41±1,06	1,83±0,41	0,188

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD).

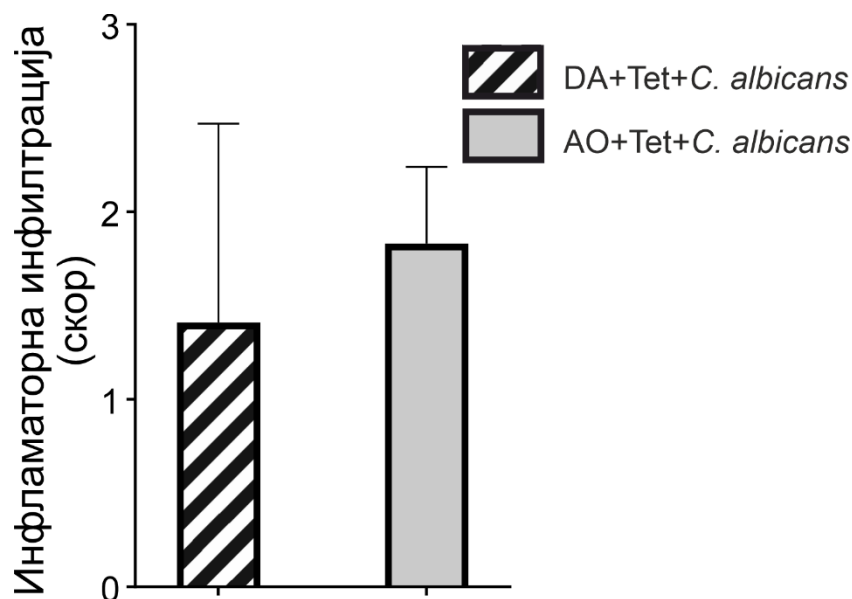


График 8. Квантификациона анализа инфламаторне инфилтрације ткива језика између DA и АО пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD).

Ипак, статистички значајно нижа вредност показана је у DA+Dex+Tet+*C. albicans* групи у односу на АО+Dex+Tet+ *C. albicans* групу ($p < 0,05$; Табела 13, График 9).

Табела 13. Квантификациона анализа интензитета инфламаторне инфилтрације ткива језика између DA и АО пацова са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*.

	Групе		<i>p</i>
	DA+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	АО+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i> (<i>mean</i> ± SD)	
Средња вредност скова интензитета инфламаторне инфилтрације	1,58±0,67	2,17±0,38	0,015*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

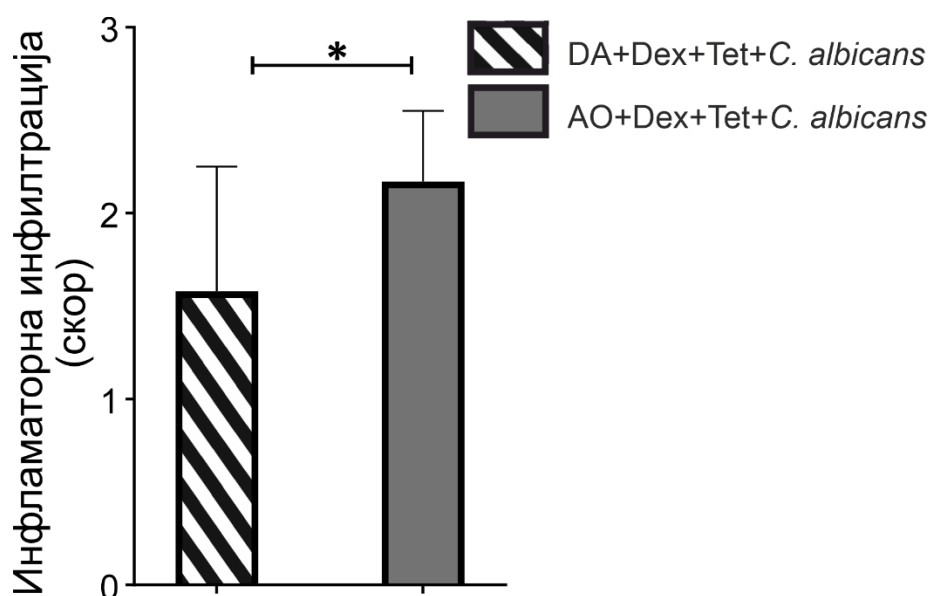


График 9. Квантификациона анализа инфламаторне инфилтрације ткива језика између DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (*mean* ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

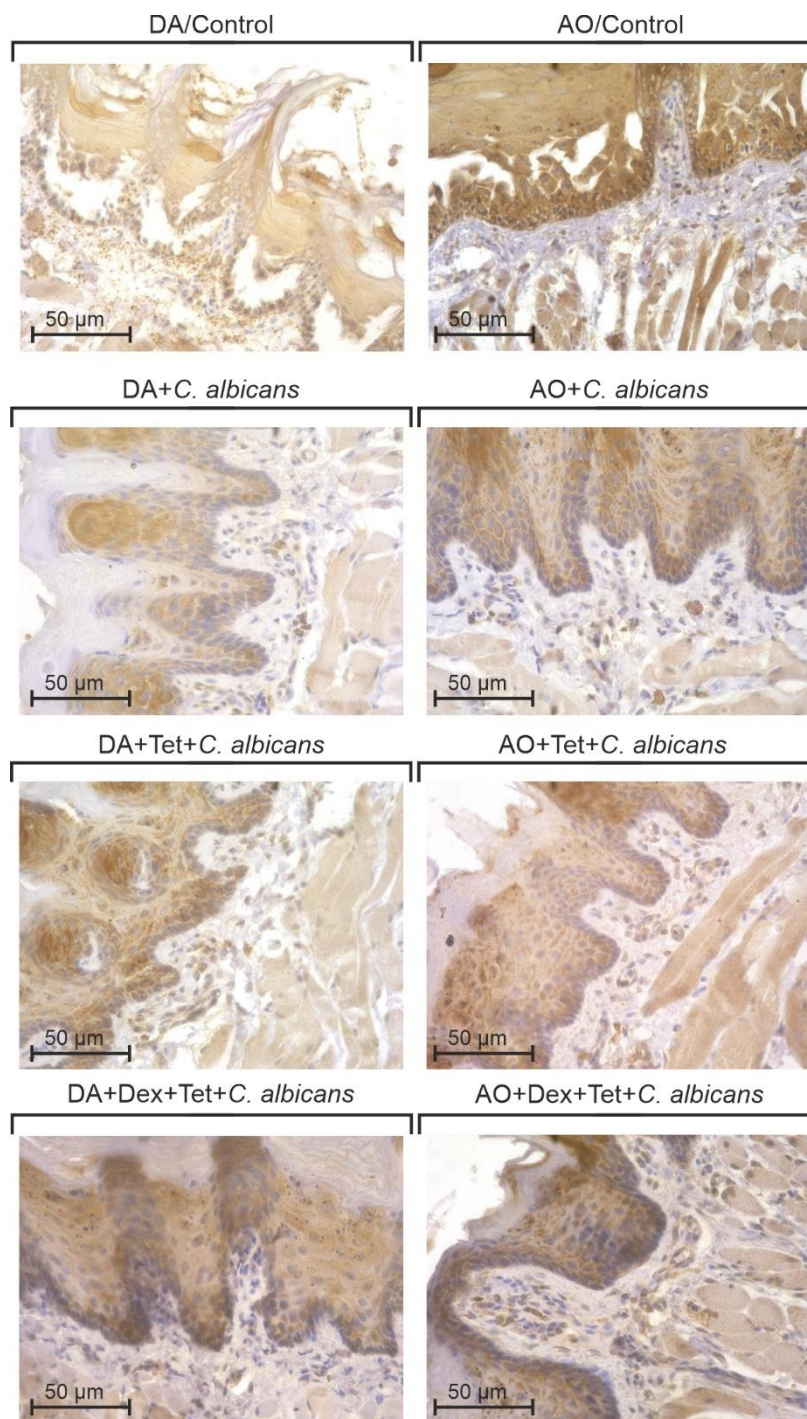
4.4. ФЕНОТИПСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА У ТКИВУ ЈЕЗИКА DA И АО ПАЦОВА

У циљу додатног испитивања састава инфламаторног инфилтрата (мононуклеарне и полиморфонуклеарне ћелије) спровели смо имунохистохемијску анализу попречних пресека ткива језика DA и АО пацова. Имунохистохемијским бојењем извршена је детекција

ћелија позитивних на маркере који су карактеристични за леукоците (CD45 и CD3), макрофаге (CD68) и гранулоците (HIS48) (Слике 3-6).

4.4.1. Имунохистохемијска анализа броја CD45 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика

Имунохистохемијски је потврђено присуство CD45 позитивних ћелија у ламини проприји ткивних исечака језика у оба соја пацова без обзира на експериментални модел индукције оралне кандидијазе (Слика 3).



Слика 3. Имунохистохемијско бојење CD45 маркера у ткиву језика DA и AO пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених имунохистохемијском методом (увеличање 40x, размера=50µm)

Анализа броја ћелија позитивних на CD45 маркер није показала статистички значајну разлику ($p>0,05$) између DA+C. albicans и AO+C. albicans групе, као ни између контролних група животиња (DA/Control и AO/Control). Међутим, статистички значајно мањи ($p<0,05$)

број CD45 позитивних ћелија забележен је у DA+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Tet+C. *albicans* групом, као и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Dex+Tet+C. *albicans* групом (Табела 14, График 10).

Табела 14. Средња вредност броја CD45 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика DA и AO пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	CD45+ (mean ± SD)		p
	Dark Agouti	Albino Oxford	
+C. <i>albicans</i>	31,10±15,15	31,05±3,92	0,990
+Tet+C. <i>albicans</i>	35,04±12,46	51,72±10,92	0,005*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	23,06±7,97	55,87±26,23	0,001*
Control	13,34±0,84	14,05±1,04	0,111

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

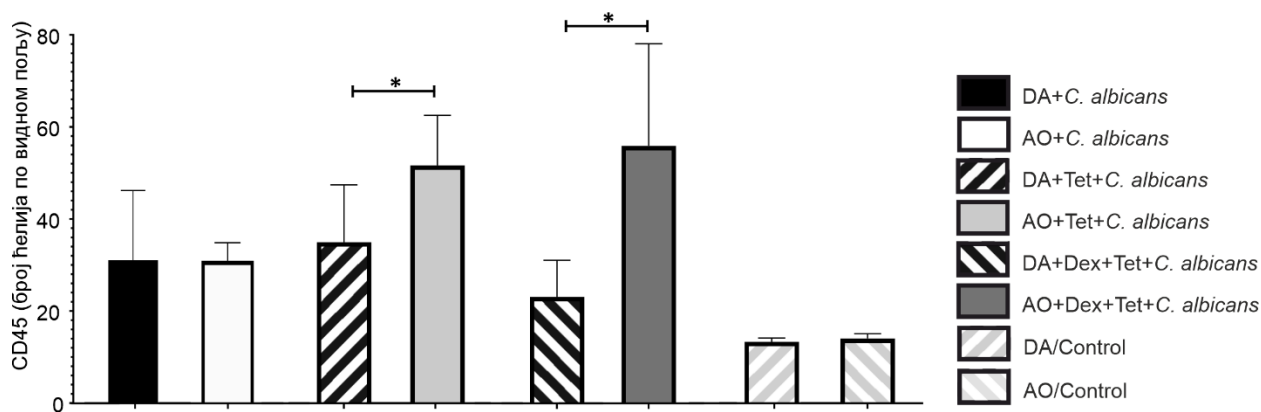
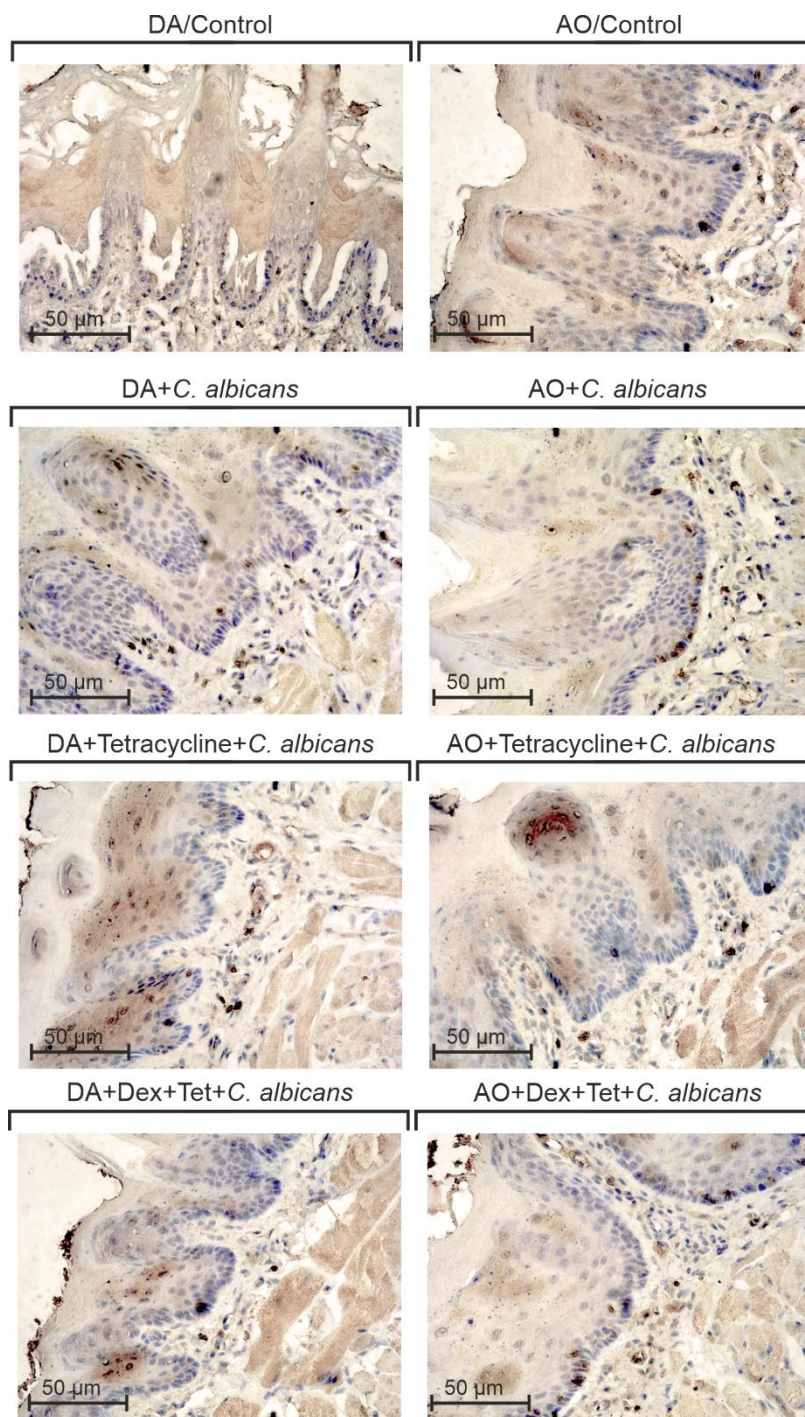


График 10. Средња вредност броја CD45 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика између DA и AO пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

4.4.2. Имунохистохемијска анализа броја CD3 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика

У наставку истраживања испитивали смо присуство CD3 позитивних лимфоцита у инфламаторним инфилтратима ткива језика. Детаљном анализом ламине проприје ткивних исечака језика детектоване су ћелије позитивне на CD3 маркер у оба соја пацова без обзира на експериментални метод индукције оралне кандидијазе (Слика 4).



Слика 4. Имунохистохемијско бојење CD3 маркера у ткиву језика DA и АО пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених имунохистохемијском методом (увеличање 40x, размера=50μm).

Анализа броја CD3 позитивних лимфоцита није показала статистички значајну разлику ($p>0,05$) између DA+*C. albicans* и AO+*C. albicans* групе. Међутим, статистички значајно мањи ($p<0,05$) број ћелија позитивних на CD3 маркер детектован је у групи

DA+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Tet+C. *albicans* групом, као и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Dex+Tet+C. *albicans* групом. Супротно, DA/Control група је показала статистички значајно већи број CD3 позитивних лимфоцита ($p<0,05$) у односу на AO/Control групу (Табела 15, График 11).

Табела 15. Средња вредност броја CD3 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика DA и AO пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	CD3+ (mean ± SD)		p
	Dark Agouti	Albino Oxford	
+C. <i>albicans</i>	15,68±13,61	15,57±4,01	0,981
+Tet+C. <i>albicans</i>	19,29±12,43	39,92±11,34	0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	10,88±6,96	47,29±26,51	0,001*
Control	6,34±0,81	5,14±1,23	0,021*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

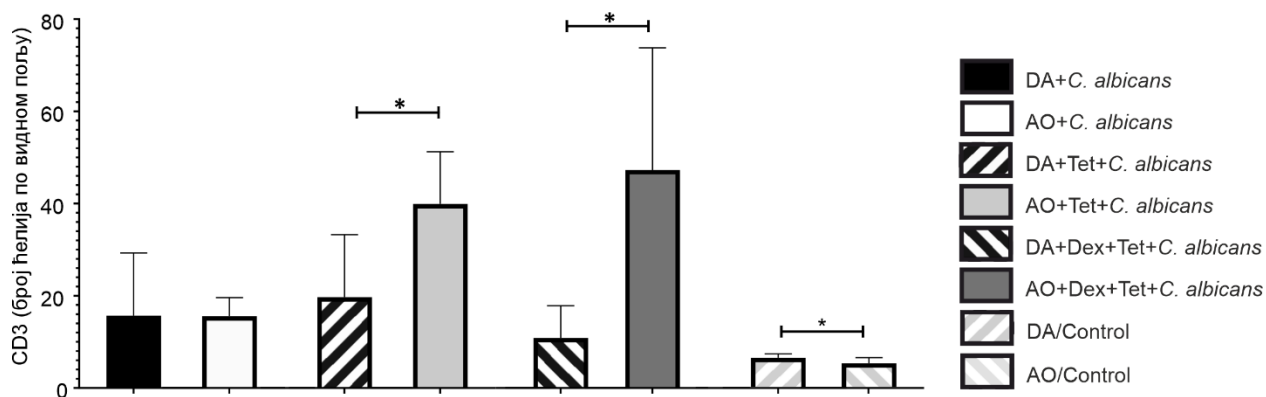
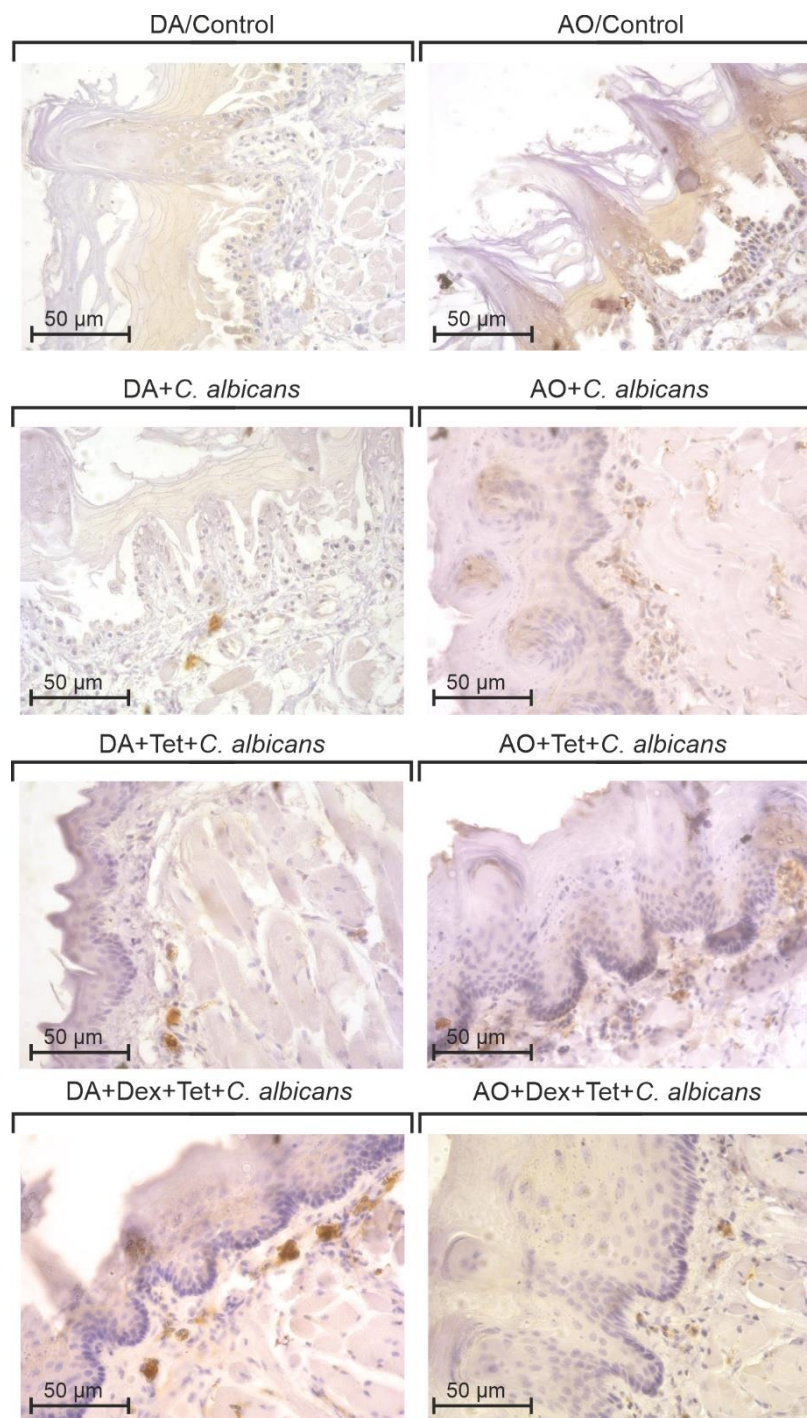


График 11. Средња вредност броја CD3 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика између DA и AO пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p<0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Такође, статистички значајна разлика ($p<0,05$) постојала је између контролних група. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

4.4.3. Имунохистохемијска анализа броја CD68 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика

Даљом патохистолошком анализом потврђено је присуство макрофага на ткивним исечцима језика у оба соја пацова без обзира на експериментални модел индукције оралне

кандидијазе. Извршено је имунохистохемијско бојење парафинских ткивних исечака на CD68 маркер који је најчешће експримиран на макрофагима. (Слика 5).



Слика 5. Имунохистохемијско бојење CD68 маркера у ткиву језика DA и AO пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених имунохистохемијском методом (увеличање 40x, размера=50μm)

Статистичком анализом броја ћелија позитивних на CD68 маркер забележен је значајно мањи ($p < 0,05$) број позитивних ћелија у DA соју у односу на АО сој без обзира на експериментални модел индукције оралне кандидијазе (DA+C. *albicans* у поређењу са АО+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans* у поређењу са АО+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* у поређењу са АО+Dex+Tet+C. *albicans* групом). Једино између DA+C. *albicans* и АО+C. *albicans* група није показана статистички значајна разлика у броју ћелија позитивних на CD68 маркер (Табела 16, График 12).

Табела 16. Средња вредност броја CD68 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика DA и АО пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	CD68+ (mean ± SD)		p
	Dark Agouti	Albino Oxford	
+C. <i>albicans</i>	29,91±1,39	28,95±0,60	0,040*
+Tet+C. <i>albicans</i>	32,42±1,08	38,74±0,99	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	21,80±0,73	46,92±2,71	<0,001*
Control	4,86±0,62	5,00±0,69	0,640

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

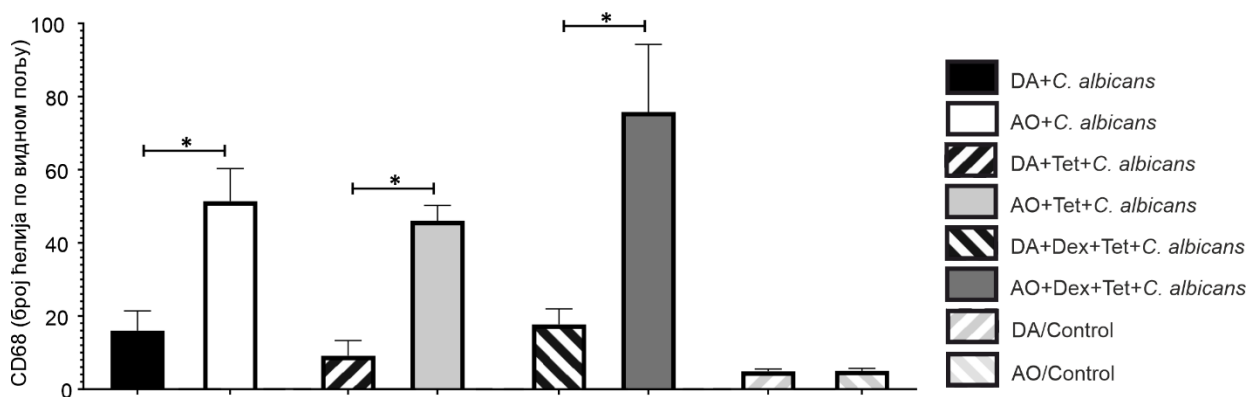
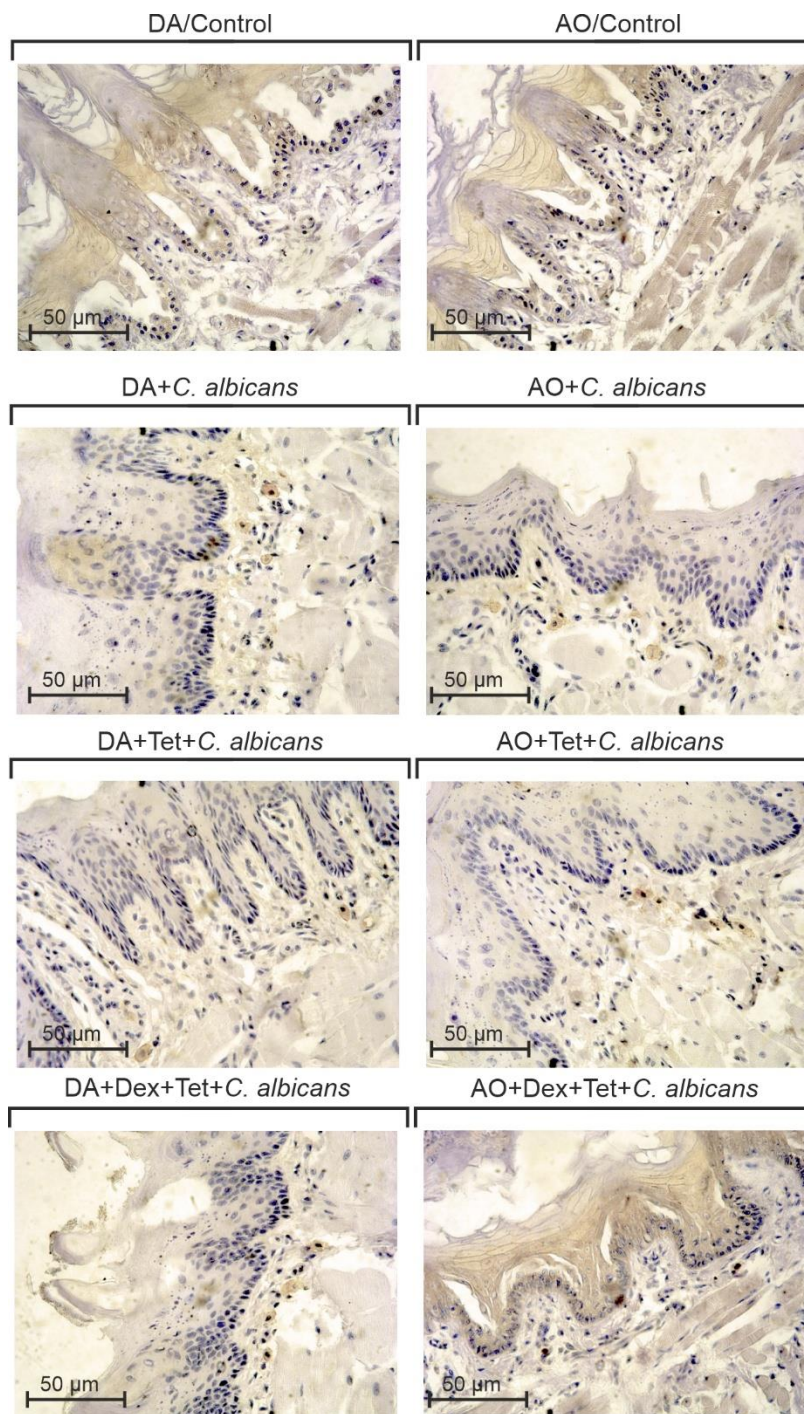


График 12. Средња вредност броја CD68 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика између DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Између контролних група, није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$). Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

4.4.4. Имунохистохемијска анализа броја HIS48 позитивних ћелија у инфламаторним инфилтратима ткива језика

У циљу детекције гранулоцита у инфламаторним инфилтратима ткива језика, извршено је имунохистохемијско бојење HIS48 маркера. Присуство гранулоцита потврђено је на ткивним исечцима језика у оба соја пацова без обзира на модел индукције оралне кандидијазе (Слика 6).



Слика 6. Имунохистохемијско бојење HIS68 маркера у ткиву језика DA и AO пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Репрезентативне фотомикрографије парафинских исечака ткива језика обојених имунохистохемијском методом (увеличање 40x, размера=50µm)

Статистичком анализом броја ћелија позитивних на HIS48 маркер детектован је значајно већи број ($p < 0,05$) у DA соју у односу на AO сој без обзира на модел индукције оралне кандидијазе (DA+C. *albicans* у поређењу са AO+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* у поређењу са AO+Dex+Tet+C. *albicans* групом). Међутим, између контролних група, DA+C. *albicans* и AO+C. *albicans*, није показана статистички значајна разлика у броју позитивних на HIS48 маркер (**Табела 17, График 13**).

Табела 17. Средња вредност броја HIS48 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика DA и AO сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	HIS48+ (mean ± SD)		
	Dark Agouti	Albino Oxford	p
+C. <i>albicans</i>	13,99±0,54	12,78±0,48	0,040*
+Tet+C. <i>albicans</i>	13,05±0,64	9,10±0,61	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	10,20±0,62	5,88±0,68	<0,001*
Control	5,14±0,65	5,01±0,55	0,635

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

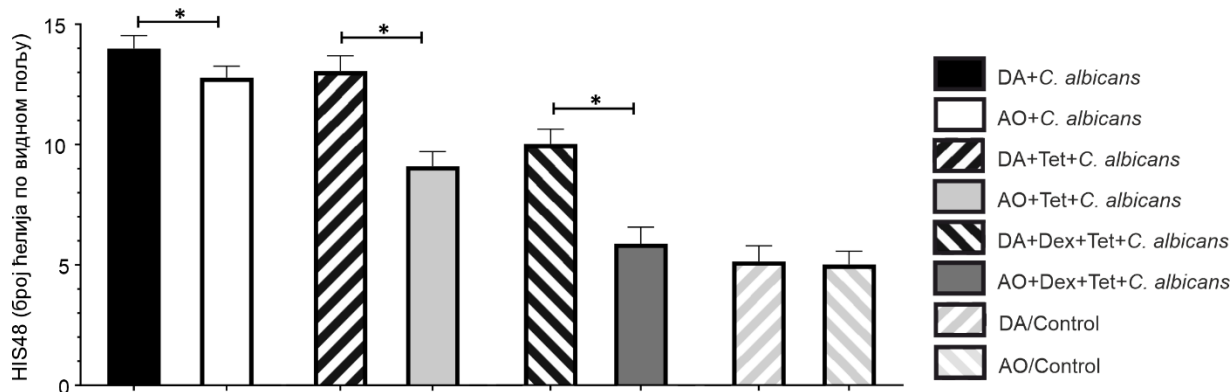


График 13. Средња вредност броја HIS48 позитивних ћелија по видном пољу у ткиву језика између DA и AO пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Између контролних група, није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$). Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

4.5. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА У ОРАЛНОЈ КАНДИДИЈАЗИ DA И АО ПАЦОВА

С обзиром на раније изведене анализе које су показале разлике у колонизацији, оштећењу ткива и инфламаторној инфилтрацији између два различита соја пацова (DA и АО), спроведена је анализа ткивне експресије гена како би се додатно истражило који цитокини су били преферентно експримирани у појединачном соју и у различитим моделима индукције оралне кандидијазе. Ово истраживање има за циљ да боље разуме аспекте имунског одговора и молекуларне механизме који леже у основи ових разлика између сојева и различитих модела инфекције *C. albicans* у оралном ткиву.

Коришћењем qRT-PCR методе процењене су релативне експресије гена за најчешће цитокине повезане са Th1 (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и IL-6), Th2 (IL-4 и IL-10) и Th17 имунским одговором (IL-17 и TGF- β 1) код DA и АО пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе.

4.5.1. Експресија гена повезаних са Th1 имунским одговором у оралној кандидијазе DA и АО пацова

Применом методе ланчане реакције полимеризације у реалном времену забележена је статистички значајно већа релативна експресија гена за IL-1 β у DA+C. *albicans* групи у односу на АО+C. *albicans* групу, као и у DA+Tet+C. *albicans* групи у односу на АО+Tet+C. *albicans* групу (оба $p < 0,05$; Табела 18, График 14). Међутим, разлика између DA+Dex+Tet+C. *albicans* и АО+Dex+Tet+C. *albicans* група није била статистички значајна ($p > 0,05$; Табела 18, График 14).

Табела 18. Релативна експресија гена за IL-1 β у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија IL-1 β (mRNA)		p
	Dark Agouti (mean \pm SD)	Albino Oxford (mean \pm SD)	
+C. <i>albicans</i>	249,94 \pm 38,42	6,38 \pm 6,25	0,001*
+Tet+C. <i>albicans</i>	112,39 \pm 152,77	0,06 \pm 0,11	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	1,18 \pm 1,24	0,43 \pm 0,18	0,661

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (mean \pm SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Mann-Whitney U тест).

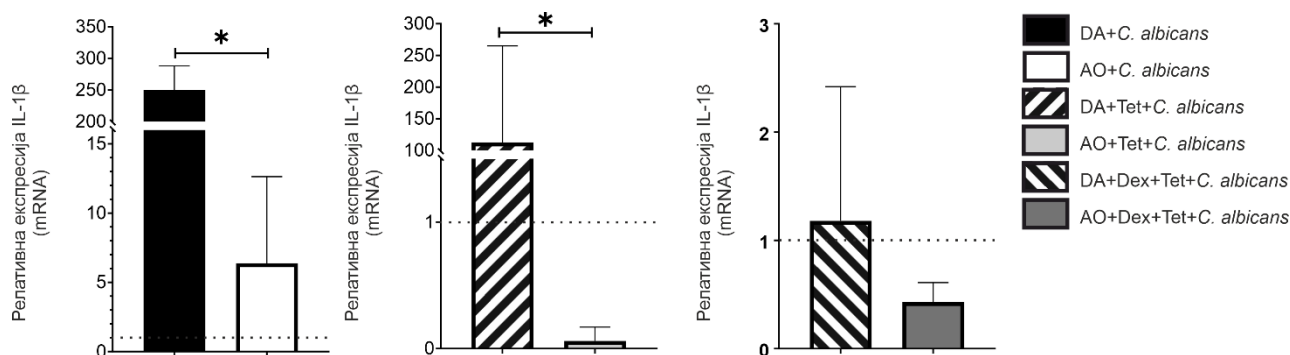


График 14. Релативна експресија гена за IL-1β у ткиву језика DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, као и применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Релативна експресија гена за TNF-α била је статистички значајно већа у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C. *albicans* групу и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* групи у односу на AO+Dex+Tet+C. *albicans* групу (оба $p < 0,05$; Табела 19, График 15).

Табела 19. Релативна експресија гена за TNF-α у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија TNF-α (mRNA)		p
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	371,48±90,5	12,65±8,5	<0,001*
+Tet+ <i>C. albicans</i>	79,98±117,59	53,8±60,0	0,661
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	6,18±15,54	0,02±0,04	<0,001*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

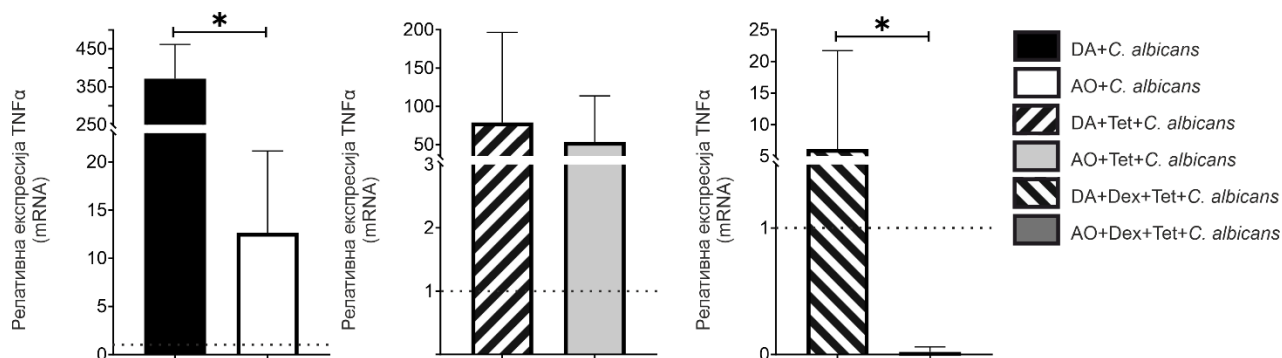


График 15. Релативна експресија гена за TNF- α у ткиву језика DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans* и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Релативна експресија гена за IFN- γ била је статистички значајно већа у DA+C. *albicans* групи у односу на АО+C. *albicans* групу, у DA+Tet+C. *albicans* групи у односу на АО+Tet+C. *albicans* групу, као и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* групи у односу на АО+Dex+Tet+C. *albicans* групу (сви $p < 0,05$; Табела 20, График 16).

Табела 20. Релативна експресија гена за IFN- γ у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија IFN- γ (mRNA)		<i>p</i>
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	440,14 \pm 46,8	0,25 \pm 0,17	<0,001*
+Tet+C. <i>albicans</i>	190,98 \pm 194,78	0,87 \pm 1,27	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	30,05 \pm 52,65	0,57 \pm 0,42	0,001*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

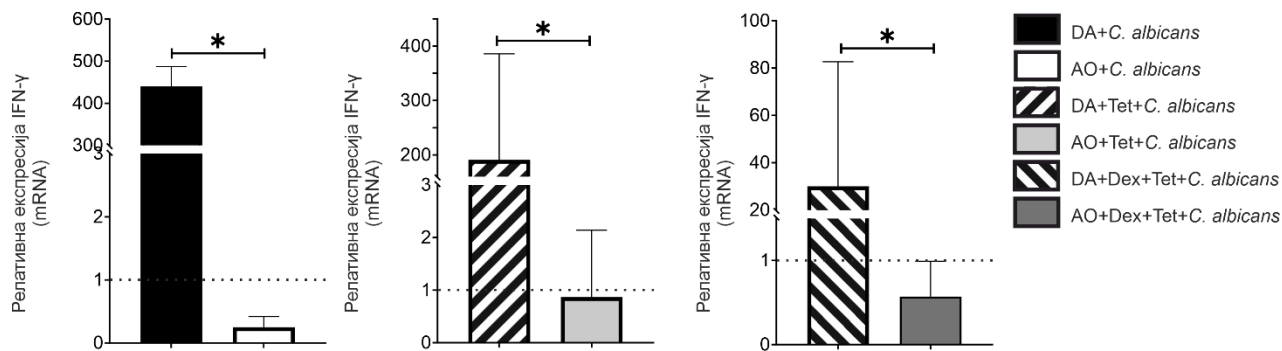


График 16. Релативна експресија гена за IFN- γ у ткиву језика DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Анализа релативне експресије гена за IL-6 показала је статистички значајно мању ($p < 0,05$) вредност у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C. *albicans* групу, док између DA+Tet+C. *albicans* и AO+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* и AO+Dex+Tet+C. *albicans* група није постојала статистички значајна разлика (оба $p > 0,05$; Табела 21, График 17).

Табела 21. Релативна експресија гена за IL-6 у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија IL-6 (mRNA)		<i>p</i>
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	1,50 \pm 0,78	114,10 \pm 102,0	<0,001*
+Tet+C. <i>albicans</i>	0,42 \pm 1,08	0,17 \pm 0,31	0,549
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	0,35 \pm 0,74	0,63 \pm 0,91	0,243

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

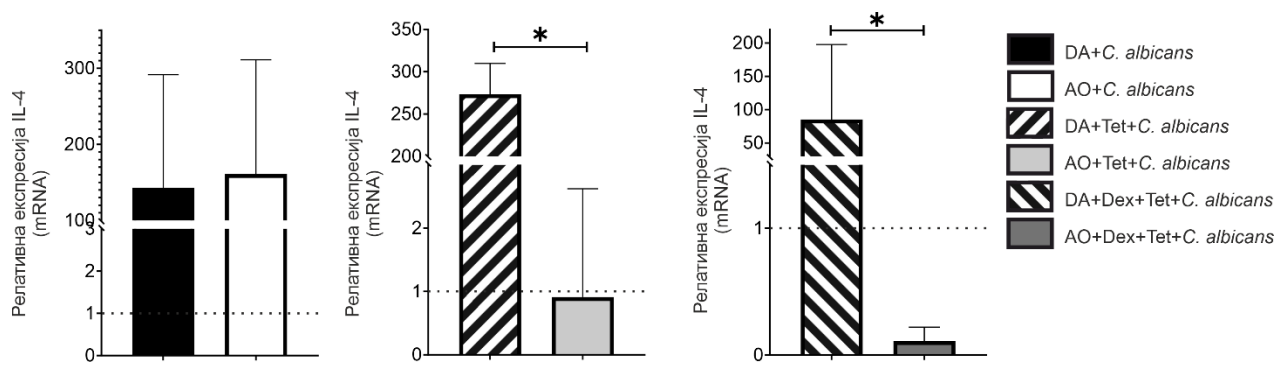


График 18. Релативна експресија гена за IL-4 у ткиву језика DA и АО пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p>0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Између група са применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, постојала је статистички значајна разлика ($p<0,05$). Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Релативна експресија гена за IL-10 била је статистички значајно већа у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C. *albicans* групу, у DA+Tet+C. *albicans* групи у односу на AO+Tet+C. *albicans* групу, као и у DA+Dex+Tet+C. *albicans* групи у односу на AO+Dex+Tet+C. *albicans* групу (сви $p<0,05$; Табела 23, График 19).

Табела 23. Релативна експресија гена за IL-10 у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија IL-10 (mRNA)		p
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	326,89 \pm 255,79	2,73 \pm 0,94	<0,001*
+Tet+C. <i>albicans</i>	45,41 \pm 53,56	0,14 \pm 0,28	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	15,66 \pm 38,55	0,53 \pm 0,49	0,017*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

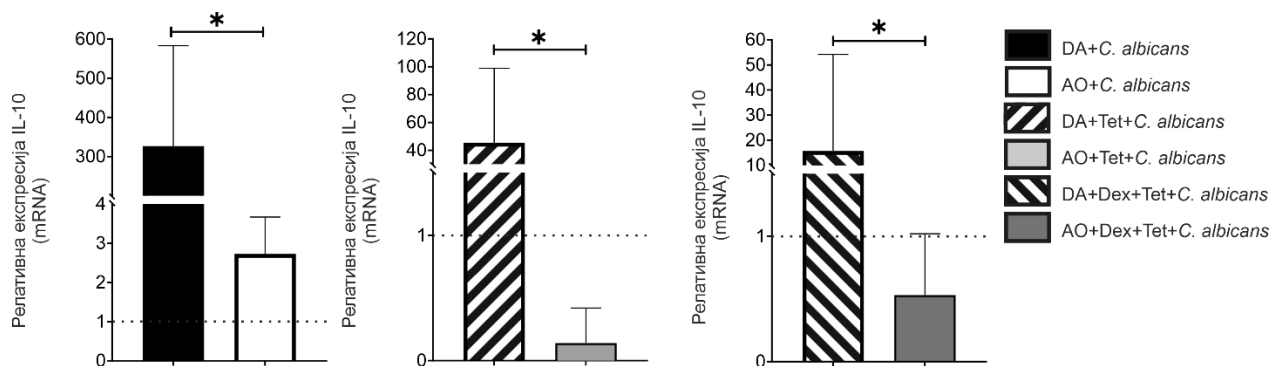


График 19. Релативна експресија гена за IL-10 у ткиву језика DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p<0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

4.5.3. Експресија гена повезаних са Th17 имунским одговором у оралној кандидијазе DA и АО пацова

Поређењем између DA+C. albicans и AO+C. albicans група показана је статистички значајно већа релативна експресија гена за IL-17 у DA у односу на АО пацове ($p<0,05$). Међутим, није показана статистички значајна разлика ($p>0,05$) упоређивањем DA+Tet+C. albicans групе у односу на AO+Tet+C. albicans групу, као ни DA+Dex+Tet+C. albicans групе у односу на AO+Dex+Tet+C. albicans групу (Табела 24, График 20).

Табела 24. Релативна експресија гена за IL-17 у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија IL-17 (mRNA)		p
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	523,74 \pm 239,45	2,9 \pm 3,41	0,031*
+Tet+C. albicans	111,74 \pm 202,96	42,45 \pm 48,21	0,278
+Dex+Tet+C. albicans	20,04 \pm 33,88	44,51 \pm 41,5	0,549

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p<0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

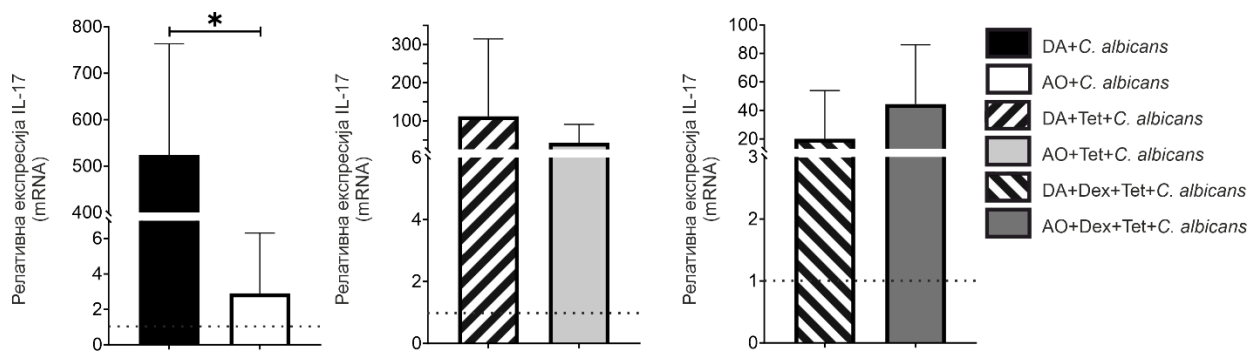


График 20. Релативна експресија гена за IL-17 у ткиву језика DA и АО пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

С друге стране, релативна експресија гена за TGF- β 1 била је статистички значајно већа ($p < 0,05$) у свим групама DA пацова у поређењу са одговарајућом групом АО пацова (DA+C. *albicans* у односу на AO+C. *albicans* групу, DA+Tet+C. *albicans* у односу на AO+Tet+C. *albicans* групу, DA+Dex+Tet+C. *albicans* у односу на AO+Dex+Tet+C. *albicans* групу) (Табела 25, График 21).

Табела 25. Релативна експресија гена за TGF- β 1 у DA и АО сојевима пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Релативна експресија TGF- β 1 (mRNA)		<i>p</i>
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	513,56 \pm 216,0	2,08 \pm 3,96	<0,001*
+Tet+C. <i>albicans</i>	297,98 \pm 160,0	0,3 \pm 0,27	<0,001*
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	151,47 \pm 26,25	0,90 \pm 1,07	<0,001*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

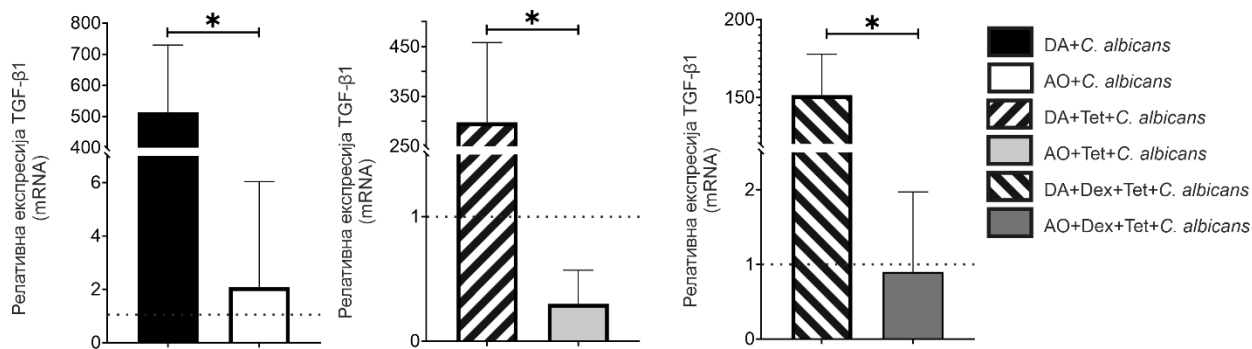


График 21. Релативна експресија гена за TGF-β1 у ткиву језика DA и АО сојевима пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$); Испрекидана линија представља базалну експресију циљних гена код контролних животиња; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

4.6. АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ DA И АО ПАЦОВА

Да бисмо додатно потврдили разлике у цитокинском профилу DA и АО сојева пацова у одговору на оралну инфекцију *C. albicans*, спровели смо анализу концентрација цитокина IFN-γ, TNF-α, IL-6 и IL-10 у серуму пацова са различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе применом ELISA теста.

Поређењем између DA+C. albicans и АО+C. albicans група показана је статистички значајно већа серумска концентрација IFN-γ у DA у односу на АО пацове ($p < 0,05$). Међутим, није показана статистички значајна разлика ($p > 0,05$) упоређивањем DA+Tet+C. albicans групе у односу на АО+Tet+C. albicans групу, DA+Dex+Tet+C. albicans групе у односу на АО+Dex+Tet+C. albicans групу, као ни између контролних група (Табела 26, График 22).

Табела 26. Концентрација IFN-γ у серуму DA и АО сојева пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Серумска концентрација IFN-γ (pg/ml)		p
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	674,75±6,98	607,25±26,05	<0,001*
+Tet+C. albicans	662,87±59,89	671,00±30,06	0,767
+Dex+Tet+C. albicans	629,75±21,82	659,75±42,20	0,153
Control	568,50±23,48	529,75±40,57	0,132

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

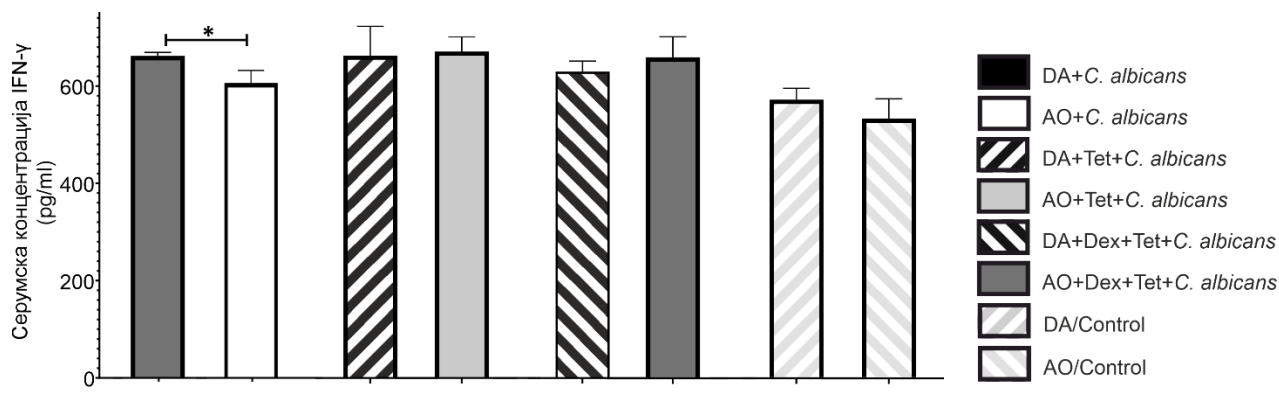


График 22. Концентрације IFN- γ у серуму DA и AO сојева пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као ни између контролних група. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

Анализом серумских концентрација TNF- α показана је статистички значајно већа ($p < 0,05$) вредност у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C. *albicans* групу. С друге стране, DA+Tet+C. *albicans* група имала је статистички значајно нижу ($p < 0,05$) вредност у односу на AO+Tet+C. *albicans* групу, док између група DA+Dex+Tet+C. *albicans* и AO+Dex+Tet+C. *albicans* није показана статистички значајна разлика ($p > 0,05$). Разлика је постојала и између контролних група, где је DA/Control група имала статистички значајно већу ($p < 0,05$) вредност у односу на AO/Control групу (**Табела 27, График 23**).

Табела 27. Концентрација TNF- α у серуму DA и AO сојева пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Серумска концентрација TNF- α (pg/ml)		
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	<i>p</i>
+ <i>C. albicans</i>	510,01 \pm 24,63	461,67 \pm 27,20	0,009*
+Tet+C. <i>albicans</i>	491,67 \pm 27,26	665,00 \pm 194,95	0,001 [#]
+Dex+Tet+C. <i>albicans</i>	571,67 \pm 11,83	636,67 \pm 55,85	0,132
Control	386,67 \pm 32,25	330,01 \pm 71,60	0,002*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

[#] статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

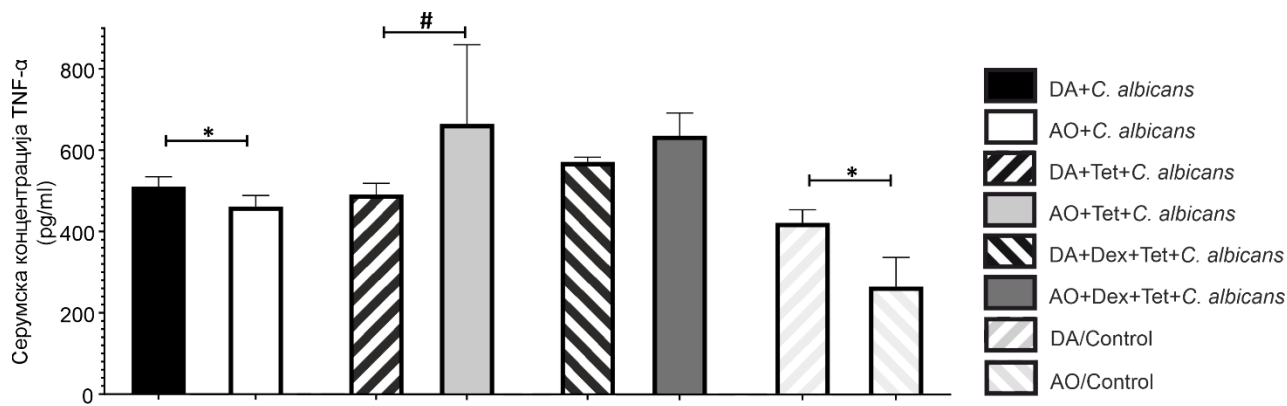


График 23. Концентрације TNF- α у серуму DA и AO сојева пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и између контролних група. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест); # статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Вредности серумских концентрација IL-6 нису показале статистички значајну разлику ($p > 0,05$) између DA и AO група са експериментално индукованом оралном кандидијазом било којим моделом. Међутим, статистички значајно већа ($p < 0,05$) концентрација IL-6 постојала је у DA/Control групи у односу на AO/Control групу (Табела 28, График 24).

Табела 28. Концентрација IL-6 у серуму DA и AO сојева пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Серумска концентрација IL-6 (pg/ml)		p
	Dark Agouti ($mean \pm SD$)	Albino Oxford ($mean \pm SD$)	
+ <i>C. albicans</i>	1069,01 \pm 78,15	882,34 \pm 320,16	0,218
+Tet+ <i>C. albicans</i>	1130,67 \pm 210,23	1025,67 \pm 30,98	0,228
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	1012,34 \pm 90,04	1079,01 \pm 179,18	0,434
Control	865,67 \pm 213,73	632,34 \pm 180,96	0,026*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

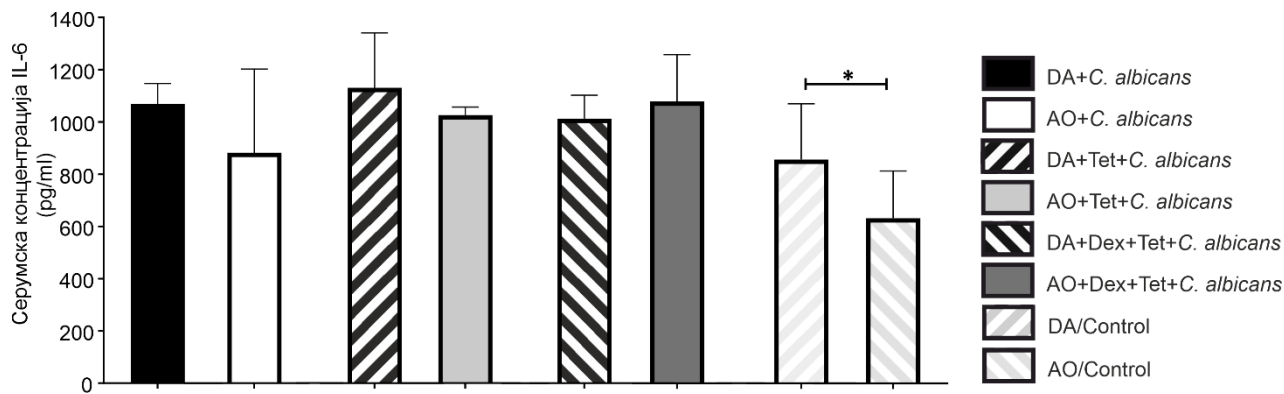


График 24. Концентрације IL-6 у серуму DA и AO сојева пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Између контролних група постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$). Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

Серумска концентрација IL-10 била је статистички значајно већа ($p < 0,05$) у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C. *albicans* групу, док између осталих експерименталних и контролних група није постојала статистички значајна разлика (сви $p > 0,05$; Табела 29, График 25).

Табела 29. Концентрација IL-10 у серуму DA и AO сојева пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	Серумска концентрација IL-10 (pg/ml)		p
	Dark Agouti (mean \pm SD)	Albino Oxford (mean \pm SD)	
+ <i>C. albicans</i>	9122,30 \pm 69,86	9022,30 \pm 23,66	0,026*
+Tet+ <i>C. albicans</i>	9274,80 \pm 240,52	9158,96 \pm 160,08	0,962
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	9438,96 \pm 509,92	9268,96 \pm 161,33	0,454
Control	8902,30 \pm 356,76	8982,30 \pm 257,53	0,818

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Mann-Whitney U* тест).

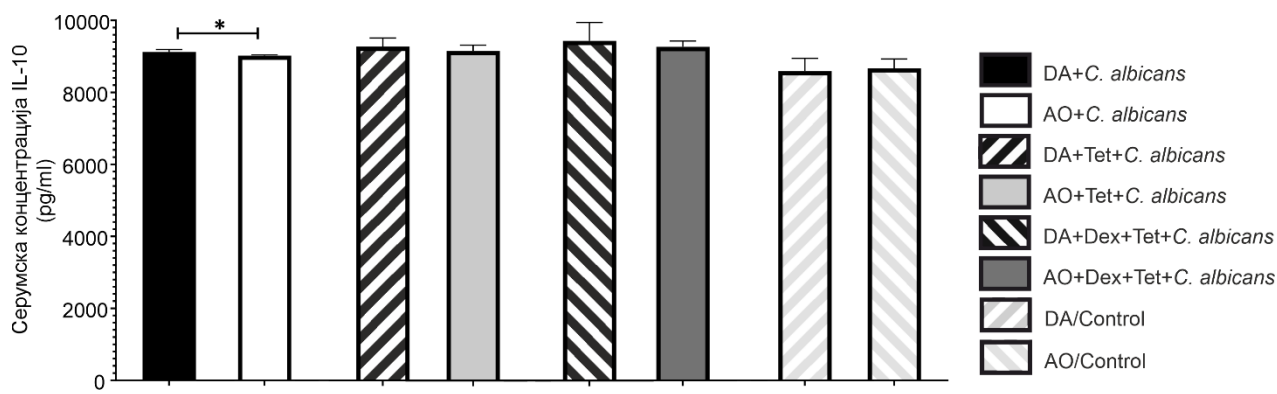


График 25. Концентрације ИЛ-10 у серуму DA и АО сојева пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као ни између контролних група. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација ($mean \pm SD$); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Mann-Whitney U тест).

4.7. АНАЛИЗА ЕФЕКТА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ НА СИСТЕМСКЕ ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА

4.7.1. Концентрација системских прооксидативних параметара код DA и АО пацова

Како бисмо испитали ефекте оралне кандидијазе у различитим експерименталним моделима на параметре оксидативног стреса у системској циркулацији, у узорцима крви DA и АО пацова биохемијски су анализиране вредности прооксидативних маркера (H_2O_2 , O_2^- , NO_2^- и TBARS).

Вредности параметра H_2O_2 су биле статистички значајно ниже ($p < 0,05$) у свим групама DA пацова у поређењу са одговарајућом групом АО пацова (DA+C. albicans у односу на АО+C. albicans групу, DA+Tet+C. albicans у односу на АО+Tet+C. albicans групу, DA+Dex+Tet+C. albicans у односу на АО+Dex+Tet+C. albicans групу) (Табела 30, График 26).

Табела 30. Вредности прооксидативног параметра H_2O_2 у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	H_2O_2 (nmol/ml)		<i>p</i>
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	2,67±0,45	4,41±0,69	0,004*
+Tet+ <i>C. albicans</i>	3,46±0,80	4,39±0,46	0,025*
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	3,75±0,36	4,25±0,17	0,005*

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

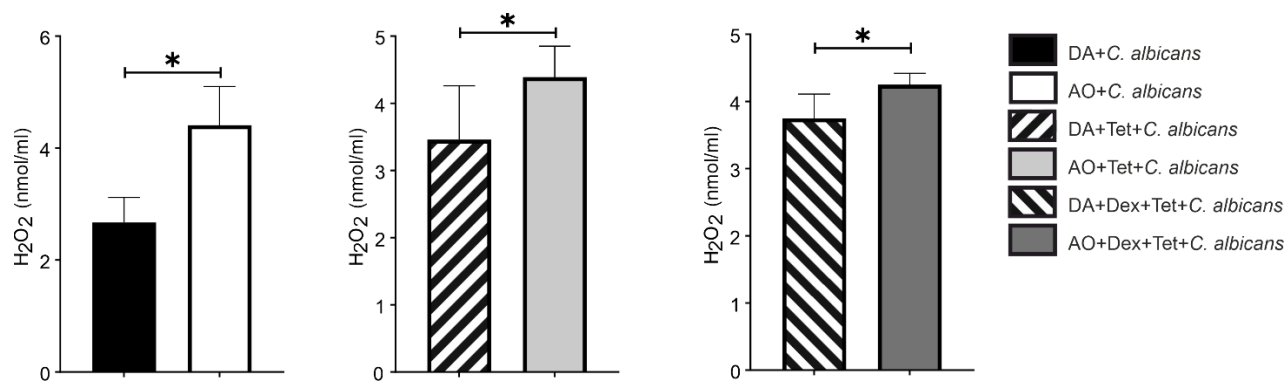


График 26. Вредности прооксидативног параметра H_2O_2 у узорцима крви DA и AO пацова. Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

Статистичка упоредна анализа вредности прооксидативног параметра O_2^- није показала статистички значајну разлику ($p > 0,05$) између пацова DA и AO соја без обзира на метод индукције оралне кандидијазе (Табела 31, График 27).

Табела 31. Вредности прооксидативног параметра O_2^- у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	O_2^- (nmol/ml)		p
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	1,48±1,66	4,42±2,97	0,127
+Tet+ <i>C. albicans</i>	1,58±1,28	2,44±2,1	0,204
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	2,97±1,3	2,64±1,7	0,331

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD).

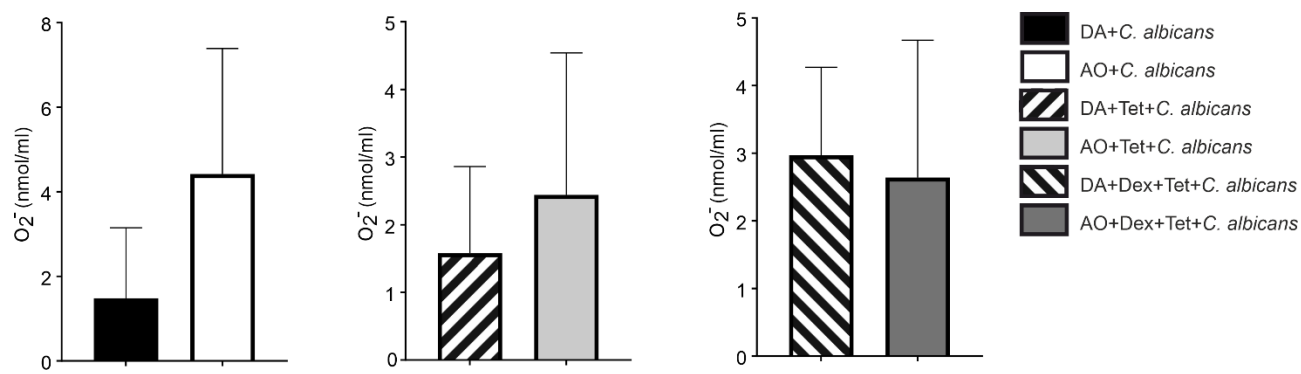


График 27. Вредности прооксидативног параметра O_2^- у узорцима крви DA и AO пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p>0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD).

Анализа вредности прооксидативног параметра NO_2^- показала је статистички значајно ниже вредности само у DA+Dex+Tet+*C. albicans* групи у односу на AO+Dex+Tet+*C. albicans* групу. Између DA+*C. albicans* и AO+*C. albicans*, као и DA+Tet+*C. albicans* и AO+Tet+*C. albicans* група није постојала статистички значајна разлика ($p>0,05$; Табела 32, График 28)

Табела 32. Вредности прооксидативног параметра NO_2^- у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	NO_2^- (nmol/ml)		p
	Dark Agouti (mean \pm SD)	Albino Oxford (mean \pm SD)	
+ <i>C. albicans</i>	5,54 \pm 0,24	5,69 \pm 0,42	0,565
+Tet+ <i>C. albicans</i>	5,59 \pm 0,43	6,1 \pm 0,62	0,104
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	5,8 \pm 0,43	6,97 \pm 0,98	0,040*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (mean \pm SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

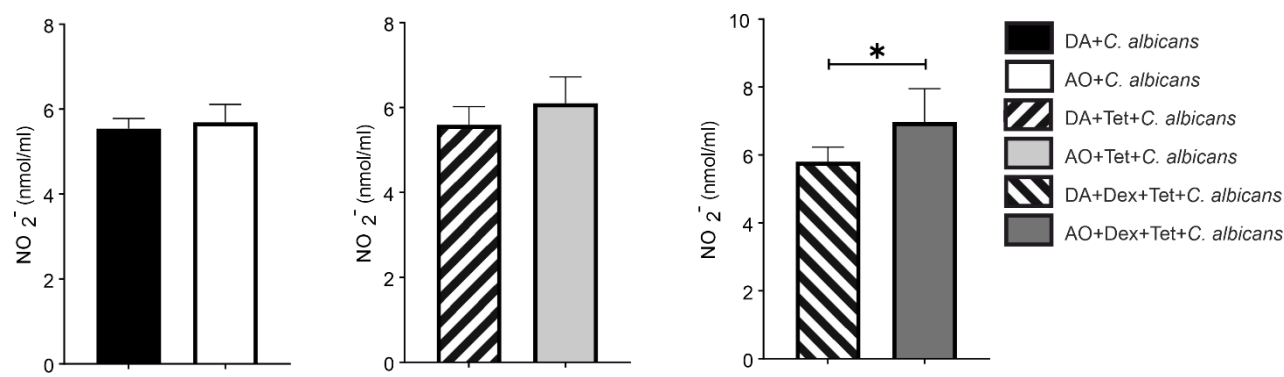


График 28. Вредности прооксидативног параметра NO_2^- у узорцима крви DA и AO пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans* и применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Међутим, постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (mean \pm SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

С друге стране, вредности параметра липидне пероксидације, приказане као TBARS, биле су статистички значајно ниже ($p < 0,05$) у свим групама DA пацова у поређењу са одговарајућом групом AO пацова (DA+*C. albicans* у односу на AO+*C. albicans* групу, DA+Tet+*C. albicans* у односу на AO+Tet+*C. albicans* групу, DA+Dex+Tet+*C. albicans* у односу на AO+Dex+Tet+*C. albicans* групу) (Табела 33, График 29).

Табела 33. Вредности прооксидативног параметра TBARS у системској циркулацији DA и АО соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)		<i>p</i>
	Dark Agouti (<i>mean</i> \pm SD)	Albino Oxford (<i>mean</i> \pm SD)	
+ <i>C. albicans</i>	2,11 \pm 0,54	4,43 \pm 0,45	<0,001*
+Tet+ <i>C. albicans</i>	3,5 \pm 0,41	4,56 \pm 0,34	<0,001*
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	4,65 \pm 0,7	5,41 \pm 1,0	0,045*

Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean* \pm SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

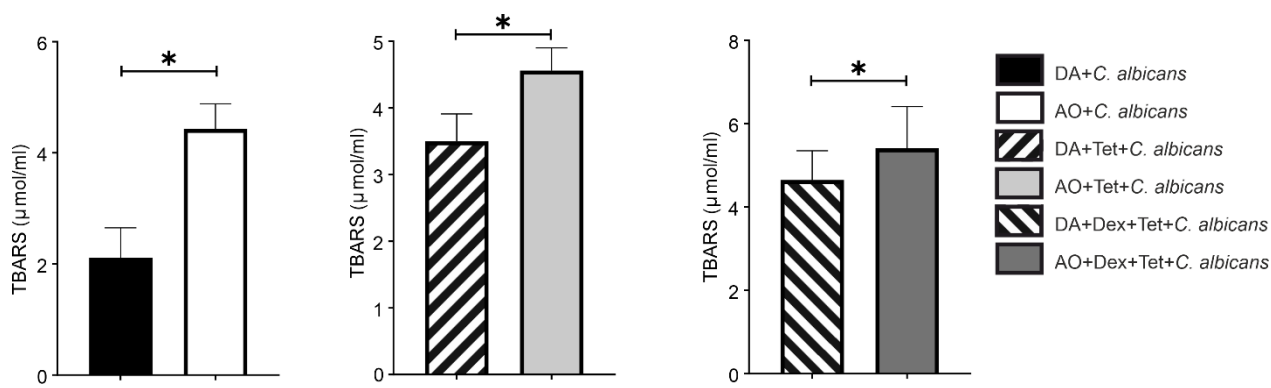


График 29. Вредности прооксидативног параметра TBARS у узорцима крви DA и АО пацова.

Постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација (*mean* \pm SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (*Independent Samples T* тест).

4.7.2. Концентрација системских антиоксидативних параметара DA и АО пацова

Поред прооксидативних, биохемијском анализом узорака крви одређене су и вредности антиоксидативних маркера (CAT, SOD и GSH) како би се додатно испитали ефекти оралне кандидијазе у различитим експерименталним моделима на параметре оксидативног стреса и разлике у истим између пацова DA и АО соја.

Статистичка упоредна анализа вредности антиоксидативног параметра CAT није показала статистички значајну разлику ($p > 0,05$) између пацова DA и АО соја без обзира на метод индукције оралне кандидијазе (Табела 34, График 30).

Табела 34. Вредности антиоксидативног параметра CAT у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	CAT (U/gHb×10 ³)		p
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	37,88±26,28	19,75±9,71	0,192
+Tet+ <i>C. albicans</i>	25,9±8,68	35,4±9,91	0,175
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	27,45±17,89	29,95±15,14	0,787

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD).

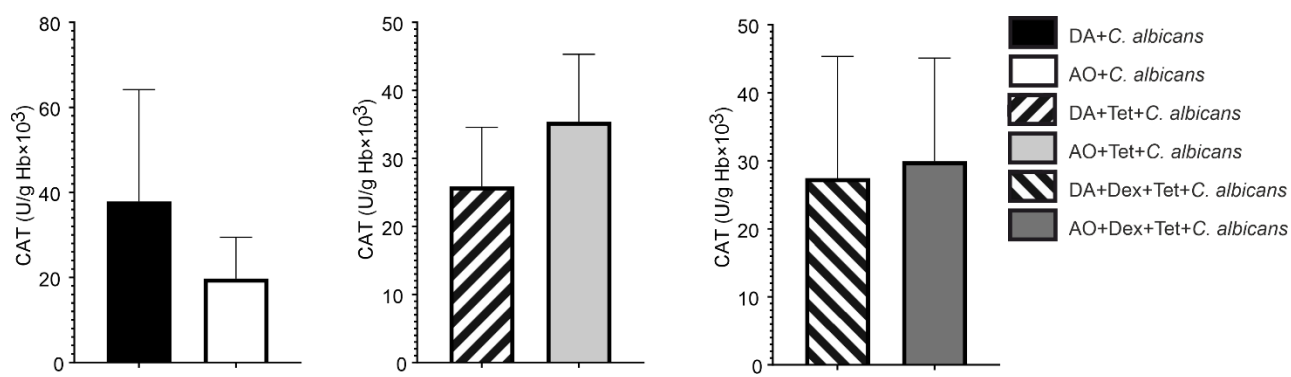


График 30. Вредности антиоксидативног параметра CAT у узорцима крви DA и AO пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p>0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans*, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*, као и изазивањем имуносупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD).

Анализа вредности антиоксидативног параметра SOD показала је статистички значајно ниже вредности само у DA+Tet+*C. albicans* групи у односу на AO+Tet+*C. albicans* групу. Између DA+C. *albicans* и AO+C. *albicans*, као и DA+Dex+Tet+*C. albicans* и AO+Dex+Tet+*C. albicans* група није постојала статистички значајна разлика ($p>0,05$; Табела 35, График 31).

Табела 35. Вредности антиоксидативног параметра SOD у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	SOD (U/gHb×10 ³)		p
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	50,88±38,96	32,56±26,99	0,431
+Tet+ <i>C. albicans</i>	16,28±11,51	45,8±21,99	0,020*
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	42,33±37,03	45,58±24,15	0,879

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

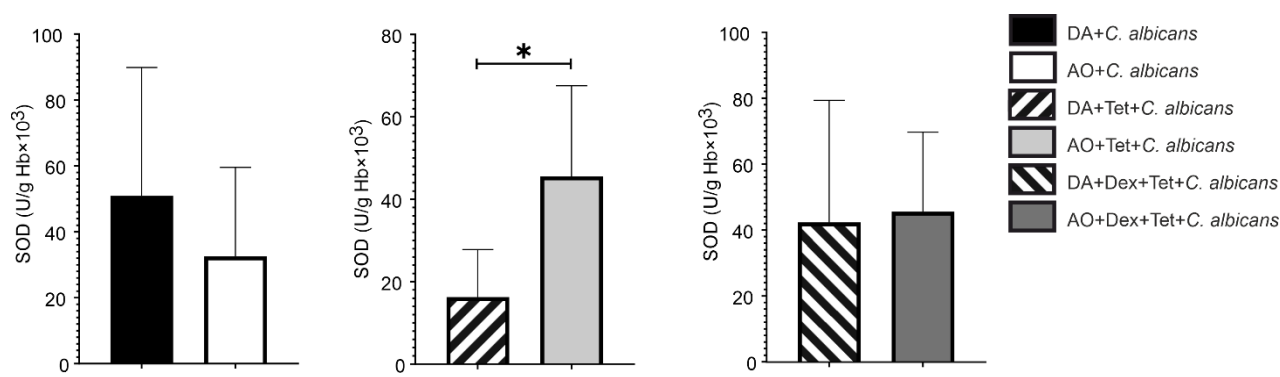


График 31. Вредности антиоксидативног параметра SOD у узорцима крви DA и AO пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans* и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Међутим, постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

Слично као и за SOD, антиоксидативни параметар GSH показао је статистички значајно ниже вредности само у DA+Tet+*C. albicans* групи у односу на AO+Tet+*C. albicans* групу. Међутим, између DA+*C. albicans* и AO+*C. albicans*, као и DA+Dex+Tet+*C. albicans* и AO+Dex+Tet+*C. albicans* група није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$; Табела 36, График 32).

Табела 36. Вредности антиоксидативног параметра GSH у системској циркулацији DA и AO соја пацова у различитим моделима индукције оралне кандидијазе.

Експериментални модели индукције оралне кандидијазе	GSH (nmol/ml)		p
	Dark Agouti (mean ± SD)	Albino Oxford (mean ± SD)	
+ <i>C. albicans</i>	96954,5± 4745,88	92666,29± 16619,27	0,636
+Tet+ <i>C. albicans</i>	95878,18± 6874,68	109067,41± 7154,75	0,015*
+Dex+Tet+ <i>C. albicans</i>	101960,26± 7464,97	84739,09± 23224,86	0,125

Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD);

* статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

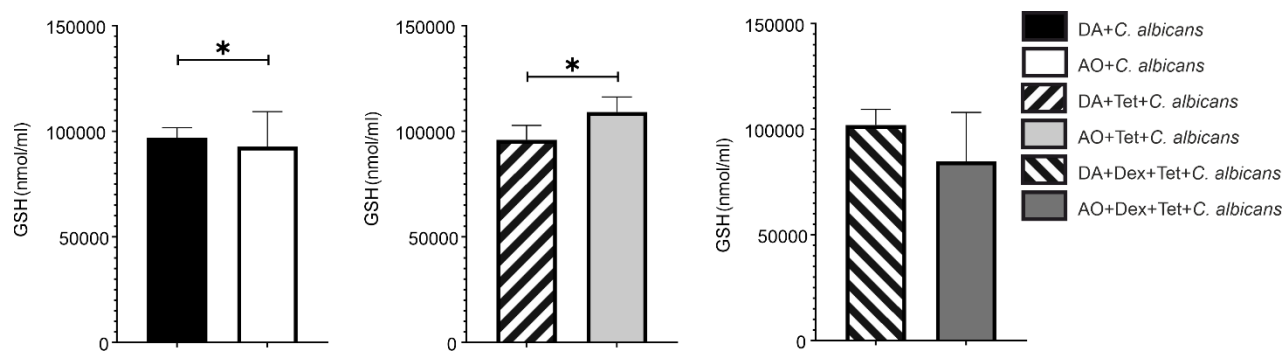


График 32. Вредности антиоксидативног параметра GSH у узорцима крви DA и AO пацова. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0,05$) између група са методом индукције оралне кандидијазе применом оралне инокулације *C. albicans* и изазивањем имunosупресије, применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Међутим, постојала је статистички значајна разлика ($p < 0,05$) између група са методом применом предтретмана антибиотиком и оралном инокулацијом *C. albicans*. Вредности су приказане као средња вредност ± стандардна девијација (mean ± SD); * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) међу групама (Independent Samples T тест).

ДИСКУСИЈА



5. ДИСКУСИЈА

У оквиру ове докторске дисертације, истраживали смо утицај генетских варијација код пацова, као и реакцију домаћина, на развој оралне кандидијазе индуковане различитим експерименталним моделима. Испитивање је обухватило мушке пацове сојева DA и AO. Наше истраживање је открило значајне диспаритете у колонизацији епитела од стране *C. albicans*, степену оштећења епитела и природи и степену инфламаторне инфилтрације између ова два инbredна соја пацова. Поред тога, примећене су одређене флукуације у експресији гена повезаних са проинфламаторним одговорима на оралну кандидијазу, као и разлике у концентрацијама прооксидативних и антиоксидативних параметара у крвотоку DA и AO сојева пацова. Ови резултати указују на то да се DA и AO сојеви разликују у одговору на инфекцију *C. albicans* у оквиру имунокомпетентних или имунокомпромисованих стања.

Бројна истраживања на људима су показала да генетски маркери имају утицај на подложност гљивичним инфекцијама и модулацију имунских одговора путем специфичних гена (153,154). Иако још увек недостају функционалне студије о значају полиморфизама гена, истраживања *in vitro* су показала разлике у природи одговора цитокина на гљивичну стимулацију у ћелијама здравих особа (155,156). Штавише, вреди напоменути да на имунски одговор домаћина утиче пол, при чему се разлике приписују ендокрино-имунским интеракцијама (157). Постојећи подаци генерално сугеришу присуство повољних имунолошких одговора код жена, што им потенцијално даје повећану отпорност на гљивичне инфекције у поређењу са мушкарцима (158). Ово је подстакло нашу одлуку да искључиво користимо мужјаке DA и AO пацова у нашој студији да бисмо истражили диспаритете сојева у њиховом одговору на *C. albicans*.

5.1. РАЗЛИКЕ У СТЕПЕНУ КОЛОНИЗАЦИЈЕ ТКИВА *C. ALBICANS* У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И AO ПАЦОВА

PAS метода бојења је посебна хистохемијска техника бојења која се често користи у микробиологији и хистологији за идентификацију гљивица, укључујући *C. albicans*. PAS бојење се базира на реакцији гљивичних полисахарида и гликопротеина са периодичном киселином, која разлаже гликолизне везе у овим супстанцама. Након тога, узорак се третира Шифовим реагенсом, који реагује са разложеним шећерима и гликопротеинима, стварајући карактеристично црвену боју. Ова метода омогућава идентификацију гљива, укључујући *C. albicans*, јер ова врста гљивице има специфичну присутност гликопротеина и полисахарида у свом ћелијском зиду. Када се гљивице обоје PAS техником, њихове ћелије ће добити карактеристичну црвену боју, што је јединствено за присуство гликолизних веза и гликопротеина. PAS бојење се обично користи у лабораторијским поступцима за идентификацију *C. albicans* и других патогених гљивица у узорцима ткива, крви, урина или другим биолошким материјалима. Ова метода је посебно корисна када се ради о детекцији гљивица у узорцима ткива, као што је случај у анализама оралне кандидијазе, јер помаже у идентификацији и потврђивању присуства *C. albicans* на хистолошком нивоу.

Епителне ћелије слузокоже су у првом плану и прве ступају у интеракцију са *C. albicans*. Адхеренција *C. albicans* настаје услед интеракције између компоненти ћелијског зида гљивица и површинских рецептора ћелија домаћина. Од компоненти ћелијског зида гљивице, најзначајнији су адхезини од којих значајно место заузимају Hwp1 и ALS 1–9. Идентификовано је више епителних рецептора домаћина који представљају мету за поједине ALS протеине (35). ALS1–5 и ALS9 су појачано изражени током мукокутане кандидијазе, док је ALS3 протин одговоран за приањање хифалног облика *C. albicans* и његова експресија је појачана током оралних инфекција (35). ALS3 има улогу како у адхезији тако и у инвазији *C. albicans* (159–161). Међутим, и метаболички активне и неактивне ћелије *C. albicans*, могу продрети у епителни сој ендоцитозом (162). Током адхезије *C. albicans* на епителне ћелије, индукују се морфогенеза у хифални облик и експримирају се протеини повезани са хифама. Hwp1 је високо изражен током инфекције у усној дупљи (163). Овај протеин делује као супстрат за епителне трансглутаминазе, олакшавајући ковалентне везе са другим епителним протеинима. То омогућава даљу адхезију и успостављање везе између *C. albicans* и епителних ћелија. Активна пенетрација хифе је доминантан пут инвазије. Активно продирање, преко физичког притиска створеног активно растућим хифама и хидролизом, настаје услед производње кандидализина и хидролитичких ензима, као што су протеиназе (секреторне аспарагинске протеиназе енгл. *secreted aspartyl proteinases*, Sap) 1-10), фосфолипазе (енгл. *phospholipase*, PL) и различитих липаза (164). Протеиназе Sap1-8 су ванћелијске, док Sap9 и Sap10 остају везане за ћелијску мембрану гљивице. Међутим, оне заједно разграђују многе компоненте ткива домаћина и протеине укључене у имунску одбрану. Фосфолипазе су значајне за обезбеђивање приањања *C. albicans* на ћелије домаћина, али су и значајан фактор патогености (165). Ово је потврђено претходним истраживањем у коме је показано да хифални облик *C. albicans* који не производи фосфолипазу PLD1, може да оствари адхезију за епителне ћелије, али не може да изврши пенетрацију кроз епител домаћина (166).

Сврха нашег истраживања била је да испитамо разлике у осетљивости на инфекцију *C. albicans* између два различита инбредна соја пацова, DA и АО соја. Из тог разлога, први корак у нашем истраживању био је да испитамо степен колонизације оралног епитела од стране *C. albicans* у различитим експерименталним моделима. Како бисмо утврдили присуство квасца и хифа *C. albicans*, хистолошке исечке ткива језика анализирали смо користећи PAS технику бојења. Нашом анализом откривене су значајне разлике између испитиваних инбредних сојева пацова у имунокомпетентном, али не и у имунокомпромитованим моделима. Наиме, имунокомпетентни АО пацови (АО+*C. albicans* група) су показали значајно већи број колонизације, односно присуство гљивичних квасаца и хифа на оралном епителу, у односу на исту групу DA пацова (DA+*C. albicans*) (Слика 1А, График 1). Добијени резултат указује на већу пријемчивост на инфекцију *C. albicans* у АО пацова у односу на DA пацове у оквиру наших модела имунокомпетентних животиња. Претходним истраживањима других аутора, такође су показане разлике у пријемчивости на инфекције другим патогенима између ова два инбредна соја пацова (147,149,167–169). У студији Vasilev *et al.* (167), DA пацови су показали значајно већу пријемчивост на инфекцију *Trichinella spiralis*, док су у студији Nicholls *et al.* (168), АО пацови показали значајно већу пријемчивост на окуларну *herpes simplex* вирусну инфекцију. Ово са једне стране указује да постоје разлике међу DA и АО соја у пријемчивости, али и да је степен пријемчивости појединог соја завистан од врсте патогена којима су животиње изложене. Оно што је значајно са аспекта нашег истраживања, су резултати претходних студија Mirkov *et al.*

(147,149) и Popović *et al.* (169), где су имунокомпетентни АО сојеви показивали значајно већу пријемчивост на пулмонарну гљивичну инфекцију *Aspergillus fumigatus* од DA соја, што је у складу са нашим резултатима. Са друге стране, у случају имунокомпромитованих животиња (DA+Tet+C. *albicans*, DA+Dex+Tet+C. *albicans*, АО+Tet+C. *albicans* и АО+Dex+Tet+C. *albicans*), нисмо уочили значајне разлике између група у присуству гљивичних квасаца и хифа на епителу (**Слика 1Б и В, Графици 2-3**), што указује да оба инбредна соја пацова показују сличну пријемчивост на инфекцију *C. albicans* када су у имунокомпромитованом стању. Ови резултати нам пружају важне увиде у разлике између ова два инбредна соја пацова у односу на њихову пријемчивост на оралну инфекцију *C. albicans*. Такође, наглашавају важност контекста имунског статуса при разматрању пријемчивости на гљивичне инфекције и откривању нових аспеката у вези са одговорима домаћина на ову инфекцију у различитим имунским стањима.

5.2. СТЕПЕН ОШТЕЋЕЊА ТКИВА УЗРОКОВАН ИНФЕКЦИЈОМ *C. ALBICANS* У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА

Оштећење епитела настаје као последица инвазије *C. albicans* у ткиво домаћина. Инвазија *C. albicans* настаје помоћу два различита процеса, индукованом ендоцитозом (25%) и активном пенетрацијом (75%) (170). Током активне пенетрације, *C. albicans* директно уништава ткиво домаћина помоћу хифе, али и излучивањем различитих токсичних материја од којих су најважније секретоване аспаргинске протеазе и кандидализин. Ове токсичне материје врше деградацију ткива, што за последицу има губљење интегритета ткива домаћина, односно оштећење ткива (171–174).

Пошто смо детектовали колонизацију квасаца и хифа и утврдили да је присутна већа колонизација *C. albicans* у имунокомпетентном АО соју пацову, у односу на DA сој, желели смо даље да испитамо да ли већа присутност вирулентних облика *C. albicans*, значи следствено и веће оштећење ткива. На нашим хистолошким пресецима ткива језика свих експерименталних група, утврдили смо да постоје различите хистолошке промене од хиперкератозе, хиперплазије, губитка или одсуства филиформних папила, присуства дезорганизованог базалног слоја, спонгиозе, егзоцитозе до интраепителних микроапсеса. Све ове промене су последица инвазије *C. albicans* у ткиво домаћина. Међутим, поједине настају и као покушај ткива да се одбрани од гљивичне инфекције. У једну од таквих промена, спада **кератинизација** епитела која подразумева накупљање и стврдњавање кератина на површини епитела у циљу ојачања интегритета ткива од гљивичне инфекције и спречавања инвазије *C. albicans*. Притом, у одговору на *C. albicans*, активира се имунски систем домаћина, где регрутовани неутрофили и макрофаги луче различите цитокине и факторе раста утичући на појачану производњу кератина (170,175). Још једна таква одбрамбена реакција ткива јесте **хиперплазија** ткива коју су први пут споменули у контексту гљивичне инфекције Jepsen и Winther (176) и који су сматрали да се *C. albicans* надовезује на постојећу хипепластичну лезију, а не да је хиперпластична лезија последица гљивичне инфекције. Да би оборио ту претпоставку, Sawson (177) је демонстрирао да је *C. albicans* способна да изазове хиперплазију ткива. Неколико студија је даље потврдило да ако *C. albicans* изврши инвазију на епително ткиво, да ће се јавити хиперплазија, као адаптивни одговор на инвазију, односно, када дође до оштећења епителног слоја, ткиво

реагује активацијом процеса зарастања и обнављања, што може резултовати хиперплазијом (178,179).

Као што смо већ напоменули, *C. albicans* може директно, путем хифе да оштети ткиво домаћина, при чему долази и до **губитка филиформних папила**, али и до **дезорганизације базалног слоја епитела**. Такође, инфекција *C. albicans* активира имунски одговор домаћина, а као последица тога долази до стварања отока, циркулаторних промена и оштећења крвних судова у ткиву језика. Све ово може допринети губитку папила и дезорганизацији базалног слоја епитела. **Спонгиоза ткива** представља појаву у ткиву где се ћелије раздвајају и стварају интерстицијални простор, који може бити испуњен течношћу. Ова појава може се видети у различитим контекстима, а један од њих је и присуство гљивичних инфекција. Настаје као последица оштећења ћелија и инфламаторних реакција (180,181). **Егзоцитоза** је биолошки процес у ћелијама током којег се унутарћелијски материјал, укључујући протеине, липиде или друге супстанце, избацује из ћелије у околину. Егзоцитоза игра важну улогу у имунском одговору тела на гљивичне инфекције, доприносећи елиминацији гљивица и обнављању оштећених ткива (182). Инфекција *C. albicans* може изазвати инфламаторни одговор, а имунолошке ћелије могу се инфилтрирати у епителни слој. Ово инфилтрирање може изазвати оштећење епителних ћелија и образовање **микроапсцеса** (183,184).

Анализирањем ткива, од свих наведених промена, најчешће смо детектовали губитак или одсуство филиформних папила, хиперкератозу, дезорганизацију базалног слоја епитела, као и хиперплазију епитела. Сумирањем резултата хистолошког скорa, дошли смо до података да су и имунокомпетентни и имунокомпромитовани АО пацови доследно показивали веће вредности оштећења епитела него ДА пацови (**Слика 2Б, В и Г, Графици 4-6**). Ови налази су у складу са претходно објављеним студијама које су показале да хифални облик *C. albicans* олакшава активно продирање ткива кроз ендоцитозу и производњу више ензима, што је у корелацији са повећаним оштећењем епитела (185,186). Такође, овим смо потврдили да је присутност вирулентних облика *C. albicans* у корелацији са оштећењем ткива.

5.3. РАЗЛИКЕ У ИНФЛИТРАЦИЈИ ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ ДА И АО ПАЦОВА

Оштећење епителних ћелија у присуству хифа и кандидализина, пептида повезаног са хифама, покреће путеве одговора на опасност, имунску активацију и ослобађање антимикробних ензима, хемокина и цитокина (187,188). Цитокини које производе оралне епителне ћелије резултирају регрутовањем, диференцијацијом и активацијом имунских ћелија, неутрофила и макрофага као прве линије одбране, а затим и Т ћелије након активације антиген-презентујућим ћелијама. На тај начин се ствара инфламаторни инфилтрат (188).

Резултати спроведеног истраживања су показали да имунокомпетентни и имунокомпромитовани АО пацови имају значајно веће инфламаторне инфилтрате у поређењу са ДА пацовима (**Слика 2 Б, В и Г, Графици 7, 8, 9**). Наши резултати нису у складу са истраживањем Zivanovic *et al.* (146) који су у моделу периапикалних лезија

показали да је већи инфламацијски инфилтрат присутан код DA пацова у односу на АО пацове. Међутим, у периапикалном моделу болести, већа деструкција ткива је била присутна у DA соју, док је у нашем истраживању већа колонизација и веће оштећење било детектовано у АО соју, што нам сугерише да веће оштећење ткива прати већи инфламаторни инфилтрат.

Због своје способности да брзо реагују на присуство патогених организама, неутрофили представљају кључну компоненту неспецифичног имунског одговора (189). Бивају привучени на место инфекције посредством хемокина и цитокина, које ослобађају активирани епителне ћелије. Користећи посебне рецепторе познате као PRRs, неутрофили идентификују присуство гљивичних компоненти на површини *C. albicans*. Након препознавања, неутрофили се везују за *C. albicans*. Овај почетни корак иницира процес фагоцитозе, где неутрофили апсорбују *C. albicans* унутар специјализоване ћелијске коморе назване фагозом. Унутар фагозома, *C. albicans* се суочава с различитим механизмима уништавања, укључујући антимицробне пептиде и ROS. Додатно, неутрофили играју значајну улогу у "хватању" *C. albicans* користећи структуре познате као NETs. NETs су мреже од ДНА и антимицробних пептида које неутрофили избацују како би "ухватили" *C. albicans* и друге патогене. Ове мреже се користе за уништавање различитих морфолошких облика *C. albicans*, спречавање стварања биофилма и спречавање адхезије *C. albicans* за ћелије и површине (83,190–192).

Макрофаги представљају кључни део имунског система и играју значајну улогу у препознавању и елиминацији гљивичне инфекције. Они садрже специјализоване рецепторе на својој површини који омогућавају препознавање и везивање гљивичних ћелија. Када *C. albicans* доспе у макрофаг путем процеса фагоцитозе, макрофаги активирају различите механизме како би уништили ћелије квасца, укључујући употребу ROS и RNS (193). Осим тога, макрофаги играју кључну улогу у процесу антиген презентације. Они обрађују *C. albicans* и презентују фрагменте антигенског материјала на својој површини користећи МНС. Овим презентовањем антигена, макрофаги активирају друге ћелије имунског система, као што су Т-ћелије, које затим доприносе даљој координацији имунског одговора (82,189).

Да бисмо прецизније утврдили која врста имунских ћелија је заступљена у инфламаторном инфилтрату, спровели смо имунохистохемијску анализу ткивних исечака. У свим АО групама откривено је присуство већег броја различитих имунских ћелија, укључујући лимфоците и макрофаге, на шта указује велики број CD45, CD3 и CD68 позитивних ћелија (Слике 3-5, Графици 10-12). Међутим, док је код АО пацова детектован већи број имунских ћелија (Слика 2 Б-Г, Графици 7-9), DA пацови су константно показивали нижи број колонизације (Слика 1А, График 1), посебно у имунокомпетентној групи (DA+*C. albicans*), и смањено оштећење епитела у свим групама, што указује на бољу контролу гљивичне инфекције (Слика 2Б-Г, Графици 4-6). Занимљиво, на основу анализе броја ћелија позитивних на HIS48, приметили смо веће присуство гранулоцита у DA соју (Слика 6, График 13). Урођене имунске реакције путем активности фаголизозома и производње ROS од стране најзаступљенијих гранулоцита, неутрофила, су неопходне за контролу гљивичне инфекције (194). Макрофаги су такође неопходни за неутрализацију гљивичне инфекције интернализацијом и накнадним убијањем *C. albicans*. Међутим, повећан број макрофага у инфламаторним инфилтратима не значи нужно бољу контролу инфекције, пошто је *C. albicans* еволуирала елегантне стратегије за избегавање убијања од стране фагоцита, као што је сузбијање генерисања ROS и изазивање оштећења фагозома

формирањем хифа (185,194). Mirkov *et al.* (147) су показали да АО пацови имају мањи прилив укупних леукоцита и неутрофила у поређењу са ДА пацовима у анималном моделу плућне аспергилозе, што је у супротности са нашим резултатима. Ово неслагање се може приписати разликама у профилима цитокина имунских ћелија. Познато је да величина инфламаторне инфилтрације утиче на динамику развоја болести, међутим, цитокински профил имунских ћелија има значајнији утицај на ток болести од броја инфилтрираних имунских ћелија.

5.4. РАЗЛИКЕ У АКТИВАЦИЈИ ЦИТОКИНА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ ДА И АО ПАЦОВА

Бројне студије су показале различиту експресију многобројних цитокина стимулираних *C. albicans* у животињским моделима локалне и системске кандидијазе (195–202) или у експериментима на култури имунских ћелија (203–209). Генерално, докази и системских и локалних инфекција сугеришу да је одговор цитокина типа Th1 у корелацији са заштитним ефектима (202). Познато је да ДА и АО пацови испољавају различите Th1/Th17 и Th2 типове имунског одговора (143,144,146,149). ДА пацови претежно развијају Th1 имунски одговор са производњом IFN- γ , док АО сој лако покреће Th2 имунски одговор (10, 13, 25). Сходно томе, даљи ток нашег истраживања се фокусирао на испитивање активације различитих цитокина након индукције оралне кандидијазе кроз испитивање профила експресије гена за цитокине у ткиву језика и концентрације различитих цитокина у системској циркулацији. С обзиром да је познато да је Th1 имунски одговор протективан у неким инфективним и аутоимунским животињским моделима (202), претпоставили смо да исти тип имунског одговора игра заштитну улогу и у одговору на оралну кандидијазу.

Како имунски одговор на гљивични антиген напредује, различити подскупови Т ћелија и друге имунске ћелије производе и луче многобројне цитокине, а затим регрутују и активирају додатне имунске ћелије да помогну у борби против инфекције. Овај процес је праћен порастом експресије специфичних цитокина, на основу подскупа Т ћелија које се активирају; Th1, Th2, Th17 или Treg ћелије (95,188). Равнотежа између ових подскупина Т ћелија је критична за исход инфекције (210). Међутим, до данас, постоји приметно одсуство података о профилима цитокина у оралној кандидијози код ова два инbredна соја пацова било да су у имунокомпетентном или имунокомпромитованом стању.

5.4.1. Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th1 имунски одговор

IFN- γ , TNF- α и IL-1 β су Th1 доминантни цитокини и један су од првих цитокина који се луче, првенствено од стране активираних макрофага и неутрофила, чиме се повећава клиренс *C. albicans* (102,211). Продукција IFN- γ у току оралне кандидијазе најважнија је за стимулацију фагоцитозе, посебно кроз повећање продукције азот оксида у макрофагима, што директно оштећује мембрану *C. albicans*. С друге стране, IFN- γ појачава и активност антиген презентујућих ћелија и последичну активацију Th1 одговора (102). У нашој студији, релативна експресија IFN- γ била је статистички значајно већа у свим групама соја ДА

(DA+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* групе) у поређењу са групама АО соја (АО+C. *albicans*, АО+Tet+C. *albicans* и АО+Dex+Tet+C. *albicans* групе) (Табела 20, График 16). Овај налаз је донекле очекиван, јер је сој DA познат по свом доминантном Th1/Th17 имунском одговору на различите патогене, док су имунски одговори код АО соја обично повезани са повећаном активношћу Th2 подгрупа (143,144,146,149).

Велики број инфламаторних стимулуса, инфекција и стреса доводе до производње TNF- α . Њега првенствено производе фагоцитне ћелије урођене имуности као што су макрофаги и неутрофили, али могу да их продукују и Т лимфоцити. TNF- α представља значајан фактор стимулације дегранулације неутрофила и отпуштања ROS (103). Стимулација ових ћелија са TNF- α такође индукује фагоцитозу и додатну продукцију хемокина који промовишу акумулацију макрофага на месту запаљења (104). С друге стране, IL-1 β у реакцијама на *C. albicans* има улогу да стимулише производњу других цитокина попут TNF- α и IL-6 (100). Такође, IL-1 β стимулише експресију адхезионих молекула у ендотелним ћелијама појачавајући хемотаксу леукоцита, а у садејству са IL-18, IL-1 β усмерава активацију и диференцијацију других Th ћелија, посебно Th17 (99,101). Садејством IL-1 β и TNF- α , стимулише се продукција IL-8, чиме ови цитокини заједнички усмеравају хемотаксу неутрофила (103). Резултати нашег истраживања показали су да имунокомпетентни DA пацови (DA+C. *albicans* група) имају значајно већу релативну експресију TNF- α (Табела 19, График 15) и IL-1 β (Табела 18, График 14) у поређењу са имунокомпетентним АО пацовима (АО + *C. albicans* група). Приказани резултати сугеришу да DA пацови имају снажнији урођени имунски одговор, што може побољшати њихову способност да очисте гљивичну инфекцију. Међутим, када су и DA и АО пацови претходно третираны антибиотикима (DA+Tet+C. *albicans* и АО+Tet+C. *albicans* групе), разлика у експресији TNF- α (Табела 19, график 15) између ова два соја више није била статистички значајна, док је релативна експресија IL-1 β остала значајно виша код DA пацова (Табела 18, график 14). Добијени резултат имплицира да је ефекат антибиотика на имунски систем можда смањено разлику у експресији TNF- α између два соја, али је имао мањи утицај на експресију IL-1 β . Заиста, претходне студије на леку изведеном из тетрациклина, доксициклина, откриле су да он може да поремети експресију TNF- α , али да не показује значајне ефекте на IL-1 β (212–214). Занимљиво, када су и DA и АО пацови били имунокомпромитовани додатком кортикостероида (DA+Dex+Tet+C. *albicans* и АО+Dex+Tet+C. *albicans* групе), DA пацови су показали статистички значајну већу релативну експресију TNF- α у поређењу са АО пацовима, док релативна експресија IL-1 β није показала статистички значајну разлику између сојева. Резултат нашег истраживања сугерише да разлике у експресији TNF- α између два соја могу бити још израженије када је имунски систем угрожен.

5.4.2. Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th2 имунски одговор

Активирањем дендритских ћелија и њиховим лучењем IL-4 долази до покретања имунског одговора посредованог Th2 ћелијама. Активирани Th2 ћелије луче различите цитокине, од којих је најзначајнији IL-4, али и IL-10 (89). Ови цитокини имају првенствено имунорегулаторно дејство, а њихова главна улога је контрола проинфламаторних механизма како би спречили прекомерну деструкцију ткива и иницирање аутоимунских

процеса (112,113). Значајно је напоменути да већина претходних студија показује да Th2 одговор може ослабити ефикасност имунског одговора на *C. albicans* и инхибирати протективне ефекте Th1 одговора (80). Такође је показано да прекомерно присуство IL-4 и Th2 ћелија доводи до несразмерног запаљења и слабљења одбрамбених способности организма (46). Међутим, поједине студије сугеришу да IL-4 такође може имати и позитивне ефекте у одговору на оралну кандидијазу (89), кроз стимулацију производње специфичних антитела на *C. albicans* (110). Слично, двојни ефекти су показани и за активност IL-10 у инфекцијама *C. albicans*. Претходним истраживањем других аутора, показана је позитивна корелација повишене серумске вредности IL-10 и повећане учесталости оралне кандидијазе (115). С друге стране, показано је да IL-10 може утицати на развој Th17 одговора, који је значајан у мукозној одбрани од патогена (89).

Занимљиво је да наши подаци нису открили статистичку разлику између имунокомпетентних DA и АО пацова (DA+C. *albicans* у односу на АО+C. *albicans* групу) у релативној експресији IL-4. Међутим, статистички значајно већа релативна експресија IL-4 била је присутна код DA пацова када су имунокомпромитовани, било са антибиотцима или кортикостероидима (DA+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* групе) (**Табела 22. График 18.**). Резултати бројних студија указали су на значајну улогу IL-4 као регулаторног цитокина за инфламаторни пут посредован цитокинима Th1 типа и да је његово присуство у циљном органу довољно да смањи аутореактивне клонове Th1 лимфоцита (215–217). Поједина истраживања су чак показала да се одређени клонови Т-ћелија могу подстаћи да истовремено продукују IFN- γ и IL-4, добијајући карактеристике и Th1 и Th2 ћелија (218). Поред тога, Т ћелије које истовремено продукују хумани IFN- γ и IL-4 могу се брзо индуковати из Th1 ефекторских меморијских ћелија са IL-4, док претходно ангажоване Th1 централне меморијске ћелије могу чак генерисати верне Th2 ћелије које производе само IL-4 (219).

Наше истраживање је открило да су DA пацови (DA+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans* и DA+Dex+Tet+C. *albicans* групе) имали статистички већу релативну експресију IL-10 у поређењу са одговарајућим групама АО пацова (АО+C. *albicans*, АО+Tet+C. *albicans* и АО+Dex+Tet+C. *albicans* групе) (**Табела 23, График 19**). Познато је да IL-10, испољавањем антиинфламаторних ефеката, игра улогу имуномодулаторног цитокина како у урођеном тако и у адаптивном имунском одговору. Такође је познато да IL-10 могу лучити бројне имунске ћелије, првенствено Treg ћелије (220). Поред тога, резултати истраживања су показали да се Th1 ћелије претварају у Foxp3+ регулаторне Т ћелије након интеракције PD1/PD1L (221), када Th1 ћелије могу да стекну регулаторне функције и почну да производе антиинфламаторни цитокин IL-10, поред IFN- γ (222,223). Током различитих инфекција, CD4+ позитивне ћелије производе IFN- γ , али и IL-10. Недавне студије су показале да IL-10 синтетисан и секретован од стране Th1 ћелија помаже у ограничавању колатералног оштећења изазваног прекомерном инфламацијом (220).

5.4.3. Разлике у ткивној експресији гена за цитокине укључене у Th17 имунски одговор

Th17 ћелије су подскуп CD4⁺ Т ћелија чија диференцијација зависи од TGF- β и IL-6, а значајне су због продукције цитокина IL-17A, IL-17F и IL-22 (91). Поседују веома значајне улоге у одбрани од гљивица у мукозном ткиву, првенствено што производњом IL-17 подстичу епителне ћелије и кератиноците да луче антимикробне пептиде (хистатине и дефензине) који директно уништавају ћелије *C. albicans*. Такође, учествују у регрутовању и активацији неутрофила и помажу у одржавању интегритета мукозне баријере за спречавање ширења инфекције (92). Додатно, показано је да IL-17 може да стимулише пљувачне жлезде на лучење хистатина (119). У нашем истраживању, показана је статистички значајно већа релативна експресија гена за IL-17 у DA+C. *albicans* у односу на AO+C. *albicans* групу, али не и између имунокомпромитованих DA и AO сојева пацова (DA+Tet+C. *albicans* у односу на AO+Tet+C. *albicans* групу и DA+Dex+Tet+C. *albicans* у односу на AO+Dex+Tet+C. *albicans* групу) (Табела 24, График 20). Свакако, већа експресија у DA соју била је очекивана, обзиром на познати доминантни Th1/Th17 имунски одговор у овом соју (146), али и одсуство разлике у имунокомпромитованом стању због утицаја антибиотика и кортикостероида на имунски систем организма (212–214).

Занимљив је податак да Th1 ћелије могу да трансдиферентују у друге подгрупе Th лимфоцита у присуству специфичних цитокина. Недавна студија указује да као одговор на TGF- β , Th1 ћелије појачавају регулацију Runk1, што заузврат може индуковати производњу IL-17 посредством једног од наведених механизма: директно везивањем за промотор IL-17 или индиректно, путем индукције (ROR)- γ t (121). Надовезујући се на наше претходне резултате који су јасно показали доминантан и робустан Th1 одговор код DA пацова, даљи ток истраживања смо фокусирали на процену нивоа секреције TGF- β и потенцијала овог цитокина да уведе трансдиференцијацију Th1 ћелија према фенотипу Th17. Резултати нашег истраживања су показали да је релативна експресија TGF- β 1 већа у DA+C. *albicans*, DA+Tet+C. *albicans*, а у DA+Dex+Tet+C. *albicans* групе, у односу на њихове AO групе (Табела 25, График 21). Поред тога, претходна студија је показала да сам TGF- β промовише експресију фактора транскрипције лозе Th17 ћелија, ROR- γ t (енг. *rar-related orphan receptor gamma*) (224). С обзиром да смо показали да DA пацови имају статистички значајно више нивое TGF- β , може се претпоставити да је овај цитокин заиста утицао на производњу IL-17, главног цитокина Th17 одговора. Овај податак подржава претпоставку да су DA пацови реаговали претежно Th1/Th17 имунским одговором након инфекције са *C. albicans*, потенцијално објашњавајући зашто су DA пацови показали блажу клиничку слику у нашој студији.

5.4.4. Разлике у серумској концентрацији цитокина

Да би даље потврдили доминантну активацију Th1 имуноског одговора у DA соју у односу на AO сој, спроведена је анализа концентрација цитокина у серуму применом ELISA теста.

Претходним истраживањем других аутора показано је да локална инфекција *C. albicans* може довести до повећања серумских концентрација цитокина попут IFN- γ , TNF- α и IL-4 у људи (225,226), што је у складу са приказаним резултатима нашег истраживања (Табеле 27 и 28, Графици 23 и 24). Додатно, нашим истраживањем утврђене су статистички значајно веће концентрације IFN- γ и TNF- α у DA+C. *albicans* групи у односу на AO+C.

albicans групу, што додатно говори у прилог доминантном Th1/Th17 имунском одговору у DA соју како је претходно потврђено анализом релативне експресије ових гена у инфицираном локалном ткиву. Међутим, индукција оралне кандидијазе експерименталним моделима који су укључили примену антибиотика и кортикостероида утицала је на односе серумских концентрација између DA и АО соја пацова. Наиме, у вредностима серумске концентрације IFN- γ (Табела 27, График 23) није било разлике између имунокомпромитованих група DA и АО пацова (DA+Tet+C. *albicans* у односу на АО+Tet+C. *albicans* групу и DA+Dex+Tet+C. *albicans* у односу на АО+Dex+Tet+C. *albicans* групу), док је серумска концентрација TNF- α била већа у АО+Tet+C. *albicans* групи у односу на DA+Tet+C. *albicans* групу (Табела 28, График 24). Овакав резултат имплицира могуће ефекте антибиотика на серумске концентрације, који могу бити и различити међу сојевима. Ово донекле потврђују и претходно споменуте студије, где је показано да доксициклин, дериват тетрациклина, ремети експресију TNF- α , али не и других цитокина (212–214).

Интересантан је податак да у претходним истраживањима (225,226), локална колонизација *C. albicans* није утицала на серумске концентрације IL-10, што је делимично у супротности са резултатима нашег истраживања. У нашем истраживању, орална инфекција *C. albicans* довела је до повећања серумских концентрација IL-10, а ове вредности су биле статистички значајно веће у DA+C. *albicans* групи у односу на АО+C. *albicans* групу (Табела 29, График 25), што је у сагласности са резултатима експресије гена за IL-10 добијених qRT-PCR анализом (Табела 23, График 19). IL-6 је још један проинфламаторни цитокин који је повезан са раним Th1 одговором на инфекцију *C. albicans* и чија повећана концентрација може да се детектује у серуму оболелих експерименталних животиња. Kovács *et al.* (227) су показали да је степен колонизације животиња *C. albicans* у позитивној корелацији са серумским концентрацијама IL-6, али само у првим данима од инфекције, док у наставку инфекције није показана корелација без обзира на пораст и степен колонизације и концентрације цитокина. У нашем истраживању, орална инфекција пацова *C. albicans* довела је до пораста серумских концентрација IL-6 у оба соја у односу на контролу, али нису постојале статистички значајне разлике између њих (Табела 28, График 24). Овај резултат се разликовао од резултата добијених qRT-PCR анализом, где је постојала разлика између DA+C. *albicans* и АО+C. *albicans* група (Табела 21, График 17). Међутим, како различите регулаторне мреже и фактори утичу на експресију гена и серумске концентрације одређеног цитокина, могу се очекивати разлике у резултатима добијеним различитим методама мерења.

5.5. РАЗЛИКЕ У ПАРАМЕТРИМА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У РАЗЛИЧИТИМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ МОДЕЛИМА ОРАЛНЕ КАНДИДИЈАЗЕ ИЗМЕЂУ DA И АО ПАЦОВА

Познато је да се елиминација гљивичне инфекције првенствено ослања на активност фагоцитних ћелија, што зависи од њихове способности да производе и лаче ROS током оксидативног праска (14,123,194). Међутим, када постоји неуравнотеженост између лачења ROS-а и способности тела да их детоксикује употребом антиоксидативних система, може доћи до оксидативног стреса, што даље води до оштећења и дисфункције ћелија (129).

Оштећење слузокоже усне дупље може активирати оксидативне механизме у циљу борбе против инфекција и оштећења, али ако се ови механизми неконтролисано шире, могу изазвати оштећење околних ткива и потенцијално проузроковати системски оксидативни стрес. (129,130). С обзиром да су оксидативни системи саставни део елиминације *C. albicans*, анализирали смо разлике у системским маркерима оксидативног стреса у узорцима крви ДА и АО пацова.

Резултати нашег истраживања открили су статистички значајно веће вредности прооксидативних маркера, H_2O_2 (Табела 30, График 26) и TBARS (Табела 33, График 29), код АО пацова у поређењу са ДА пацовима, како у имунокомпетентним тако и у имунокомпромитованим условима (ДА+*C. albicans* у односу на АО+*C. albicans* групу, ДА+Tet+*C. albicans* у односу на АО+Tet+*C. albicans* групу, ДА+Dex+Tet+*C. albicans* у односу на АО+Dex+Tet+*C. albicans* групу). Додатно, АО пацови имунокомпромитовани употребом кортикостероида (АО+Dex+Tet+*C. albicans* група) имали су значајно више нивое NO_2^- (Табела 32, График 28) у поређењу са ДА пацовима (ДА+Dex+Tet+*C. albicans* група).

Већи степен оштећења епитела који је детектован код АО соја у нашој студији могао би бити подржан присуством нерегулисаног лучења ROS, пошто је ранијим истраживањима других аутора показано да је неадекватна активност антиоксидантног система у корелацији са патогенозом већине оралних лезија (129,228). Већина антиоксидативних маркера није показала статистичку разлику између два соја са изузетком АО+Tet+*C. albicans* групе где су забележене статистички значајно веће вредности SOD (Табела 35, График 31) и GSH (Табела 36, График 32) у поређењу са ДА+Tet+*C. albicans* групом. Могло би се претпоставити да је употреба антибиотика утицала или на имунски одговор или на неутрализацију ROS, што је довело до повећања производње антиоксидативних ензима попут SOD и GSH да би се супротставили ефектима ROS и спречили даља оштећења (229).

ЗАКЉУЧАК



6. ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних резултата доноси се закључак да постоје разлике између Dark Agouti (DA) и Albino Oxford (АО) пацова у индукцији, прогресији и типу имунског одговора на оралну кандидијазу изазвану различитим експерименталним моделима. Разлике у имунском одговору између DA и АО сојева пацова могу се приписати генетским варијацијама које утичу на експресију или функцију молекула повезаних са имунитетом. Орална инфекција *C. albicans* била је израженија код АО соја у поређењу са DA сојем као последица присуства робусног Th1/Th17 имунског одговора код DA пацова.

На основу анализе добијених резултата ове студије изведени су следећи закључци:

1. Постоји разлика у вредностима степена колонизације ткива *C. albicans* између DA и АО соја пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Индукција оралне кандидијазе у имунокомпетентним DA пацовима резултује мањим вредностима колонизације различитим морфолошким облицима *C. albicans* у односу на АО сој.
2. Постоји разлика у вредностима степена оштећења ткива и инфламаторне инфилтрације између DA и АО соја пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Индукција оралне кандидијазе у имунокомпетентним и имунокомпромитованим DA пацовима резултује мањим оштећењем ткива и мањом величином инфламаторног инфилтрата у односу на АО сој.
3. Постоји разлика у фенотипским карактеристикама имунских ћелија инфламаторних инфилтрата између DA и АО соја пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Индукција оралне кандидијазе резултовала је мањим бројем макрофага и лимфоцита, а већим бројем гранулоцита у DA соју, у односу на АО сој пацова у имунокомпетентним и имунокомпромитованим стањима.
4. Постоји разлика у ткивној експресији гена за цитокине и серумским концентрацијама цитокина између DA и АО соја пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Индукција оралне кандидијазе у имунокомпетентним DA пацовима резултује већом заступљеношћу Th1/Th17 одговора у односу АО сој што је потврђено анализом експресије гена за цитокине и серумских концентрација цитокина. Индукција оралне кандидијазе у имунокомпромитованом стању мења однос проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина између DA и АО сојева пацова.
5. Постоји разлика у системским маркерима оксидативног стреса између DA и АО соја пацова у различитим експерименталним моделима оралне кандидијазе. Индукција оралне кандидијазе у имунокомпетентним и имунокомпромитованим DA пацовима резултује мањим вредностима прооксидативних маркера, H_2O_2 , NO_2^- и TBARS, у односу на АО сој.

Разумевање ових разлика може помоћи у идентификацији потенцијалних терапијских циљева за лечење оралне кандидијазе. Поред тога, ова студија наглашава важност разматрања имунокомпромитованог стања домаћина када се истражују интеракције домаћин и патогена. Имунокомпромитовани појединци, као што су они који су подвргнути хемотерапији или трансплантацији органа, посебно су подложни гљивичним инфекцијама и могу захтевати алтернативне стратегије лечења.



7. ЛИТЕРАТУРА

1. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol.* 2011;3.
2. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014;18:S81-5.
3. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. *StatPearls.* 2023.
4. Radunovic M, Barac M, Kuzmanovic P, Pficer J, Pavlica D, Jovanovic A, Pucar A, Petrovic S. Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Tongue and Subgingival Biofilm of Periodontitis Patients. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2022;11.
5. Jacobsen ID. The Role of Host and Fungal Factors in the Commensal-to-Pathogen Transition of *Candida albicans*. *Curr Clin Microbiol reports.* 2023;10:55–65.
6. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2021;7.
7. Bedair AA, Darwazeh AMG, Al-Aboosi MM. Oral *Candida* colonization and candidiasis in patients with psoriasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114:610–5.
8. Bianchi CMP de C, Bianchi HA, Tadano T, Paula CR de, Hoffmann-Santos HD, Leite DP, Hahn RC. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58:17.
9. Mundula T, Ricci F, Barbetta B, Baccini M, Amedei A. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2019;11.
10. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1998;1:95–106.
11. Gale CA, Berman J. Cell Cycle and Growth Control in *Candida* Species. In: *Candida and Candidiasis.* Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 101–24.
12. Munro C, Richard ML. The Cell Wall: Glycoproteins, Remodeling, and Regulation. In: *Candida and Candidiasis.* Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 195–223.
13. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front Immunol.* 2017;8:629.
14. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4:119–28.
15. Su C, Yu J, Lu Y. Hyphal development in *Candida albicans* from different cell states. *Curr Genet.* 2018;64:1239–43.
16. Braun BR, Kadosh D, Johnson AD. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J.* 2001;20:4753–61.

17. Braun BR, Head WS, Wang MX, Johnson AD. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*. 2000;156:31–44.
18. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997;90:939–49.
19. Murad AM, D’Enfert C, Gaillardin C, Tourneau H, Tekaia F, Talibi D, Marechal D, Marchais V, Cottin J, Brown AJ. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*. 2001;42:981–93.
20. Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet*. 2010;42:590–8.
21. Saville SP, Lazzell AL, Chaturvedi AK, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect Immun*. 2008;76:97–102.
22. Spiering MJ, Moran GP, Chauvel M, Maccallum DM, Higgins J, Hokamp K, Yeomans T, D’Enfert C, Coleman DC, Sullivan DJ. Comparative transcript profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* identifies SFL2, a *C. albicans* gene required for virulence in a reconstituted epithelial infection model. *Eukaryot Cell*. 2010;9:251–65.
23. Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*. 2005;7:1546–54.
24. Gow NAR, Brown AJP, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:366–71.
25. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*. 2003;2:1053–60.
26. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10:85–93.
27. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:417–22.
28. Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2010;12:273–82.
29. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4:119–28.
30. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71:348–76.
31. d’Enfert C, Kaune A-K, Alaban L-R, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, Kosmala D,

- Marsaux B, Fróis-Martins R, Morelli M, Rosati D, Valentine M, Xie Z, Emritloll Y, Warn PA, Bequet F, Bougnoux M-E, Bornes S, Gresnigt MS, Hube B, Jacobsen ID, Legrand M, Leibundgut-Landmann S, Manichanh C, Munro CA, Netea MG, Queiroz K, Roget K, Thomas V, Thorat C, Van den Abbeele P, Walker AW, Brown AJP. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2021;45.
32. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence.* 2015;6:338–46.
 33. Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, Wilson D, Hube B. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012;7:e36952.
 34. Desai J V. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. *J fungi* (Basel, Switzerland). 2018;4.
 35. Nikou S-A, Kichik N, Brown R, Ponde NO, Ho J, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. *Pathog* (Basel, Switzerland). 2019;8.
 36. Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2011;13:963–76.
 37. Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petraitis V, Walsh TJ. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clin Infect Dis.* 2015;61 Suppl 6:S618-21.
 38. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.* 2021;131:11–22.
 39. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* 2016;74:ftw018.
 40. Mallick EM, Bennett RJ. Sensing of the microbial neighborhood by *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003661.
 41. Davies JM, Stacey AJ, Gilligan CA. *Candida albicans* hyphal invasion: thigmotropism or chemotropism? *FEMS Microbiol Lett.* 1999;171:245–9.
 42. Bu Q-R, Bao M-Y, Yang Y, Wang T-M, Wang C-Z. Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. *Foods* (Basel, Switzerland). 2022;11.
 43. Okai B, Lyall N, Gow NAR, Bain JM, Erwig L-P. Rab14 regulates maturation of macrophage phagosomes containing the fungal pathogen *Candida albicans* and outcome of the host-pathogen interaction. *Infect Immun.* 2015;83:1523–35.
 44. O’Meara TR, Veri AO, Ketela T, Jiang B, Roemer T, Cowen LE. Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. *Nat Commun.* 2015;6:6741.
 45. Kasper L, König A, Koenig P-A, Gresnigt MS, Westman J, Drummond RA, Lionakis MS, Groß O, Ruland J, Naglik JR, Hube B. The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. *Nat Commun.*

- 2018;9:4260.
46. Netea MG, Joosten LAB, Van Der Meer JWM, Kullberg BJ, Van De Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:630–42.
 47. Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, Buckley RH. Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med.* 1981;71:59–66.
 48. Alonso-Monge R, Navarro-García F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, Pla J. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2003;2:351–61.
 49. Rodrigues-Pousada C, Devaux F, Caetano SM, Pimentel C, da Silva S, Cordeiro AC, Amaral C. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microb cell (Graz, Austria).* 2019;6:267–85.
 50. Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FAR, Selway L, Peck SC, Brown AJP. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2011;48:297–305.
 51. da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:111–8.
 52. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019;13:25–32.
 53. McCullough MJ, Savage NW. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Aust Dent J.* 2005;50:S36-9.
 54. Gabler IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2008;16:247–50.
 55. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2020;6.
 56. Tan CT, Xu X, Qiao Y, Wang Y. Author Correction: A peptidoglycan storm caused by β -lactam antibiotic's action on host microbiota drives *Candida albicans* infection. *Nat Commun.* 2021;12:3510.
 57. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022;13:89–121.
 58. Yamaguchi M, Katsuno T, Iwagaitsu S, Nobata H, Kinashi H, Banno S, Ito Y. Oral candidiasis is a significant predictor of subsequent severe infections during immunosuppressive therapy in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *BMC Infect Dis.* 2019;19:664.
 59. Aboualigalehdari E, Tahmasebi Birgani M, Fatahinia M, Hosseinzadeh M. Oral colonization by *Candida* species and associated factors in HIV-infected patients in Ahvaz, southwest Iran. *Epidemiol Health.* 2020;42:e2020033.

60. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med.* 2006;23:455–9.
61. Sampath A, Weerasekera M, Dilhari A, Gunasekara C, Bulugahapitiya U, Fernando N, Samaranayake L. Type 2 diabetes mellitus and oral *Candida* colonization: Analysis of risk factors in a Sri Lankan cohort. *Acta Odontol Scand.* 2019;77:508–16.
62. Bertolini M, Ranjan A, Thompson A, Diaz PI, Sobue T, Maas K, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog.* 2019;15:e1007717.
63. Vainionpää A, Tuomi J, Kantola S, Anttonen V. Neonatal thrush of newborns: Oral candidiasis? *Clin Exp Dent Res.* 2019;5:580–2.
64. Al-Rusan RM, Darwazeh AMG, Lataifeh IM. The relationship of *Candida* colonization of the oral and vaginal mucosae of mothers and oral mucosae of their newborns at birth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2017;123:459–63.
65. Weerasuriya N, Snape J. Oesophageal candidiasis in elderly patients: risk factors, prevention and management. *Drugs Aging.* 2008;25:119–30.
66. Buranarom N, Komin O, Matangkasombut O. Hyposalivation, oral health, and *Candida* colonization in independent dentate elders. *PLoS One.* 2020;15:e0242832.
67. Lu S-Y. Perception of iron deficiency from oral mucosa alterations that show a high prevalence of *Candida* infection. *J Formos Med Assoc.* 2016;115:619–27.
68. Bett JVS, Batistella EA, Melo G, Munhoz E de A, Silva CAB, Guerra EN da S, Porporatti AL, De Luca Canto G. Prevalence of oral mucosal disorders during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2019;48:270–7.
69. Cox DP, Ferreira L. The Oral Effects of Inhalation Corticosteroid Therapy: An Update. *J Calif Dent Assoc.* 2017;45:227–33.
70. Tarapan S, Matangkasombut O, Trachootham D, Sattabanasuk V, Talungchit S, Paemuang W, Phonyiam T, Chokchaitam O, Mungkung O-O, Lam-Ubol A. Oral *Candida* colonization in xerostomic postradiotherapy head and neck cancer patients. *Oral Dis.* 2019;25:1798–808.
71. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20:251–60.
72. Molek M, Florenly F, Lister INE, Wahab TA, Lister C, Fioni F. Xerostomia and hyposalivation in association with oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Evid Based Dent.* 2022;Online Fir.
73. Osman M, Papon N. Smoking-aggravated oral candidiasis: Nrf2 pathway dampens NLRP3 inflammasome. *J Cell Mol Med.* 2021;25:9473–5.
74. Gacon I, Loster JE, Wieczorek A. Relationship between oral hygiene and fungal growth in patients: users of an acrylic denture without signs of inflammatory process. *Clin Interv Aging.* 2019;14:1297–302.

75. Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res.* 2005;84:966–77.
76. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res.* 2016;95:365–71.
77. Gorr S-U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000.* 2009;51:152–80.
78. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010;12:518–27.
79. Weindl G, Wagener J, Schaller M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res.* 2010;89:666–75.
80. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence.* 2015;6:327–37.
81. Swidergall M, LeibundGut-Landmann S. Immunosurveillance of *Candida albicans* commensalism by the adaptive immune system. *Mucosal Immunol.* 2022;15:829–36.
82. Zhou Y, Cheng L, Lei YL, Ren B, Zhou X. The Interactions Between *Candida albicans* and Mucosal Immunity. *Front Microbiol.* 2021;12.
83. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8:668–76.
84. Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:363–7.
85. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leukoc Biol.* 2000;68:175–9.
86. Brummer E, Stevens DA. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol.* 1995;102:65–70.
87. Sugar AM, Picard M, Wagner R, Kornfeld H. Interactions between human bronchoalveolar macrophages and *Blastomyces dermatitidis* conidia: demonstration of fungicidal and fungistatic effects. *J Infect Dis.* 1995;171:1559–62.
88. Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity.* 2013;39:697–710.
89. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2020;130:110550.
90. Winters MS, Chan Q, Caruso JA, Deepe GS. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *J Infect Dis.* 2010;202:1136–45.
91. Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev.* 2013;252:78–88.

92. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi*. 2020;6:1–28.
93. Conti HR, Gaffen SL. IL-17–Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *J Immunol*. 2015;195:780–8.
94. Rajendeeran A, Tenbrock K. Regulatory T cell function in autoimmune disease. *J Transl Autoimmun*. 2021;4:100130.
95. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2015;6:327–37.
96. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020;11:582779.
97. Hans M, Madaan Hans V. Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity. *Int J Pept*. 2014;2014:370297.
98. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, Fitzgerald KA. An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009;5:487–97.
99. Camilli G, Griffiths JS, Ho J, Richardson JP, Naglik JR. Some like it hot: *Candida* activation of inflammasomes. Jabra-Rizk MA, editor. *PLOS Pathog*. 2020;16:e1008975.
100. DeRijk R, Michelson D, Karp B, Petrides J, Galliven E, Deuster P, Paciotti G, Gold PW, Sternberg EM. Exercise and Circadian Rhythm-Induced Variations in Plasma Cortisol Differentially Regulate Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) Production in Humans: High Sensitivity of TNF α and Resistance of IL-6. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:2182–91.
101. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*. 2011;32:110–6.
102. Saunus JM, Kazoullis A, Farah CS. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. *Front Biosci*. 2008;13:5345–58.
103. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod*. 2017;43:1033–51.
104. Farah CS, Gotjamanos T, Seymour GJ, Ashman RB. Cytokines in the oral mucosa of mice infected with *Candida albicans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:375–8.
105. Allendoerfer R, Magee DM, Smith JG, Bonewald L, Graybill JR. Induction of tumor necrosis factor-alpha in murine *Candida albicans* infection. *J Infect Dis*. 1993;167:1168–72.
106. Steinshamn S, Waage A. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun*. 1992;60:4003–8.
107. Park H, Solis N V, Louie JS, Spellberg B, Rodriguez N, Filler SG. Different tumor necrosis factor α antagonists have different effects on host susceptibility to disseminated and oropharyngeal candidiasis in mice. *Virulence*. 2014;5:625–9.

108. Hirsch V, Wolgin M, Mitronin A V., Kielbassa AM. Inflammatory cytokines in normal and irreversibly inflamed pulps: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017;82:38–46.
109. Tsushima K, Li Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y. IL-6 Signaling in *Candida albicans*-infected Human Gingival Epithelial Cells. *Int J Oral-Medical Sci.* 2011;10:43–9.
110. Guimarães AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 2009;77:1357–67.
111. Mencacci A, Del Sero G, Cenci E, D'Ostiani CF, Bacci A, Montagnoli C, Kopf M, Romani L. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med.* 1998;187:307–17.
112. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, Albini A. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol.* 2023;14:1161067.
113. Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltoglou I, Tsaparidou S, Panteliadis C, Walsh TJ. Suppressive Effects of Interleukin-10 on Human Mononuclear Phagocyte Function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 1998;178:1734–42.
114. Del Sero G. Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect.* 1999;1:1169–80.
115. Halimi A, Mortazavi N, Memarian A, Zahedi M, Niknejad F, Sohrabi A, Sarraf SJ. The relation between serum levels of interleukin 10 and interferon-gamma with oral candidiasis in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Endocr Disord.* 2022;22:296.
116. Aggor FEY, Bertolini M, Zhou C, Taylor TC, Abbott DA, Musgrove J, Bruno VM, Hand TW, Gaffen SL. A gut-oral microbiome-driven axis controls oropharyngeal candidiasis through retinoic acid. *JCI Insight.* 2022;7.
117. Naglik JR, König A, Hube B, Gaffen SL. *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:104–12.
118. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, Filler SG, Masso-Welch P, Edgerton M, Gaffen SL. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med.* 2009;206:299–311.
119. Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B, Edgerton M. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. Noverr MC, editor. *PLOS Pathog.* 2016;12:e1005522.
120. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8:1390–7.
121. Geginat J, Paroni M, Kastirr I, Larghi P, Pagani M, Abrignani S. Reverse plasticity: TGF- β

- and IL-6 induce Th1-to-Th17-cell transdifferentiation in the gut. *Eur J Immunol.* 2016;46:2306–10.
122. Cassone A, Cauda R. Candida and candidiasis in HIV-infected patients: Where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *Aids.* 2012;26:1457–72.
 123. Dantas ADS, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules.* 2015;5:142–65.
 124. Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14327–32.
 125. Huycke MM, Abrams V, Moore DR. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis.* 2002;23:529–36.
 126. Fitzsimmons N, Berry DR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios.* 1994;80:125–33.
 127. Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJP, Kurzai O, Hube B. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One.* 2012;7:e52850.
 128. Brothers KM, Gratacap RL, Barker SE, Newman ZR, Norum A, Wheeler RT. NADPH oxidase-driven phagocyte recruitment controls *Candida albicans* filamentous growth and prevents mortality. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003634.
 129. Ergun S, Troşala ŞC, Warnakulasuriya S, Özel S, Önal AE, Ofluoğlu D, Güven Y, Tanyeri H. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2011;40:286–93.
 130. Lopez O, Bonnefont-Rousselot D, Mollereau M, Olivier R, Montagnier L, Emerit J, Gentilini M, Delattre J. Increased plasma thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) before opportunistic infection symptoms in HIV infected individuals. *Clin Chim Acta.* 1996;247:181–7.
 131. Costa ACBP, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence.* 2013;4:391–9.
 132. Aguirre-Gamboa R, Joosten I, Urbano PCM, van der Molen RG, van Rijssen E, van Cranenbroek B, Oosting M, Smeekens S, Jaeger M, Zorro M, Withoff S, van Herwaarden AE, Sweep FCGJ, Netea RT, Swertz MA, Franke L, Xavier RJ, Joosten LAB, Netea MG, Wijmenga C, Kumar V, Li Y, Koenen HJPM. Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Rep.* 2016;17:2474–87.
 133. Marakalala MJ, Kerrigan AM, Brown GD. Dectin-1: a role in antifungal defense and consequences of genetic polymorphisms in humans. *Mamm Genome.* 2011;22:55–65.
 134. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, Van De Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, Alexander BD, Yang JC, Kremer D, Laird GM, Oosting M, Joosten LAB, Van Der Meer

- JWM, Van Dissel JT, Walsh TJ, Perfect JR, Kullberg BJ, Netea MG. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis.* 2012;205:934–43.
135. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004;8:217–26.
136. Junqueira JC, Da Silva Martins J, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24:877–84.
137. Nett JE, Marchillo K, Spiegel CA, Andes DR. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect Immun.* 2010;78:3650–9.
138. Zhao XJ, McElhaney-Feser GE, Bowen WH, Cole MF, Broedel SE, Cihlar RL. Requirement for the *Candida albicans* FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *Microbiology.* 1996;142 (Pt 9:2509–14.
139. Pérez-Sayáns M, Beiro-Fuentes R, Otero-Rey EM, Chamorro-Petronacci CM, Gándara-Vila P, Somoza-Martín JM, García-García A, Blanco-Carrión A. Efficacy of different formulations of nystatin in an experimental model of oral candidiasis in sialoadenectomized rats. *J Dent Sci.* 2021;16:123–30.
140. Junqueira JC, Colombo CED, Da Silva Martins J, Ito CYK, Carvalho YR, Jorge AOC. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol.* 2005;49:199–207.
141. Mostarica-Stojković M, Petrović M, Lukić ML. Resistance to the induction of EAE in AO rats: its prevention by the pre-treatment with cyclophosphamide or low dose of irradiation. *Clin Exp Immunol.* 1982;50:311–7.
142. Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One.* 2015;10:e0134089.
143. Markovic M, Miljkovic D, Momcilovic M, Popadic D, Miljkovic Z, Savic E, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with TH1 and TH17-inducing cytokine profiles. *Mol Immunol.* 2009;47:141–6.
144. Lukić M, Mostarica-Stojković M, Kostić M, Tucić N, Vukmanović S. Cellular and genetic basis of the strain differences in IL-2 production in rats. *Transplant Proc.* 1987;19:3137–9.
145. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol.* 2011;232:68–74.
146. Zivanovic S, Papic M, Vucicevic T, Miletic Kovacevic M, Jovicic N, Nikolic N, Milasin J, Paunovic V, Trajkovic V, Mitrovic S, Lukic ML, Lukic A, Ljubic B. Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity. *Int Endod J.* 2022;55:64–78.
147. Mirkov I, Demenesku J, Popov Aleksandrov A, Ninkov M, Glamoclija J, Kataranovski D,

- Kataranovski M. Strain differences in the immune mechanisms of resistance of immunocompetent rats to pulmonary aspergillosis. *Immunobiology*. 2015;220:1075–84.
148. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. Boutron I, editor. *PLOS Biol*. 2020;18:e3000411.
149. Mirkov I, El-Muzghi AAM, Djokic J, Ninkov M, Popov Aleksandrov A, Glamoclija J, Kataranovski M. Pulmonary immune responses to aspergillus fumigatus in rats. *Biomed Environ Sci*. 2014;27:684–94.
150. Yao Y, Shi L, Zhang C, Sun H, Wu L. Application of fungal fluorescent staining in oral candidiasis: diagnostic analysis of 228 specimens. *BMC Microbiol*. 2019;19:96.
151. Hosny KM, Sindi AM, Ali S, Alharbi WS, Hajjaj MS, Bukhary HA, Badr MY, Mushtaq RY, Murshid SSA, Almeahady AM, Bakhaidar RB, Alfayez E, Kurakula M. Development, optimization, and evaluation of a nanostructured lipid carrier of sesame oil loaded with miconazole for the treatment of oral candidiasis. *Drug Deliv*. 2022;29:254–62.
152. Junqueira JC, Martins J da S, Faria RL, Colombo CED, Jorge AOC. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24:877–84.
153. Ok M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infections. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:445–52.
154. Mezger M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to infections with *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36:168–77.
155. Chaudhary N, Staab JF, Marr KA. Healthy human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PLoS One*. 2010;5:e9036.
156. Graziutti ML, Rex JH, Cowart RE, Anaissie EJ, Ford A, Savary CA. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response. *J Infect Dis*. 1997;176:1579–83.
157. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24:627–38.
158. Egger M, Hoenigl M, Thompson GR, Carvalho A, Jenks JD. Let's talk about sex characteristics—As a risk factor for invasive fungal diseases. *Mycoses*. 2022;65:599–612.
159. Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE, Filler SG. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. 2007;5:e64.
160. Sun JN, Solis N V, Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, Liu Y, Dongari-Bagtzoglou A, Edgerton M, Filler SG. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001181.
161. Zhu W, Phan QT, Boontheung P, Solis N V, Loo JA, Filler SG. EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal

- infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:14194–9.
162. Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science*. 1998;279:1355–8.
 163. Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol*. 2006;55:1323–7.
 164. Sorgo AG, Heilmann CJ, Brul S, de Koster CG, Klis FM. Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;338:10–7.
 165. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995;63:1993–8.
 166. Dolan JW, Bell AC, Hube B, Schaller M, Warner TF, Balish E. *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. *Med Mycol*. 2004;42:439–47.
 167. Vasilev S, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic LJ. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between dark agouti and albino oxford rats. *Vet Parasitol*. 2009;159:229–31.
 168. Nicholls SM, Benylles A, Shimeld C, Easty DL, Hill TJ. Ocular infection with herpes simplex virus in several strains of rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:3260–7.
 169. Popovic D, Kulas J, Tucovic D, Popov Aleksandrov A, Glamoclija J, Sokovic Bajic S, Tolinacki M, Golic N, Mirkov I. Lung microbiota changes during pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in rats. *Microbes Infect*. 2023;105:186.
 170. Hube B, Hay R, Brasch J, Veraldi S, Schaller M. Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. *J Mycol Med*. 2015;25:e44-58.
 171. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007;75:2126–35.
 172. Frank CF, Hostetter MK. Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res*. 2007;149:211–22.
 173. Mayer FL, Wilson D, Jacobsen ID, Miramón P, Große K, Hube B. The novel *Candida albicans* transporter Dur31 is a multi-stage pathogenicity factor. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002592.
 174. Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010;12:248–71.
 175. Nagai Y, Takeshita N, Saku T. Histopathologic and ultrastructural studies of oral mucosa with *Candida* infection. *J Oral Pathol Med*. 1992;21:171–5.
 176. Jepsen A, Winther JE. Mycotic infection in oral leukoplakia. *Acta Odontol Scand*.

- 1965;23:239–56.
177. Cawson RA. Induction of epithelial hyperplasia by *Candida albicans*. *Br J Dermatol*. 1973;89:497–503.
178. Sohnle PG, Kirkpatrick CH. Epidermal proliferation in the defense against experimental cutaneous candidiasis. *J Invest Dermatol*. 1978;70:130–3.
179. Odds F, editor. *Candida and candidosis*. 2nd ed. London, UK: Bailliere Tindal; 1988.
180. Reichart PA, Philipsen HP, Schmidt-Westhausen A, Samaranayake LP. Pseudomembranous oral candidiasis in HIV infection: ultrastructural findings. *J Oral Pathol Med*. 1995;24:276–81.
181. Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol*. 2002;118:652–7.
182. Burgess TB, Condliffe AM, Elks PM. *A Fun-Guide to Innate Immune Responses to Fungal Infections*. *J fungi (Basel, Switzerland)*. 2022;8.
183. Sundstrom P, Balish E, Allen CM. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis*. 2002;185:521–30.
184. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, dos Santos JD, de Barros PP, Prata MC de A, Anbinder AL, Fuchs BB, Jorge AOC, Mylonakis E, Junqueira JC. Competitive Interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during Biofilm Formation and Development of Experimental Candidiasis. *PLoS One*. 2015;10:e0131700.
185. Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Jo DM, Khan MM, Kim YM. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling*. 2021;37:626–55.
186. Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Noverra MC. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun*. 2014;82:532–43.
187. Bojang E, Ghuman H, Kumwenda P, Hall RA. Immune Sensing of *Candida albicans*. *J fungi (Basel, Switzerland)*. 2021;7:119.
188. Gupta SR, Gupta N, Sharma A, Xess I, Singh G, Mani K. The association of *Candida* and antifungal therapy with pro-inflammatory cytokines in oral leukoplakia. *Clin Oral Investig*. 2021;25:6287–96.
189. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:346307.
190. Zawrotniak M, Juszcak M, Rapała-Kozik M. Release of neutrophil extracellular traps in response to *Candida albicans* yeast, as a secondary defense mechanism activated by phagocytosis. *Yeast*. 2023;40:349–59.
191. Smolarz M, Zawrotniak M, Satala D, Rapała-Kozik M. Extracellular Nucleic Acids

- Present in the *Candida albicans* Biofilm Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:681030.
192. Zawrotniak M, Bochenska O, Karkowska-Kuleta J, Seweryn-Ozog K, Aoki W, Ueda M, Kozik A, Rapala-Kozik M. Aspartic Proteases and Major Cell Wall Components in *Candida albicans* Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:414.
193. Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, Beckhouse AG, Lo Y-L-S, Manzanero S, Cobbold C, Schroder K, Ma B, Orr S, Stewart L, Lebus D, Sobieszczuk P, Hume DA, Stow J, Blanchard H, Ashman RB. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2008;180:7404–13.
194. König A, Hube B, Kasper L. The dual function of the fungal toxin candidalysin during *Candida albicans*-macrophage interaction and virulence. *Toxins (Basel).* 2020;12:1–14.
195. Steele C, Ratterree M, Fidel PL. Differential susceptibility of two species of macaques to experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis.* 1999;180:802–10.
196. Romani L, Mocci S, Bietta C, Lanfaloni L, Puccetti P, Bistoni F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. *Infect Immun.* 1991;59:4647–54.
197. Romani L, Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Grohmann U, Puccetti P, Bistoni F. Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. *Infect Immun.* 1992;60:4950–2.
198. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, Bistoni F, Poli V. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med.* 1996;183:1345–55.
199. Romani L, Howard DH. Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr Opin Immunol.* 1995;7:517–23.
200. Saavedra M, Taylor B, Lukacs N, Fidel PL. Local production of chemokines during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun.* 1999;67:5820–6.
201. da Silva EJNL, de Castro RWQ, Nejaim Y, Silva AIV, Haiteir-Neto F, Silberman A, Cohenca N. Evaluation of root canal configuration of maxillary and mandibular anterior teeth using cone beam computed tomography: An in-vivo study. *Quintessence Int.* 2016;47:19–24.
202. de Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A. Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2000;68:3297–304.
203. Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ, Spellberg JP, Edwards JE. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun.* 1996;64:2609–17.
204. Fratti RA, Ghannoum MA, Edwards JE, Filler SG. Gamma interferon protects endothelial

- cells from damage by *Candida albicans* by inhibiting endothelial cell phagocytosis. *Infect Immun.* 1996;64:4714–8.
205. Orozco AS, Zhou X, Filler SG. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. *Infect Immun.* 2000;68:1134–41.
206. Torosantucci A, Chiani P, Quinti I, Ausiello CM, Mezzaroma I, Cassone A. Responsiveness of human polymorphonuclear cells (PMNL) to stimulation by a mannoprotein fraction (MP-F2) of *Candida albicans*; enhanced production of IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by MP-F2-stimulated PMNL from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:451–7.
207. Stevens DA. Combination immunotherapy and antifungal chemotherapy. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1266–9.
208. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68:2464–9.
209. Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Michelsen PB, Bopp LH. Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:96–104.
210. Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun.* 2000;68:5771–7.
211. Chin VK, Foong KJ, Maha A, Rusliza B, Norhafizah M, Chong PP. Early expression of local cytokines during systemic *Candida albicans* infection in a murine intravenous challenge model. *Biomed reports.* 2014;2:869–74.
212. Leite LM, Carvalho AGG, Tavares Ferreira PLF, Pessoa IX, Gonçalves DO, De Araújo Lopes A, Dos Santos Góes JG, De Castro Alves VC, Leal LKAM, Brito GA, Viana GSB. Anti-inflammatory properties of Doxycycline and Minocycline in experimental models: An in vivo and in vitro comparative study. *Inflammopharmacology.* 2011;19:99–110.
213. Di Caprio R, Lembo S, Di Costanzo L, Balato A, Monfrecola G. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:329418.
214. Haritov E. Synergic effects of doxycycline and celecoxib in a pilocarpine model of experimental epilepsy in rats. *Comptes Rendus L'Academie Bulg des Sci.* 2016;69:203–10.
215. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med.* 1996;184:1093–9.
216. Shaw MK, Lorens JB, Dhawan A, DalCanto R, Tse HY, Tran AB, Bonpane C, Eswaran SL, Brocke S, Sarvetnick N, Steinman L, Nolan GP, Fathman CG. Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997;185:1711–4.

217. Falcone M, Bloom BR. A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997;185:901–7.
218. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148:2142–7.
219. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med.* 2004;200:725–35.
220. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007;204:239–43.
221. Amarnath S, Mangus CW, Wang JCM, Wei F, He A, Kapoor V, Foley JE, Massey PR, Felizardo TC, Riley JL, Levine BL, June CH, Medin JA, Fowler DH. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2011;3:111ra120.
222. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007;204:273–83.
223. Häringer B, Lozza L, Steckel B, Geginat J. Identification and characterization of IL-10/IFN-gamma-producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med.* 2009;206:1009–17.
224. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 2007;110:2983–90.
225. Koziol-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles J, Bogut A, Buczynski K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest.* 2006;35:167–79.
226. Naderi N, Etaati Z, Rezvani Joibari M, Sobhani SA, Hosseni Tashnizi S. Immune deviation in recurrent vulvovaginal candidiasis: correlation with iron deficiency anemia. *Iran J Immunol.* 2013;10:118–26.
227. Kovács R, Czudar A, Horváth L, Szakács L, Majoros L, Kónya J. Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014;61:61–9.
228. Sardaro N, della Vella F, Incalza MA, Stasio DDI, Lucchese A, Contaldo M, Laudadio C, Petruzzi M. Oxidative stress and oral mucosal diseases: An overview. *In Vivo (Brooklyn).* 2019;33:289–96.
229. Clemens DL, Duryee MJ, Hall JH, Thiele GM, Mikuls TR, Klassen LW, Zimmerman MC, Anderson DR. Relevance of the antioxidant properties of methotrexate and doxycycline to their treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2020;205:107413.

СКРАЋЕНИЦЕ

Als	секвенца слична аглутинину (енг. <i>agglutinin-like sequences</i>)
АО	Albino Oxford
ARRIVE	истраживања на животињама и извештавање експеримената <i>in vivo</i> (енг. <i>animal research: reporting in vivo experiments</i>)
BSA	албумин телећег серума (енг. <i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	циклични аденозин монофосфат (енг. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
Cap1	транскрипциони фактор сличан AP1 у <i>C. albicans</i> (енг. <i>C. albicans AP1-like transcription factor</i>)
CAT	каталазе (енг. <i>catalase</i>)
CCL5	хемокински лиганд (енг. <i>chemokine ligand</i>)
CD	кластер диференцијације (енг. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина (енг. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CLRs	лектински рецептори C-типа (енг. <i>C-type lectin receptors</i>)
DA	Dark Agouti
DC-SIGN	неинтегрин који хвата међућелијски адхезиони молекул 3 специфичан за дендритске ћелије (енг. <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>)
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина (енг. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Eap1	протеин повезан са ETS1 (енг. <i>ETS1-associated protein 1</i>)
ECM	екстрацелуларни матрикс (енг. <i>extracellular matrix</i>)
ECE1	ендотелин-конвертујући ензим 1 (енг. <i>endothelin-converting enzyme 1</i>)
EDTA	етилендиаминететраацетатна киселина (енг. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	рецептор епидермалног фактора раста (енг. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	ензимски повезани имуносорбентни тест (енг. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FFPE	формалином фиксирано и парафином укалупљено (енг. <i>formalin-fixed and paraffin-embedded</i>)
G-CSF	фактор стимулације колоније гранулоцита (енг. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	фактор стимулације колонија гранулоцита-макрофага (енг. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GSH	глутатион (енг. <i>glutathione</i>)
H/E	хематоксилин-еозин
H ₂ O ₂	водоник пероксид
HER2	рецептор људског епидермалног фактора раста 2 (енг. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)

HIV/AIDS	вирус хумане имунодефицијенције/синдром стечене имунодефицијенције (енг. <i>human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome</i>)
Hog1	глицерол високе осмоларности 1 (енг. <i>high osmolarity glycerol 1</i>)
Hsf1	транскрипциони фактор за топлотни стрес 1 (енг. <i>heat shock transcription factor 1</i>)
Hwp	протеин зида хифе (енг. <i>hyphal wall protein</i>)
IFN- γ	интерферон - γ (енг. <i>interferon- γ</i>)
IgA	имуноглобулин А (енг. <i>immunoglobulin A</i>)
IL	интерлеукин (енг. <i>interleukin</i>)
МАРК	митогеном-активирана протеинска киназа (енг. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
МНС	главни комплекс хистокомпатибилности (енг. <i>major histocompatibility complex</i>)
MINCLE	макрофагни индуцибилни К-везујући лектин рецептор (енг. <i>macrophage inducible Ca-dependent lectin receptor</i>)
Mkc1	митогеном-активирана протеин киназа из <i>C. albicans</i> 1 (енг. <i>MAP kinase from C. albicans 1</i>)
mRNA	енг. <i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енг. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NETs	неутрофилне екстрацелуларне замке (енг. <i>neutrophil extracellular traps</i>)
NK	урођено убилачке ћелије (енг. <i>natural killer cells</i>)
NLRs	рецептори слични NOD (енг. <i>nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors</i>)
NO ₂ -	нитрити
NTC	контрола без узорка (енг. <i>no template control</i>)
nTh17	природне Th17 ћелије (енг. <i>natural Th17 cells</i>)
O ₂ ⁻	супероксидни анјон
PAS	периодична киселина по Шифу (енг. <i>periodic acid Schiff</i>)
PBS	фосфатно пуферисани слани раствор (енг. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PKA	протеин киназа А (енг. <i>protein kinase A</i>)
PL	фосфолипаза (енг. <i>phospholipase</i>)
PRRs	рецептори за препознавање патогених образаца (енг. <i>pattern recognition receptors</i>)
qRT-PCR	квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (енг. <i>quantitative real time - polymerase chain reaction</i>)
RAB	протеин повезан са Ras у мозгу (енг. <i>Ras-related protein in brain</i>)
Ras	енг. <i>rat sarcoma</i>
RNA	рибонуклеинска киселина (енг. <i>ribonucleic acid</i>)
RNS	реактивне азотне врсте (енг. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	реактивне кисеоничне врсте (енг. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	обртаја у минути (енг. <i>revolutions per minute</i>)
ROR- γ t	енг. <i>RAR-related orphan receptor -γt</i>

Sap	секреторне аспарагинске протеиназе (енг. <i>secreted aspartyl proteinases</i>)
SD	стандардна девијација (енг. <i>standard deviation</i>)
SOD	супероксид дизмутаза (енг. <i>superoxide dismutase</i>)
TBA in NaOH	тиобарбитуратна киселина у натријум хидроксида (енг. <i>thiobarbituric acid in NaOH</i>)
TBARS	супстанце реактивне на тиобарбитурну киселину (енг. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA	трихлорацетатна киселина (енг. <i>trichloroacetic acid</i>)
TGF- β	трансформишући фактор раста - β (енг. <i>transforming growth factor -β</i>)
Th	помоћничке Т ћелије (енг. <i>T helper cell</i>)
TLRs	рецептори слични Толу (енг. <i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	Фактор некрозе тумора α (енг. <i>tumor necrosis factor- α</i>)
Treg	регулаторне Т ћелије (енг. <i>T-regulatory cell</i>)

БИОГРАФИЈА

Мирјана Папић, рођена је 29.12.1990. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну и средњу школу завршила је у Крагујевцу. Факултет медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2010/2011. године, а 2015. године завршила је Интегрисане академске студије стоматологије са просечном оценом 9,32 и стекла звање доктор стоматологије. Након завршених студија, обавила је обавезан приправнички стаж и положила стручни испит. Од 2016. године добитник је стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије за докторске академске студије. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2015/2016. године, изборно подручје, Истраживања у стоматологији. Специјалистичке студије из гране медицине Превентивна и дечја стоматологија уписала је 2017. године, а завршила је 2023. године чиме је стекла звање специјалисте Превентивне и дечје стоматологије. Од 2016. године запослена је на Факултету медицинских наука у звању сарадника у настави, а од 2023. године у звању асистента за ужу научну област Превентивна и дечја стоматологија.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

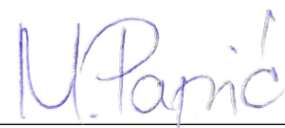
Утицај сојних разлика Dark Agouti и Albino Oxford пацова на патогенезу
експерименталних модела оралне кандидијазе

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, _____, _____ 2023. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Утицај сојних разлика Dark Agouti и Albino Oxford пацова на патогенезу
експерименталних модела оралне кандидијазе

истоветне.

У Крагујевцу, _____ 2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Мирјана Папић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај сојних разлика Dark Agouti и Albino Oxford пацова на патогенезу експерименталних модела оралне кандидијазе

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

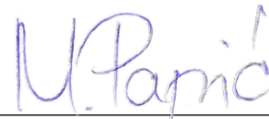
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, _____ 2023. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>