

VILNIAUS UNIVERSITETAS

AUKSĖ ZINKEVIČIENĖ

MIELĖS ATOPINIO DERMATITO ETIOLOGIJOJE

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2012 metai

Disertacija rengta 2006-2012 metais Vilniaus universiteto, Gamtos mokslų fakulteto, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje.

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Turinys

Santrumpos.....	5
ĮVADAS.....	7
Darbo tikslas.....	9
Darbo uždaviniai.....	9
Mokslinis naujumas.....	10
Darbo praktinė reikšmė.....	10
Gynimui pristatomi teiginiai.....	11
Darbo aprobavimas.....	11
Darbo apimtis.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 Atopinio dermatito imuninis mechanizmas.....	12
1.2 Atopinio dermatito išsivystymui turintys įtakos veiksniai.....	15
1.2.1 Genetiniai veiksniai, sąlygojantys atopinio dermatito vystymąsi.....	15
1.2.2 Gyvenimo būdas ir aplinkos veiksniai, turintys įtakos atopinio dermatito vystymuisi.....	16
1.2.3 Odos barjerinės funkcijos sutrikimo svarba atopinio dermatito išsivystymui.....	17
1.2.4 Mikroorganizmų įtaka atopiniam dermatitui.....	19
1.2.4.1 Bakterinės infekcijos.....	19
1.2.4.2 Virusinės infekcijos.....	20
1.2.4.3 Grybinės infekcijos.....	20
1.3 Mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei.....	20
1.3.1 <i>Malassezia</i> genties mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei.....	21
1.3.1.1 <i>Malassezia</i> mielių imuninio atsako AD ląsteliniai ir molekuliniai mechanizmai.....	23
1.3.2 <i>Candida albicans</i> mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei.....	24
1.3.3 Kitų mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei.....	25
1.4 Kryžminės reakcijos.....	26
1.5 <i>Malassezia</i> gentis.....	27
1.5.1 <i>Malassezia</i> taksonomija.....	28
1.5.2 <i>Malassezia</i> genties mielių fiziologiniai požymiai.....	28
1.5.3 <i>Malassezia</i> genties mielių identifikavimas biocheminiais ir fiziologiniais metodais.....	29
1.5.4 <i>Malassezia</i> genties mielių identifikavimas molekuliniais metodais.....	31
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	37
2.1 Reagentai, rinkiniai.....	37
2.2 Terpės, tirpalai, buferiai.....	38
2.3 Tiriamieji asmenys.....	40
2.4 Mielių kamienai.....	41
2.5 Mielių identifikavimas klasikiniiais mikrobiologiniais metodais.....	41

2.6	<i>Malassezia</i> kamienų identifikavimas molekuliniiais metodais..	43
2.7	Imunologiniai metodai.....	45
2.8	Statistinė analizė.....	48
3.	DARBO REZULTATAI.....	49
3.1	Netipinių <i>Malassezia</i> kamienų identifikavimas.....	49
3.1.1	<i>Malassezia furfur</i> netipinių kamienų identifikavimas klasikiniais mikrobiologiniais metodais.....	50
3.1.2	<i>Malassezia restricta</i> netipinio kamieno identifikavimas klasikiniais mikrobiologiniais metodais.....	51
3.1.3	Netipinių <i>Malassezia</i> kamienų identifikavimas molekuliniiais metodais.....	54
3.2	Mielių rūšių paplitimas ir pasiskirstymas ant atopinio dermatito pažeistos odos.....	56
3.3	Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš <i>Candida</i> rūšis ir <i>Rhodotorula rubra</i> , nustatymas atopiniu dermatitu sergančių asmenų kraujo serume.....	59
3.3.1	Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš <i>Candida</i> rūšis ir <i>Rhodotorula rubra</i> nustatymas imunofermentiniu metodu.....	59
3.3.2	Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš <i>Candida</i> rūšis ir <i>Rhodotorula rubra</i> nustatymas tėkmės citometrijos metodu.....	62
3.4	Kryžminių reakcijų tarp trijų <i>Candida</i> rūšių ir <i>Rhodotorula rubra</i> mielių ekstraktų nustatymas.....	64
3.5	Kryžminių reakcijų tarp <i>Candida pelliculosa</i> mielių ekstrakto ir namų dulkių erkių D1 ir D2 alergenų nustatymas.....	65
4.	REZULTATŲ APTARIMAS.....	68
	IŠVADOS.....	86
	Mokslinių straipsnių disertacijos tema sąrašas.....	87
	Padėka.....	88
	Literatūros sąrašas.....	89
	Priedas.....	106

SANTRUMPOS

AD	atopinis dermatitas
AFLP	pagausintų fragmentų ilgio polimorfizmas
BSA	jaučio serumo albuminas
DBB	diazonio mėlynasis B
DGGE	elektroforezė denaturuojančiame gelyje
DNR	deoksiribonukleorūgštis
FcεRI	didelio giminingumo receptoriaus IgE antikūnui
GPY	gliukozės, peptono, mielių ekstrakto agarizuota terpė
Ig	imunoglobulinas
IGS	tarpgeninis intarpas
IL	interleukinas
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozidas
ITS	vidinis transkribuojamas intarpas
LB	Luria-Bertani mitybinė terpė
MCB	monocitų chemotaksio baltymas
mDA	modifikuota Dixon'o agarizuota terpė
MHC	pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas
MYGP	salyklo, mielių ekstrakto, gliukozės, peptono agarizuota terpė
mLNA	modifikuota Leeming'o ir Notman'o agarizuota terpė
MnSOD	mangano superoksiddismutazė
OT	optinis tankis
PFGE	pulsuojančio lauko elektroforezė
PGR	poligrandininė reakcija
RAPD	atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR
rRNR	ribosominė ribonukleorūgštis
RFLP	restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmas
SD	seborėjinis dermatitas
SGA	saburo agarizuota terpė
SN	standartinis nuokrypis

tFLP	galinių fragmentų ilgio polimorfizmas
Th1/Th2	T efektorinių helperių subpopuliacijos
TNF- α	navikų nekrozės faktorius
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidas

Mitybinių terpių, buferių, reagentų santrumpas pateiktos medžiagų ir metodų skyriuje.

ĮVADAS

Alergija apibūdinama kaip imuninių mechanizmų sukelta padidėjusio jautrumo reakcija į nekenksmingas, netoksiškas, nesidauginančias organizme egzogeninės kilmės medžiagas – alergenų (Dubakienė, 2002). Yra žinoma, kad genetiniai veiksniai svarbūs pirminiam alerginių reakcijų išsivystymui, kai pažeidžiama odos apsauginė barjerinė funkcija ir aplinkos alergenai lengviau patenka į organizmą bei indukuoja padidėjusio jautrumo reakcijas. Paskutiniiais dešimtmečiais labai padidėjo sergamumas alerginėmis ligomis, šio reiškinio vien paveldimumu paaiškinti negalima. Literatūros duomenimis, padažnėję alergijų atvejai susiję su padidėjusiu alergenų kiekiu aplinkoje, užterštumu ir pasikeitusiais higienos įpročiais. Manoma, kad riziką išsivystyti alerginiam susirgimui vienodai įtakoja tiek aplinkos, tiek genetiniai veiksniai (Bieber, 2010; Spergel, 2010; Williams, Grindlay, 2009).

Kaip ir kitų alerginių ligų atveju, padidėjusio sergamumo atopiniu dermatitu (AD) negalima paaiškinti vienu ar keliais dominuojančiais veiksniais. Viena iš populiariausių teorijų, aiškinančių didėjančią AD susirgimų dažnį, yra taip vadinama „higienos hipotezė“. Pasak jos, dėl higienos aplinkoje sumažėjus infekcijų sukėlėjų kiekiui, padidėjus vakcinavimui ir antibiotikų vartojimui, organizmas į išorės antigenus reaguoja neadekvačiomis imuninėmis reakcijomis (Okada ir kt., 2010). Yra žinoma, kad AD pažeista oda dažniau infekuojama mikroorganizmais. Mikroorganizmai nuo kitų alergizuoti galinčių medžiagų skiriasi tuo, kad jie geba kolonizuoti pažeistą odą ir, indukuodami alergines reakcijas, sunkinti AD eigą (Baker, 2006; Elias, Steinhoff, 2008; Faergemann, 2002).

Per pastarąjį dešimtmetį išaugo susidomėjimas mikroskopiniais grybais kaip alergizuoti gebančiomis medžiagomis. Literatūros duomenimis, *Malassezia* genties mielės yra svarbus veiksnys AD patogenezėi, kadangi 30–80 % vyresnių kaip 14 metų AD sergančių asmenų kraujo serume aptinkama prieš šias mieles nukreiptų IgE antikūnų (Scheynius ir kt., 2002). Šiuo metu identifikuoti ir klonuoti dviejų *Malassezia* rūšių 13 alergenų genai (Simon-

Nobbe ir kt., 2008). Literatūros duomenimis, komensalinės žmonių gleivinių mielės *Candida albicans* taip pat gali sukelti padidėjusio jautrumo reakcijas (Khosravi ir kt., 2009; Mari ir kt., 2003). Du *C. albicans* ekspresuojami baltymai yra įtraukti į tarptautinę alergenų nomenklatūros duomenų bazę (www.allergen.org).

Nustatyta, kad dauguma mikroskopiniuose grybuose esančių alergizuojančių baltymų turi savo homologus kitų rūšių ar genčių grybuose. Daugelis šių mikroorganizmų išskiria medžiagas, kurios gali pačios sukelti alerginę reakciją arba stimuliuoti imuninę sistemą dėl kryžminių reakcijų, vykstančių su kitais alergenais. Kryžminėmis reakcijomis tarp šių homologinių baltymų aiškinamas pastebėjimas, kad AD sergančio individo kraujo serume aptinkama prieš kelias grybų rūšis nukreiptų IgE antikūnų (Simon-Nobbe ir kt., 2008).

AD susirgimo metu mikroskopiniai grybai klinikinėse laboratorijose identifikuojami retai, nes neinvazinėmis ligomis sergantiems asmenims retai atliekami mikrobiologiniai tyrimai. Literatūroje surinkti duomenys apie ne *Malassezia* genčiai priklausančių mielių rūšių paplitimą ant AD pažeistos odos yra skurdūs. Atsižvelgiant į aplinkoje esančių saprofitinių mielių įvairovę ir jų konservatyvių baltymų gausą, svarbu nustatyti, kurie šių tranzitinių mikroorganizmų geba kolonizuoti AD pažeistą odą ir sukelti specifinių IgE antikūnų sintezę.

Darbo tikslas

Išskirti ir identifikuoti atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuojančias mielių rūšis ir įvertinti jų įtaką specifinių IgE antikūnų sintezei bei kryžminių reakcijų tarp skirtingų mielių rūšių galimybę.

Darbo uždaviniai

1. Išskirti ir identifikuoti atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuojančias mielių rūšis.
2. Klasikiniais ir molekuliniais metodais identifikuoti netipines mielių rūšis.
3. Įvertinti išskirtų mielių paplitimą ant atopinio dermatito pažeistos odos.
4. Imunofermentinės analizės ir tėkmės citometrijos metodais nustatyti prieš išskirtas mielių rūšis nukreiptus specifinius IgE antikūnus.
5. Įvertinti kryžminių reakcijų galimybę tarp išskirtų mielių rūšių.
6. Įvertinti kryžminių reakcijų galimybę tarp išskirtų mielių rūšių ir kitų galimų buitinių alergenų.

Mokslinis naujumas

- Pirmą kartą Lietuvoje įvertinta atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuojančių mielių mikroflora ir jos gausa.
- Pirmą kartą Lietuvoje įvertintas *Malassezia* genčiai priklausančių mielių paplitimas atopinio dermatito pažeistoje odoje.
- Pirmą kartą aptikti prieš *Candida famata* ir *Candida pelliculosa* nukreipti specifiniai IgE antikūnai atopiniu dermatitu sergančių žmonių kraujo serume.
- Pirmą kartą nustatyta, kad atopiniu dermatitu sergančių žmonių kraujyje cirkuliuoja specifiniai IgE antikūnai, nukreipti prieš kryžmiškai reaguojančius *Candida famata*, *Candida pelliculosa*, *Candida guilliermondii* ir *Rhodotorula rubra* antigenus.
- Pirmą kartą nustatyta, kad *Candida pelliculosa* ir namų dulkių erkių *Dermatophagoides pteronyssinus* ir *Dermatophagoides farinae* alergenai gali turėti panašius epitopus.

Darbo praktinė reikšmė

1. Mūsų darbo metu gauti rezultatai rodo, kad būtina sekti mielių mikrofloros paplitimą atopinio dermatito pažeistoje odoje ir atitinkamai skirti prevencines priemones.
2. Iš 51 % mėginių, paimtų nuo suaugusių žmonių odos, išskirti mieliniai grybai. Būtina imti mikrobiologinius pasėlius nuo vyresnių kaip 16 metų atopiniu dermatitu sergančių žmonių odos.
3. Mūsų darbo rezultatai patikimai rodo, kad atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuojančios komensalinės mielės *Candida famata*, *Candida pelliculosa*, *Candida guilliermondii* ir *Rhodotorula rubra* gali turėti įtakos atopinio dermatito eigai, sukeldamos prieš jas nukreiptų specifinių IgE antikūnų sintezę.

Gynimui pristatomi teiginiai

1. Atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuoja *Candida*, *Malassezia* ir *Rhodotorula* gentims priklausančios mielės. Jų kiekybinis ir kokybinis paplitimas ant odos priklauso nuo paciento amžiaus.
2. Atopiniu dermatitu sergančių žmonių kraujo serume aptinkami prieš kryžmiškai reaguojančius odą kolonizuojančių mielių antigenus nukreipti specifiniai IgE antikūnai.
3. *Candida pelliculosa* ir namų dulkių erkių *Dermatophagoides pteronyssinus* ir *Dermatophagoides farinae* alergenai gali turėti panašius epitopus.

Darbo aprobavimas

1. Darbo tema paskelbti trys moksliniai straipsniai žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto sąrašą (ISI).
2. Išskirtas netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintis *Malassezia furfur* kamienas M47 deponuotas Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje.
3. Išskirtas netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintis *Malassezia restricta* kamienas M8 deponuotas Japonijos mikroorganizmų kolekcijoje.

Darbo apimtis

Darbą sudaro 106 puslapiai. Jis suskirstytas į 7 skyrius: Įvadą, Literatūros apžvalgą, Medžiagas ir metodus, Rezultatus, Rezultatų aptarimą, Išvadas, Literatūros sąrašą. Jame yra 8 lentelės, darbas iliustruotas 18 paveikslų. Rašant disertaciją buvo panaudoti 223 literatūros šaltiniai.

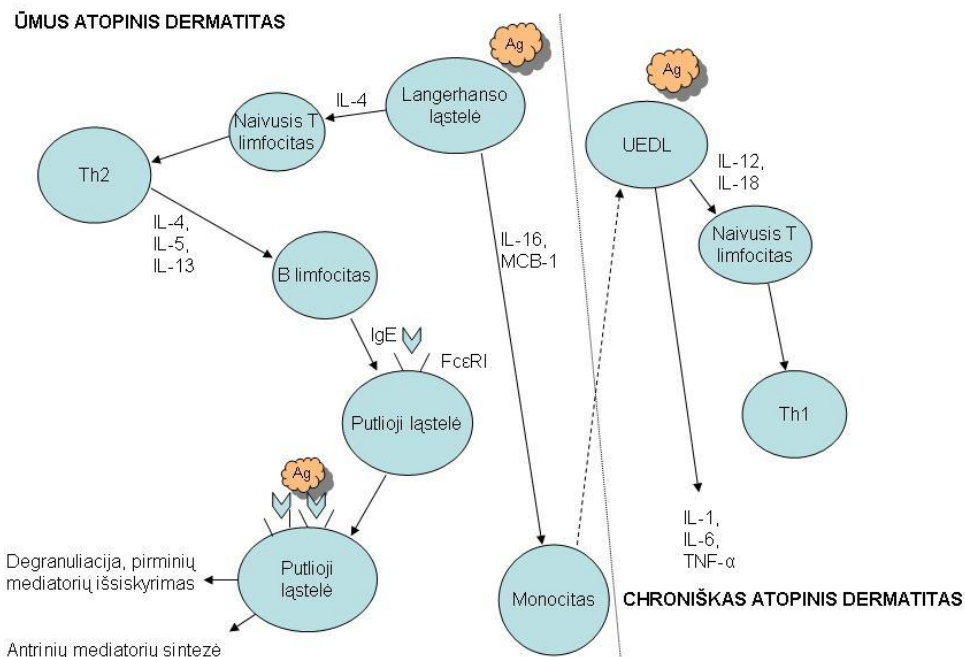
1. LITERATŪROS APŽVALGA

Atopinis dermatitas (AD) yra lėtinė odos liga, kuriai būdingi niežtintys, uždegiminiai odos židiniai. Tai vienas dažniausių alerginių susirgimų išsivysčiusiose šalyse. Pagal literatūroje aprašomus duomenis, AD serga 10-20 % vaikų ir 1-3 % suaugusiųjų visame pasaulyje. Sergamumas padidėjo 2-3 kartus per pastaruosius trisdešimt metų. Nustatyta, kad 85 % atvejų AD suserga vaikai iki 5 metų amžiaus, o 60 % AD sergančių žmonių išsivysto kiti alerginiai susirgimai (Asher ir kt., 2006; Batlles Garrido ir kt., 2010; Hwang ir kt., 2010; Johansson ir kt., 2004; Simpson ir kt., 2009; Williams ir kt., 1999).

Atopinio dermatito išsivystymui ir uždegiminio atsako pasireiškimui turi įtakos paveldimumas, gyvenimo būdas ir aplinka, odos barjerinės funkcijos pažeidimai bei mikroorganizmai. Negalima išskirti kelių pagrindinių veiksnių, atsakingų už AD patogenezę. Manoma, kad skirtingose populiacijose, priklausomai nuo jų genetinio fondo ir gyvenamosios aplinkos, skirtingi veiksniai atsakingi už didžiausią riziką susirgti AD (Bieber, 2008; Williams, Grindlay, 2009).

1.1 Atopinio dermatito imuninis mechanizmas

Atopija apibūdinama kaip genetiškai determinuotas padidėjęs jautrumas įprastiems aplinkos antigenams, kuris pasireiškia aktyvia specifinių IgE antikūnų sinteze. Atopinėms ligoms priskiriami alerginis rinitas, alerginė (atopinė) astma, alerginė gastroenteropatija ir atopinis dermatitas (Johansson ir kt., 2004). Sergant AD kontaktas su antigenu (alergenu) organizme sukelia neadekvatų imuninį atsaką ir prasideda uždegimas. Pažeistose odos vietose telkiasi imuninės sistemos ląstelės: eozinofilai, putliosios ląstelės ir T ląstelės, o kraujo serume būna padidėjęs IgE antikūnų kiekis.



1 pav. Atopinio dermatito imuninis mechanizmas.

Ag – antigenas; FcεRI – receptorius E klasės imunoglobulino Fc fragmentui; IgE – imunoglobulinas E; IL – interleukinas; MCB-1 – monocitų chemotaksio baltymas 1; Th1, Th2 – efektoriniai T limfocitai, TNF-α – navikų nekrozės faktorius; UEDL – uždegiminės epidermio dendritinės ląstelės.

Pirmame paveiksle pavaizduota AD metu vykstančių reakcijų schema:

- Antigenui (alergenui) patekus į organizmą jį suriša epidermyje cirkuliuojančios specialios dendritinės (Langerhanso) ląstelės, kurios išskiria interleukiną 4 (IL-4) ir taip skatina naiviausias T ląsteles diferencijuotis į Th2 limfocitus.
- Th2 ląstelės išskiria IL-4, IL-5, IL-13, kurie taip pat skatina Th2 diferenciaciją, putliųjų ląstelių ir eozinofilų proliferaciją.
- IL-4 ir IL-13 skatina B limfocitų proliferaciją ir diferenciaciją į IgE antikūnus sintetinančias plazmines ląsteles. Pasigaminę IgE antikūnai fiksuojami putliųjų ląstelių ir bazofilų paviršiuje per FcεRI receptorius.
- Į organizmą pakartotinai patekęs alergenai kryžmiškai sujungia dvi IgE molekules ir taip aktyvina putliąsias ląsteles. Įvyksta pastarųjų

degranuliacija, išsiskiria putliųjų ląstelių citoplazmoje esantys pirminiai uždegiminiai mediatoriai (histaminas, chemokinai, proteazės) ir skatinama antrinių mediatorių sintezė (prostaglandinų, leukotrienų, citokinų). Pirminiai ir antriniai mediatoriai skatina lygiųjų raumenų susitraukimus, didina kraujagyslių pralaidumą ir gleivių sekreciją.

Tai ankstyvoji greitų padidėjusio jautrumo reakcijų fazė, vykstanti praėjus 5–10 minučių nuo alergeno patekimo. Putliųjų ląstelių išskirti antriniai mediatoriai į alergeno patekimo vietą sutelkia kitas uždegimines ląsteles: eozinofilus, bazofilus, T limfocitus. Gali prasidėti vėlyvoji greitų padidėjusio jautrumo reakcijų fazė, trunkanti 8–12 valandų nuo alergeno patekimo į organizmą. Šios fazės metu taip pat skatinama T ląstelių sintezė, telkiasi uždegiminės ląstelės, pažeidžiamas epitelis. Vykstantis imuninis audinių uždegimas gali išsivystyti į chronišką atopinį dermatitą:

- Ūmios atopinio dermatito fazės metu, alergenui aktyvius Langerhanso ląstelę, ji išskiria monocitų chemotaksio baltymą 1 (MCP-1) ir IL-16.
- Migruodami į alergeno patekimo vietą monocitai diferencijuojasi į uždegimines epidermio dendritines ląsteles, kurios aptinkamos organizme tik uždegimo metu.
- Uždegiminės epidermio dendritinės ląstelės gamina ir išskiria priešuždegiminius citokinus IL-1, IL-6 ir TNF- α . Jų išskiriami IL-12 ir IL-18, slopina IgE gamybą ir skatina naiviausias T ląsteles diferencijuotis į Th1 limfocitus.

Normaliomis sąlygomis organizme egzistuoja pusiausvyra tarp abiejų tipų Th ląstelių. Antigeną pateikiančių ląstelių išskiriami IL-12 ir IL-18 arba IL-4, atitinkamai skatina naiviųjų T ląstelių diferenciaciją į Th1 ar Th2. Esant Th2 pertekliniam kiekiui organizme sintetinami IgE klasės antikūnai ir vystosi alerginiai susirgimai (Adomaitienė ir kt., 2001; Bieber, 2008; Dubakienė, 2002; Platts-Mills, Woodfolk, 2011).

1.2 Atopinio dermatito išsivystymui turintys įtakos veiksniai

Manoma, kad svarbiausi veiksniai AD išsivystymui yra paveldimumas, gyvenimo būdas ir aplinka, odos barjerinės funkcijos pažeidimai bei mikroorganizmai (Akdis ir kt., 2006; Bieber, 2008).

1.2.1 Genetiniai veiksniai, sąlygojantys atopinio dermatito vystymąsi

Kaip minėta anksčiau, IgE antikūnų sintezei turi įtakos paveldimumas. Atopinis dermatitas dažnai apibūdinamas kaip nuo daugelio faktorių priklausantis genetinis susirgimas, kuris pasireiškia sąveikaujant genetiniams ir aplinkos veiksniams. Pastebėta, kad IgE antikūnų koncentracija dažnai būna padidėjusi kelių šeimos narių kraujyje. AD dažniau pasireiškia abiem monozigotiniams dvyniams (77 %) negu abiem heterozigotiniams dvyniams (15 %) (Schultz Larsen, Holm, 1985).

Literatūroje aprašyti keturi dideli genomų tyrimai, ieškant genų, atsakingų už AD pasireiškimą (Bradley ir kt., 2002; Cookson ir kt., 2001; Haagerup ir kt., 2004; Lee ir kt., 2000). Daugiausia su AD patogenezė susijusių genų aptikta 5 chromosomoje, kur jie sudaro citokinus koduojančių genų klasterį – funkcionaliai susijusių genų grupę, koduojančią imuninio atsako viduląstelinis ir ląstelės paviršiaus mediatorius: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13, bei granulocitų – makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių (GM-CSF). Dar vienas AD vystymuisi svarbus genas *MS4A2* yra išsidėstęs 11 chromosomoje. Jis koduoja FcεRI receptoriaus β subvienetą. FcεRI ekspresuojamas bazofilų, putliųjų ląstelių, monocitų ir Langerhanso ląstelių paviršiuje. Receptoriaus prisijungia IgE – antigeno kompleksą ir inicijuoja uždegiminių mediatorių išskyrimą. Normalus β subvienetas amplifikuoja ląstelės aktyvavimo signalą (Lin ir kt., 1996). Sutrumpinta subvieneto izoforma (gauta alternatyvaus splaisingo pasekoje) inhibuoja FcεRI funkciją, stabdydama ląstelės degranuliaciją (Andrasfalvy ir kt., 2005).

Alerginis AD skirstomas į egzogeninį (susijusį su IgE antikūnų sinteze, kuris nustatomas ~80 % pacientų) ir endogeninį (nesusijusį su IgE antikūnų sinteze, nustatomą ~20 % pacientų). Pagrindinis skirtumas tarp šių dviejų AD grupių yra tas, kad endogeninio AD atveju nenustatomas bendro IgE ar specifinių IgE antikūnų kiekio padidėjimas pacientų kraujyje (Novak, Bieber, 2003). Siekiant paaiškinti šiuos skirtumus, buvo ieškoma AD patogenezei svarbių genų, nesusijusių su IgE antikūnų sinteze. Vieno jų, keratinocitų viduląstelinį baltymą filagriną koduojančio geno (*FLG*), mutacijos susijusios su odos epidermio raginio sluoksnio struktūros ir funkcijų pažeidimais. Keletas šio geno mutacijų nustatytos AD pacientams (Marenholz ir kt., 2006; Nomura ir kt., 2007; Palmer ir kt., 2006; Sandilands ir kt., 2007; Weidinger ir kt., 2006). AD būdingas odos uždegimas susijęs su padidėjusia citokinų IL-4 ir IL-13 sinteze. Šios medžiagos taip pat slopina filagriną koduojančio geno ekspresiją keratinocituose (Howell, 2007).

1.2.2 Gyvenimo būdas ir aplinkos veiksniai, turintys įtakos atopinio dermatito vystymuisi

Manoma, kad gyvenimo būdas ir aplinkos veiksniai yra svarbūs AD išsivystymui (Novak ir kt., 2003). Kadangi AD labiau būdingas mieste gyvenantiems žmonėms, lyginant su kaimo gyventojais, ilgą laiką buvo populiari taip vadinama „higienos hipotezė“. Ji teigia, kad kūdikių aplinkoje sumažėjus infekcijų sukėlėjų padidėja imlumas alerginiams susirgimams. Pasak šios hipotezės, alerginių ligų padažnėjimas yra susijęs su sutrikusiu ankstyvu imuninės sistemos brendimu dėl santykinės apsaugos nuo bakterijų pirmaisiais gyvenimo metais. Manoma, kad nesubrendusią vaikų imuninę sistemą per mažai stimuliuojant bakterijomis, ji skatinama, reaguojant į paprastus antigenus, gaminti IgE, o ne IgG (Strachan, 1989). Atlikta daug epidemiologinių tyrimų siekiant išsiaiškinti gyvenimo būdo įtaką alergijos išsivystymui. Rezultatai yra nevienareikšmiai. Vieni jų remia šią teoriją ir teigia, kad, sumažinus skiepų ir antibiotikų vartojimą, sumažėja tikimybė

susirgti alerginėmis ligomis (Alfven ir kt., 2006; Floistrup ir kt., 2006). Kiti duomenys šios hipotezės nepatvirtina (Williams, Flohr, 2006; Zutavern ir kt., 2005).

Aplinkoje esantys teršalai taip pat gali padidinti alergijos išsivystymo riziką (Riedl, Diaz-Sanchez, 2005). Skirtingai nei astmos atveju, pasyvus rūkymas neturi įtakos AD (Akdis ir kt., 2006). Literatūroje yra duomenų, kad kiti aplinkos aeroalergenai, tokie kaip naminiai gyvūnai, namų dulkių erkės ar žiedadulkės, smarkiai padidina riziką susirgti AD (Capristo ir kt., 2004; Purvis ir kt., 2005; Schafer ir kt., 1999). Kūdikiams AD išsivystymas dažniausiai yra susijęs su maiste esančiais alergenais (Illi ir kt., 2004; Sampson, 2004; Werfel, Breuer, 2004).

Manoma, kad stresas taip pat yra svarbus rizikos veiksnys, turintis įtakos AD atsiradimui ir eigos sunkumui, nors tikslus jo poveikis AD etiologijai nėra žinomas. Nustatyta, kad keratinocitai, melanocitai ir visos imuninės sistemos ląstelės gamina ir išskiria neuromediatorius. Dauguma odos ląstelių turi jų receptorius. Minėti neuromediatoriai gali moduluoti odos ir imuninių ląstelių funkcijas. Eksperimentiškai nustatyta, kad AD sergančių pacientų kraujyje ir odoje būna padidėjęs kiekis neuromediatorių ir su stresu susijusio smegenų kilmės augimo faktoriaus, kurie gali sustiprinti imuninių ląstelių indukuotą uždegimą (Misery, 2010; Raap ir kt., 2005; Schmid-Ott ir kt., 2001).

1.2.3 Odos barjerinės funkcijos sutrikimo svarba atopinio dermatito išsivystymui

Pradinis mechanizmas, sukeliantis odos uždegiminį procesą AD metu, nežinomas. Manoma, kad odos barjerinės funkcijos sutrikimas yra labai svarbus veiksnys AD vystymuisi, kadangi iš aplinkos į gilesnius odos sluoksnius praleidžiami didelės molekulinės masės antigenai, skatinantys Th2 ląstelių vystymąsi (Elias, Steinhoff, 2008).

Oda – didžiausias kūno organas, sudarantis barjerą tarp išorinės aplinkos ir organizmo. Epidermis, paviršinis odos sluoksnis, susideda iš keturių tipų

ląstelių: keratinocitų (sudaro 95 % epidermio), melanocitų, Langerhanso ląstelių ir Merkelio ląstelių. Keratinocitai pamatiniame epidermio sluoksnyje dalijasi, išskiria keratiną ir migruoja į paviršinius sluoksnius, sudarydami išorinį negyvų ląstelių „skydą“ – raginį sluoksnį. Pastarajame be keratinocitų dar yra išsidėstę tarpląsteliniai lipidai, ribojantys vandens pralaidumą: keramidai (45–50 %), cholesterolis (25 %), riebiosios rūgštys (10–15 %) ir kiti lipidai (~5 %). Raginis sluoksnis saugo organizmą iš vidaus nuo padidinto tarpląstelinio vandens pasišalinimo, o iš išorės nuo žalingų aplinkos veiksnių (Madison, 2003). Tam tikrą apsauginį vaidmenį turi odos paviršiaus skysčių sekrecija. Per parą riebalų liaukos išskiria apie 2 g odos riebalų, kurie odos paviršiuje susimaišo su prakaitu ir sudaro ploną apsauginę plėvelę („rūgščiąją mantiją“). Odos paviršiaus reakcija (pH 4,8–5,8), lipiduose esančios riebiosios rūgštys bei odos fermentai (proteazės) veikia baktericidiškai (Adomaitienė ir kt., 2001).

AD paveiktai odai būdinga: padidėjęs vandens pralaidumas, sumažėjęs raginio sluoksniu lipidų kiekis, padidėjęs pH, sumažėjęs antimikrobinių medžiagų kiekis. Manoma, kad šie pokyčiai susiję su mutacijomis filagrino koduojančiame gene. Yra duomenų, kad šio geno neveiklumas turi įtakos padidėjusiam pH ir vandens pralaidumui raginiame sluoksnyje, nors tikslus filagrino veikimo mechanizmas nėra žinomas (Elias, Steinhoff, 2008). Padidėjęs odos pH sutrikdo lipidų metabolizmą (Rippke ir kt., 2004). Savo ruožtu, sumažėjusi keramidų (pagrindinių vandenį sulaikančių molekulių) gamyba padidina vandens pralaidumą į išorę (Sator ir kt., 2003). Be to, padidėjęs odos pH suaktyvina serino proteazę. Minėtas fermentas skatina IL-1 α ir IL-1 β gamybą, kurių neaktyvios formos dideli kiekiai būna keratinocitų citoplazmoje. Šie citokinai pradeda uždegiminį procesą. Pasiūlytas taip vadinamas „išorė-vidus-išorė“ AD patogenezės modelis, kuriuo remiantis aiškinama, kad pirminis AD pasireiškimas įvyksta dėl įgimtų ir įgytų odos pažeidimų, todėl sutrinka epidermio funkcijos ir struktūra. Šie procesai aktyvina imuninę sistemą, kuri, savo ruožtu, neigiamai veikia odos, kaip apsauginio

barjero, homeostazę ir leidžia lengviau patekti alergenams (Elias, Steinhoff, 2008).

1.2.4 Mikroorganizmų įtaka atopiniam dermatitui

„Antrinės infekcijos“ yra apibūdinamos kaip infekcinis procesas, kuriam sąlygas atsirasti ir plisti sudaro pirminis susirgimas. Kaip buvo minėta anksčiau, AD paprastai sukelia vienu metu keli veiksniai (organizmo imunologinio reaktyvumo poslinkiai, genetiniai ir išorės veiksniai), kurie pažeidžia odos apsaugines ir imunologines funkcijas. Todėl oda tampa infekcijų vartais, o AD dažnai lydi bakterinės, virusinės ar grybinės infekcijos (Batlles Garrido ir kt., 2010).

1.2.4.1 Bakterinės infekcijos

Literatūros duomenimis maždaug 90 % AD sergančių pacientų oda yra infekuota *Staphylococcus aureus* bakterijomis (Ring ir kt., 1992). Dauguma šių *S. aureus* kamienų išskiria enterotoksinus, priklausančius superantigenų šeimai. Superantigenai – tai bakterinės ar virusinės kilmės imunostimuliuojančios molekulės, galinčios tiesiogiai sąveikauti su MHC II klasės molekulėmis ir T limfocitų receptorių β grandinės dalimi. Ši sąveika yra nespecifinė ir indukuoja iki 20 % T ląstelių populiacijos dalijimąsi. Vykstant įprastam antigeno pateikimui indukuojamas maždaug vienos iš 10^5 – 10^6 T ląstelių dalijimasis (Lin ir kt., 2007; Sundberg ir kt., 2002).

Manoma, kad superantigenai turi įtakos AD eigai – skatina T ląsteles dalintis, indukuoja prieš juos nukreiptų IgE antikūnų gamybą ir skatina uždegiminių citokinų TNF- α , IL-17 ir IL-22 išsiskyrimą (Laouini ir kt., 2003; Nograles ir kt., 2009).

1.2.4.2 Virusinės infekcijos

Literatūroje nėra duomenų apie virusų įtaką AD vystymuisi. Pastebėta, kad AD sergantys pacientai pasižymi padidėjusiu imlumu virusinėms infekcijoms, tokioms kaip *Herpes simplex* ar *Vaccinia virus*. Manoma, kad tai susiję su katelicidinais – antimikrobiniais baltymais, kurie dalyvauja įgimto imuniteto apsaugos prieš bakterijas, grybus ir virusus mechanizmuose. Žmogaus katelicidino (LL-37) kiekis AD sergančiųjų odoje yra sumažėjęs (Howell ir kt., 2006).

1.2.4.3 Grybinės infekcijos

Mikroskopiniai grybai yra eukariotiniai, heterotrofiniai organizmai, gyvenantys kaip saprofitai, parazitai ar augalų ir gyvūnų simbiontai beveik visose ekologinėse sąlygose. Aprašyta daugiau kaip 100 000 mikroskopinių grybų rūšių. Iš jų keletas šimtų žinomi kaip oportunistai, o maždaug 100 rūšių gali sukelti mikozeles žmonėms ir gyvūnams. Daugiau kaip 80 mikroskopinių grybų genčių gali sukelti padidėjusio jautrumo reakcijas. Alergizuojantys baltymai identifikuoti ir aprašyti 23 genčių grybuose. Pagrindinis skirtumas tarp jų ir kitų alergenų (t.y. namų dulkių erkių ar žiedadulkių) yra tas, kad jie geba kolonizuoti žmogaus kūną ir sukelti/palaikyti alergiją išskirdami toksinus, fermentus ar lakius organinius junginius (Simon-Nobbe ir kt., 2008).

1.3 Mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei

Atopinio dermatito patogenezėje dalyvauja mielės. Tai vienaląsčiai mikroskopiniai grybai, kurie plačiai paplitę žmogaus gyvenamojoje aplinkoje. Dauguma mielių yra oportunistiniai mikroorganizmai, bet tam tikromis sąlygomis (pasikeitus odos pH, imunosupresijos atveju) gali sukelti infekcijas žmonėms ir gyvūnams. Iš tokių mielių paminėtinos yra *Malassezia* genties atstovai ir *Candida albicans*.

1.3.1 *Malassezia* genties mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei

1983 metais pastebėta, kad pacientams, kuriems atopinis dermatitas išplitęs galvos ir kaklo srityse (kūno dalyse, kuriose odos paviršiuje išskiriamas didesnis lipidų kiekis) ir kraujo serume turintiems prieš *Malassezia* mieles nukreiptų IgE antikūnų, kliniškai padeda gydymas antigrybeliniais vaistais (Clemmensen, Hjorth, 1983). Nuo to laiko atlikta daugybė eksperimentų siekiant įvertinti šių mielių įtaką AD patogenezei. Nustatyta, kad maždaug 50 % vyresnių kaip 14 metų AD sergančių pacientų yra būdingi teigiami odos dūrio mėginiai (ant odos lašinamas tiriamas alergenai ir specialia adata pažeidžiamas epidermis) ir (ar) jų kraujo serume cirkuliuoja prieš *Malassezia* mieles nukreipti IgE antikūnai. Tai leidžia daryti prielaidą, kad imuninė sistema atpažįsta *Malassezia* antigenus ir indukuoja prieš juos humoralinį atsaką, kuriame dalyvauja B limfocitai (Darabi ir kt., 2009; Yim ir kt., 2010; Nakabayashi ir kt., 2000; Rincon ir kt., 2005; Savolainen ir kt., 2001).

Atlikti tyrimai siekiant išsiaiškinti, kurios *Malassezia* rūšys daro įtaką AD eigai. Eksperimentų rezultatai nevienareikšmiai. Manoma, kad rezultatų neatitikimą galėjo sąlygoti skirtingi mėginių paėmimo metodai (t.y. kontaktinės plokštelės, tepinėliai, lipni juosta) ir laboratorijose naudotos ne vienodos mitybinės terpės *Malassezia* mielių auginimui *in vitro*. Be to, daugelio tyrimų metu naudojami kokybiniai, o ne kiekybiniai mikrobiologiniai metodai, kas apsunkina odos kolonizacijos mikroorganizmais įvertinimą. Literatūroje yra duomenų, kad *Malassezia* genties mielės dažniau aptinkamos šiltesniuose kraštuose, todėl skiriasi eksperimentų, atliktų skirtinguose klimatinio požiūriu regionuose, duomenys (Batra ir kt., 2005).

Šiuo metu *Malassezia* genčiai priklausančiose mielėse yra identifikuota ir klonuota trylika alergenų koduojančių genų (International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee duomenimis; <http://www.allergen.org>) (1 lentelė).

1 lentelė. *Malassezia* genties atstovų išskiriamų alergenų sąrašas.

Rūšis	Alergeno pavadinimas	Biocheminė funkcija	alergeno	Literatūros šaltinis
<i>M. furfur</i>	Mala f 2	Peroksisomų baltymas	membraninis	(Yasueda ir kt., 1998)
	Mala f 3	Peroksisomų baltymas	membraninis	(Yasueda ir kt., 1998)
	Mala f 4	Mitochondrijų malatdehidrogenazė		(Onishi ir kt., 1999)
<i>M. sympodialis</i>	Mala s 1	Peroksisomų baltymas	membraninis	(Schmidt ir kt., 1997)
	Mala s 5	Peroksisomų baltymas	membraninis	(Lindborg ir kt., 1999)
	Mala s 6	Ciklofilinas		(Lindborg ir kt., 1999)
	Mala s 7	Nežinoma		(Rasool ir kt., 2000)
	Mala s 8	Nežinoma		(Rasool ir kt., 2000)
	Mala s 9	Nežinoma		(Rasool ir kt., 2000)
	Mala s 10	Streso baltymas (HSP88)		(Andersson ir kt., 2004)
	Mala s 11	MnSOD		(Andersson ir kt., 2004)
	Mala s 12	Gliukozės-metanol-cholin-oksido-reduktazė		(Zargari ir kt., 2007)
	Mala s 13	Tioredoksinas		(Limacher ir kt., 2007)

M. furfur išskiriami alergenai Mala f 2 ir Mala f 3 yra peroksisomų membranos baltymai, sudarantys homodimerus. Jų sekų panašumas tarpusavyje siekia 51 %, o sekų homologija su dviem *Candida boidinii* mielių peroksisomų membraniniais baltymais ir *Aspergillus fumigatus* mikromiceto alergenų Asp f 3 yra 37–39 % (Hemmann ir kt., 1997; Yasueda ir kt., 1998). *M. sympodialis* klonuoti dešimt alergenų koduojančių genų. Rekombinantiniai

alergenai pavadinti Mala s 1, Mala s 5–13. Vieno jų – Mala s 11, mangano superoksiddismutazės (MnSOD), geno sekos panašumas su žmogaus MnSOD geno seka siekia 50 % . Nustatyta, kad žmogaus MnSOD gali sukelti autoimunines reakcijas AD sergantiems pacientams, kurie kraujo serume turi prieš *M. sympodialis* nukreiptų IgE antikūnų (Schmid-Grendelmeier ir kt., 2005). Minėti rezultatai buvo patvirtinti nustatant, kad Mala s 11 ir žmogaus MnSOD turi bendrus IgE antikūnų epitopus, o autoreaktyvumas įvyksta dėl molekulinės mimikrijos (Vilhelmsson ir kt., 2008).

Mala s 12 yra *M. sympodialis* ląstelės sienelės baltymas (Zargari ir kt., 2007). Nustatyta, kad padidėjusio pH aplinkoje (kaip minėta anksčiau, AD paveiktos odos pH yra padidėjęs) *M. sympodialis* gamina, ekspresuoja ir išskiria didesnę kiekį alergeno Mala s 12 (Selander ir kt., 2006).

Manoma, kad *Malassezia* mielių fenotipo „perjungimo“ iš komensalinio (imunosupresinio) į patogeninį (imunostimuliuojantį) mechanizme dalyvauja ją supanti stora lipidų kapsulė. Ląstelės su normalia kapsule skatina priešūždegiminio citokino IL-10 išsiskyrimą iš žmogaus keratinocitų. Praradusios kapsulę ląstelės slopina IL-10 ir skatina uždegiminių citokinų IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α išsiskyrimą. *Malassezia* genties mielės nesugeba pačios pasigaminti lipidų, o ima juos iš aplinkos. AD pažeistoje odoje sumažėjus lipidų kiekiui atitinkamai plonėja šių mielių ląstelių kapsulės. To pasekoje keičiasi organizmo imuninė tolerancija ir prasideda uždegimas (Thomas ir kt., 2008).

1.3.1.1 Malassezia mielių imuninio atsako AD ląsteliniai ir molekuliniai mechanizmai

Malassezia genties mielės pasižymi dviem fenotipais: imunostimuliuojančiu ir imunosupresiniu. Ląstelės supantis lipidinis sluoksnis apsaugo šias mieles nuo fagocitozės ir leidžia gyventi sveikos žmonių odos paviršiuje kaip komensaliniam mikroorganizmui. Kaip minėta anksčiau, odos barjerinė funkcija sergant AD yra pažeista dėl mutacijų filagrino gene,

padidėjusio pH ir sumažėjusios antimikrobinių medžiagų sekrecijos. Visi šie pakitimai sudaro palankias sąlygas *Malassezia* genties mielių dauginimuisi ir antigenų išskyrimui į aplinką. Odos dendritinės ląstelės šiuos antigenus suriša ir pateikia T limfocitams ir natūraliems kileriams, kurie aktyvina subrendusias dendritines ląsteles ir keratinocitus išskirti daugiau uždegiminių citokinų, o šie sutelkia imunocitus į uždegimo vietą. Aktyvinti naivieji T limfocitai diferencijuojasi į Th2 ląsteles. Subrendę T limfocitai sintetina citokinus IL-4, IL-5, IL-13 ir stimuliuoja B limfocitus gaminti prieš *Malassezia* mieles nukreiptus specifinius IgE antikūnus (Ishibashi ir kt., 2006; Watanabe ir kt., 2001).

Šis mechanizmas pasiūlytas *Malassezia* genties mielėms, bet panašios imuninės reakcijos, tikėtina, vyksta ir kitų mielių atveju.

1.3.2 *Candida albicans* mielių įtaka atopinio dermatito patogenezai

Daugelis *Candida* genties rūšims priklausančių mielių yra komensaliniai mikroorganizmai, gyvenantys žmonių virškinimo trakte, gleivinėse ar odos paviršiuje. Yra duomenų, kad pakartotinis odos dirginimas haptenu (nevisaverčiu antigenu, kuris pats nepajėgia sužadinti imuninio atsako, bet geba reaguoti su specifiniais antikūnais) gali indukuoti perjungimą iš Th1 (uždegiminių) limfocitų sukeltamų lėto padidėjusio jautrumo reakcijų į greito padidėjusio jautrumo reakcijas, kurių metu sintetinami IgE antikūnai. Manoma, kad į AD turintys polinkį žmonės pasižymi padidėjusiu jautrumu savo odos mikroflorai dėl kryžminių reakcijų tarp skirtingų mikroorganizmų rūšių ir antigeninio variabilumo (Kitagaki ir kt., 1995). Atliktų tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad *C. albicans* sintetina įvairias medžiagas, galinčias indukuoti alergines reakcijas (Asako ir kt., 2002; Khosravi ir kt., 2008; Kosonen ir kt., 2005). Nustatyta, kad virškinamajame trakte besidauginančios *C. albicans* mielės padidina gleivinių pralaidumą, kas leidžia intaktiniams maisto antigenams patekti į kraują ir sukelti imuninį atsaką (Yamaguchi ir kt., 2006).

Identifikuoti ir klonuoti tris alergenų koduojantys genai iš dviejų *Candida* rūšių: *C. albicans* ir *C. boidinii* (International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee duomenimis; <http://www.allergen.org>). *C. albicans* mielės ekspresuoja Cand a 1 (alkohol-dehidrogenazė) ir Cand a 3 (peroksisomų membraninis baltymas) (Chou ir kt., 2003; Shen ir kt., 1991). Aprašytas mielių *C. boidinii* alergenų Cand b 2 yra homologiškas mikromiceto *A. fumigatus* alergenui Asp f 3 (peroksisomų membraninis baltymas). Įrodyta, kad šie baltymai turi labai panašius IgE antikūnus surišančius epitopus (Hemmann ir kt., 1997).

1.3.3 Kitų mielių įtaka atopinio dermatito patogenezei

Tiriamant mielių įtaką AD, didžiausias dėmesys yra skiriamas *Malassezia* rūšims ir *C. albicans*. Kitų genčių ar kitų *Candida* rūšių mielės aprašytuose eksperimentuose dažniausiai figūruoja dėl nustatytų kryžminių reakcijų su *Malassezia* ir (arba) *C. albicans* (Kanbe ir kt., 1997; Savolainen ir kt., 1998).

Vienas dažniausiai aplinkoje pasitaikančių mieliagrybių, *Rhodotorula rubra* (sin. *R. mucilaginosa*), laikomas oportunistu, kadangi jo sukeliama susirgimai yra itin reti (Neofytos ir kt., 2007). Klonuoti du šios mielės alergenai, kryžmiškai reaguojantys su kitų mikroskopinių grybų genčių homologiškais baltymais: Rho m 1 (enolazė) ir Rho m 2 (vakuolės serino proteazė) (Chang ir kt., 2002; Chou ir kt., 2005).

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* taip pat įvardinamos kaip mikroskopiniai grybai, galintys sukelti alergines reakcijas, nors oficialioje alergenų duomenų bazėje šios mielės nėra minimos (Faergemann, 2002; Simon-Nobbe ir kt., 2008).

1.4 Kryžminės reakcijos

Antigeno specifiškumą sąlygoja jo molekulės dalis (epitopas), galintis nekovalentiškai jungtis su antikūno molekulės dalimi (paratopu). Kiekvienas antigenas paprastai turi keletą 8–22 aminorūgščių liekanų dydžio epitopų. Maždaug 5 aminorūgštys epitope įtakoja antigeno – antikūno sąveiką. Antigeno surišimo vietą antikūne sudaro ~50 aminorūgščių liekanų, iš kurių ~15 fiziškai jungiasi su epitopu. Taigi, antikūno minėtos 50 variabilių aminorūgščių liekanų sudaro kelis persidengiančius potencialius paratopus, gebančius surišti keletą antigenų skirtingu giminingumu (Adomaitienė ir kt., 2001). Kryžminėmis reakcijomis vadinamos reakcijos, kurių metu specifiniai antikūnai, nukreipti prieš konkretų antigeną, jungiasi su struktūriškai panašiu antigenu. Laikoma, kad kryžminės reakcijas gali sukelti homologiniai baltymai, kurių sekų panašumas sudaro daugiau kaip 50 % (Bowyer ir kt., 2006). Kryžminės reakcijos gali būti trijų tipų (Singh ir kt., 2008):

1. Klinikinės – atsiranda dėl paciento reaktyvumo profilio;
2. Taksonominės – įvyksta dėl alergizuojančiuose organizmuose esančių homologinių ar konservatyvių baltymų;
3. Biocheminės – tokios reakcijos vyksta dėl tokių pačių ar panašių epitopų.

Siekiant išsiaiškinti, ar alergenų ortologai yra paplitę grybų karalystėje, ar jie būdingi tik kai kurioms gentims ir (ar) rūšims, lyginti 22 mikroskopinių grybų genomai su 82 alergenais koduojančių genų sekomis. Rezultatai leido daryti prielaidą, kad daugelis šių mikroorganizmų turi baltymų, kurie potencialiai gali patys sukelti alergijas arba stimuliuoti imuninę sistemą dėl kryžminių reakcijų su kitais alergenais. Manoma, kad 0,5–1 % baltymų konkretaus mikroskopinio grybo proteome gali būti potencialūs alergenai. Kryžminėmis reakcijomis aiškinamas klinikinis pastebėjimas, kad daugelis mikroskopiniams grybams alergiškų pacientų reaguoja ne su viena, bet su keliomis jų rūšimis. Konservatyvūs grybų alergenai yra šie: enolazė, streso baltymai, ciklofilinai, vakuolių serino proteazės, peroksisomų baltymai,

redoksinai, disulfato izomerazės (Bowyer ir kt., 2006; Simon-Nobbe ir kt., 2008). Kryžminės reakcijos aprašytos ne tik tarp skirtingų mikroskopinių grybų rūšių ar genčių, bet ir tarp skirtingų karalysčių organizmų. Tokie grybų alergenai, kaip aldehyddehidrogenazė, šarminė serino proteazė, serino proteazė, enolazė, glutation-S-transferazė ir streso baltymas, turi atitinkamus homologinius specifinių IgE antikūnų sintezę sukeliančius baltymus ne tik grybų karalystei priklausančiuose organizmuose. Kai kurių tyrimų duomenimis, kryžminės reakcijos vyksta tarp mikroskopinių grybų ir žmonių baltymų – autoantigenų – kurie gali sukelti IgE antikūnų sintezę ir padidėjusio jautrumo reakcijas dėl molekulinės mimikrijos tarp B limfocitų epitopų. Autoantigenai – baltymai, kurių sekos homologiškos aplinkos alergenams, priklausantiems filogenetiškai konservatyvių baltymų klasei (Crameri, 2011a; Zeller ir kt., 2008). Aprašyti šie mikroskopinių grybų baltymai, turintys homologų žmogaus proteome: MnSOD, ciklofilinas, rūgštinis ribosominis baltymas P2 ir tioredoksinas (Simon-Nobbe ir kt., 2008).

Neaišku, kodėl kai kurie mikroorganizmai dažnai pasireiškia kaip alerginių susirgimų sukėlėjai, o kiti alerginiuose procesuose dalyvauja retai. Vienas iš galimų paaiškinimų tas, kad oportunistiniai grybai, skirtingai nuo patogeninių, sugeba išgyventi šeimininko odos ar gleivinių paviršiuje pakankamai ilgą laiką tarpą, kad susintetintų didesnę kiekį alergizuojančių baltymų (Aalberse, 2007; Bowyer ir kt., 2006; Woodfolk, 2005).

1.5 *Malassezia* gentis

Ilgą laiką *Malassezia* genties atstovų taksonominė padėtis buvo paini, kadangi šios mielės yra dimorfiniai mikroorganizmai, galintys egzistuoti mielių ir micelio fazėse. Šios dvi formos buvo laikomos skirtingomis rūšimis: *Pityrosporum* (mielės) ir *Malassezia* (micelis). 1977 metais trys skirtingos mokslininkų grupės indukavo mieles gaminti hifus *in vitro*. Remiantis šiuo atradimu buvo išskirtos dvi rūšys: *M. furfur* (apėmė *P. orbiculare*, *P. ovale* ir *M. furfur*) ir *M. pachydermatis* (*P. pachydermatis*). Tačiau *Malassezia* genties

taksonominė padėtis vis dar buvo nekonkreči. Šią situaciją 1996 metais išsprendė mokslininkai Guillot ir Gueho (Gueho ir kt., 1996). Jie surinko 104 *Malassezia* genties kamienus, atliko geno, koduojančio 26S rRNR subvienetą, sekoskaitą ir branduolinės DNR komplementarumo analizę. Atsižvelgiant į gautus rezultatus buvo išskirtos septynios rūšys: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* ir *M. pachydermatis* (Gueho ir kt., 1996). Keletas vėlesnių darbų patvirtino šią klasifikaciją ir ji taikoma iki šiol (Gupta ir kt., 2000; Makimura ir kt., 2000).

1.5.1 *Malassezia* taksonomija

Malassezia genties mielės priklauso bazidiomicetams (*Malasseziales*, *Ustilaginomycotina*, *Basidiomycota*) ir dauginasi nelytiniu būdu pumpuruojant motininei ląstelei (Ahearn, Simmons, 1998). Neseniai atliktos *M. globosa* ir *M. restricta* genomų sekoskaitos metu aptikti kryžminimąsi kontroliuojantys genai. Tai leidžia daryti prielaidą, kad *Malassezia* mielės geba daugintis lytiniu būdu (Xu ir kt., 2007).

Šiuo metu genčiai priskiriama 14 rūšių. Be ankščiau paminėtų septynių, papildomai aprašytos *M. dermatis* (Sugita ir kt., 2002), *M. japonica* (Sugita ir kt., 2003c), *M. yamatoensis* (Sugita ir kt., 2004), *M. nana* (Hirai ir kt., 2004), *M. equina*, *M. caprae* (Cabanes ir kt., 2007) ir *M. cuniculi* (Cabanes ir kt., 2011).

1.5.2 *Malassezia* genties mielių fiziologiniai požymiai

Malassezia genties mielės auginamos aerobinėmis sąlygomis, bet gali augti ir mikroaerobinėmis ar net anaerobinėmis sąlygomis (Faergemann, Bernander, 1981).

Malassezia nefermentuoja cukrų (Ahearn, Simmons, 1998). Jos augimui nebūtinai vitaminai, mikroelementai ar elektrolitai. Kaip azoto šaltinį panaudoja daugelį aminorūgščių, taip pat amonio druskas (Mayser ir kt., 1998a). Kaip

vienintelį sieros šaltinį gali naudoti metioniną, cistiną ar cisteiną (Ashbee, Evans, 2002).

Pirmą kartą *Malassezia* mieles 1846 metais aprašė Eichstedt'as (Eichstedt, 1846), bet išskirtas organizmas buvo tik 1927 metais (Panja, 1927). Kultivavimo sudėtingumą 1939 metais paaiškino Benham'as, kuris suprato, kad auginimo terpei reikia „riebių medžiagų“ (Benham, 1939). *Malassezia* genties mielės nesugeba pačios pasigaminti riebalų rūgščių ilgomis grandimis, todėl joms būtina jas gauti iš aplinkos (Ashbee, Evans, 2002). Augimą skatina daugelis sočiųjų riebalų rūgščių, kurių grandinė sudaryta iš 12–20 anglies atomų (Wilde, Stewart, 1968). Pastebėta, kad augimo metu naudojamas lipidų šaltinis turi įtakos mikroorganizmų riebalų rūgščių sudėčiai, todėl manoma, kad šios rūgštys nėra energijos šaltinis, bet tiesiogiai įterpiamos į ląsteles be tolimesnio jų metabolizmo (Ashbee, Evans, 2002). Visų *Malassezia* rūšių, išskyrus *M. pachydermatis*, augimui reikalingas aplinkoje esantis lipidų šaltinis (Batra ir kt., 2005).

1.5.3 *Malassezia* genties mielių identifikavimas biocheminiais ir fiziologiniais metodais

Dėl *Malassezia* genties mielių lipofiliškumo yra sudėtinga jas išskirti, kultivuoti ir identifikuoti. Kultivavimo sąlygos priklauso nuo rūšies. *M. furfur* ir *M. pachydermatis* laikomos nereikliausiomis iš *Malassezia* genties mielių, todėl dažniausiai yra išskiriamos taikant klasikinius mikrobiologinius metodus. Sudėtingiausia kultivuoti yra *M. restricta* ir *M. obtusa* (Batra ir kt., 2005).

Malassezia mielėms išskirti ir kultivuoti dažniausiai naudojamos trys mitybinės terpės: Dixon'o agarizuota mitybinė terpė (Van Abbe, 1964), modifikuota Dixon'o agarizuota mitybinė terpė (Midgley, 1989) arba Leeming'o ir Notman'o agarizuota mitybinė terpė (LNA) (Leeming, Notman, 1987). Šios mitybinės terpės savo sudėtyje turi jaučio tulžies, kuri yra būtina geram *Malassezia* mielių augimui (Kaneko ir kt., 2005), bei tvino 40 (Dixon'o, mDixon'o agarai) arba tvino 60 (LNA agaras). *M. pachydermatis* laikoma

vienintele *Malassezia* rūšimi, kurios augimui lipidai nebūtinai, bet ir jos sėkmingam kultivavimui reikia peptonu praturtintos mitybinės terpės (t.y. Saburo mitybinės terpės), kurioje yra trumpų grandinių riebalų rūgščių. Ankščiau *Malassezia* mielių išskyrimui naudota Saburo agarizuota terpė, praturtinta alyvuogių aliejumi. Pastebėjus, kad ant šios terpės gerai auga tik trys rūšys (*M. furfur*, *M. pachydermatis* ir *M. yamatoensis*), jos buvo atsisakyta (Gueho ir kt., 2010). Optimali *Malassezia* mielių augimo temperatūra yra 32–34 °C, nors auga ir 37 °C.

Malassezia genties mielės priklauso Basidiomycota, todėl nusidažo purpurine spalva dažant diazonio mėlynuoju B dažu (DBB reakcija). Šis testas atliekamas pirmiausia, siekiant atskirti *Malassezia* genties atstovus nuo bakterijų ir askomicetinių mielių (pav., *Candida* rūšių), kurios dažnai išskiriamos iš odos mėginių.

Unikalus *Malassezia* mielių lipidų poreikis naudojamas rūšims atskirti. Kamienai auginami Saburo agarizuotoje terpėje, praturtintoje vienu iš penkių lipidų šaltiniu: kremoforu EL, tvinais 20, 40, 60 arba 80. Kadangi šios medžiagos tirpsta vandenyje ir difunduoja į Saburo agarizuotą terpę, testas gali būti atliekamas vienu metu su visais penkiais lipidais. Lipidai, difunduodami mitybinėje terpėje, sukuria koncentracinį gradientą. Mielių augimas gali prasidėti arti šulinėlio su aukšta lipido koncentracija (matomas pilnas augimo diskas) arba šiek tiek toliau nuo šulinėlio, kur lipido koncentracija sumažėjusi (matomas kolonijų žiedas). Augimas taip pat gali prasidėti tam tikru atstumu nuo šulinėlio, bet progresuoti link jo. Kai kurių rūšių atveju šio progresinio augimo metu pastebimas tam tikros lipidų koncentracijos sukurtas inhibicinis žiedas, o vėliau vėl matoma antrinio augimo zona (Boekhout ir kt., 2010).

Malassezia rūšys identifikuojamos pagal: DBB ir katalazės reakcijas; β-gliukozidazės aktyvumą; fluorochromų ir pigmentų sintezę, naudojant triptofaną kaip vienintelį azoto šaltinį; augimą 37 °C ir 40 °C temperatūroje; augimą ant Saburo agarizuotos terpės be papildomo lipidų šaltinio; naudojant kremoforą EL, tvinus 20, 40, 60 arba 80, kaip vienintelius riebalų rūgščių

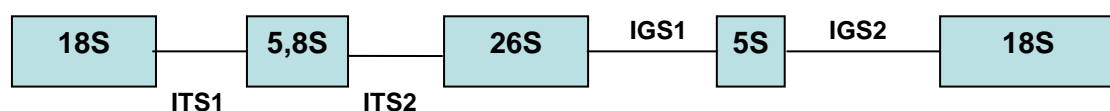
šaltinius (Gueho ir kt., 1996, 2010; Guillot ir kt., 1996; Mayser ir kt., 1997, 1998b, 2004).

Ši identifikacinė sistema nėra tobula, nes kai kurios rūšys sunkiai auga net ir „turtingoje“ mitybinėje terpėje, o tvinų testo rezultatus dažnai sunku įvertinti (Batra ir kt., 2005). Be to, literatūroje vis dažniau aprašomos naujos rūšys, kai kurių jų fiziologinės savybės tapačios. Daugėja duomenų apie netipinius *Malassezia* kamienus, pasižyminčius kitokiomis savybėmis nei referentinės rūšys (Cafarchia ir kt., 2007, 2011b; Crespo ir kt., 2000; Duarte ir kt., 2002; Gonzalez ir kt., 2009; Kaneko ir kt., 2007).

1.5.4 *Malassezia* genties mielių identifikavimas molekuliniais metodais

Malassezia genties mielėms identifikuoti ir genotipuoti naudojami molekuliniai metodai nurodyti 2 lentelėje.

Šiuo metu mielinių grybų molekuliniame sistematikoje dažniausiai naudojamas tiesioginės DNR sekoskaitos metodas. Rūšies apibūdinimui svarbu pasirinkti genetinį lokusą, kurio seka pakankamai skiriasi tarp skirtingų rūšių, bet turi minimalias variacijas rūšies viduje. Šiuos kriterijus geriausiai atitinka molekuliniame sistematikoje plačiai naudojami pirmas ir antras nekoduojantys rRNR vidinių transkribuojamų intarpų regionai ITS1 ir ITS2, bei 26S rRNR genas (2 pav.). Abiejų genų sekų analizė naudojama daugumai bazidiomicetinių mielių identifikuoti. Aprašyti atskiri atvejai, kai filogenetiškai artimos rūšys turėjo identišką 26S rRNR seką, bet skyrėsi ITS regionai, ir atvirkščiai (Cafarchia ir kt., 2011a; Scorzetti ir kt., 2002).



2 pav. rRNR koduojančių genų išsidėstymo schema.

2 lentelė. *Malassezia* genties mielėms identifikuoti ir genotipuoti naudojami molekuliniai metodai.

Metodas	Tirtos mielių rūšys	Gauti duomenys
ITS1 sekų analizė	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> <i>M. nana</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys (Makimura ir kt., 2000). Identifikuota nauja rūšis - <i>M. nana</i> (Hirai ir kt., 2004).
26S D1/D2 sekų analizė	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> <i>M. sympodialis</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys (Guillot ir kt., 2000). Nuo skirtingų gyvūnų odos išskirti <i>M. sympodialis</i> kamienai suformavo keturis genotipus (Cabanès ir kt., 2005).
IGS1 sekų analizė	<i>M. globosa</i> <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i>	Filogenetiniame medyje susiformavo keturios grupės. Dvejuose grupėse pasiskirstė nuo AD odos išskirti kamienai, trečią grupę sudarė nuo nepažeistos odos išskirti kamienai, o ketvirtoje grupėje išsidėstė tiek nuo AD, tiek nuo sveikos odos išskirti kamienai (Sugita ir kt., 2003a). Tirti kamienai susigrupavo pagal jų išskyrimo vietą: nuo AD paveiktos, SD paveiktos ar sveikos odos (Tajima ir kt., 2008).
chs-2 geno sekos analizė	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> <i>M. pachydermatis</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys (Kano ir kt., 1999). Kamienai susiskirstė į tris genotipus pagal jų sukeltas ligas (Cafarchia ir kt., 2007).
AFLP	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> ,	Identifikuotos visos tirtos rūšys. <i>M. furfur</i> kamienai išsiskyrė į keturis pogrupius pagal jų sukeltas ligas (Theelen ir kt., 2001).

	<i>M. obtusa</i>	
	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. dermatis</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys. <i>M. furfur</i> kamienai sudarė genotipus pagal jų išskyrimo geografinę vietą (Gupta ir kt., 2004b).
RAPD	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i>	Visose rūšyse gauti polimorfiniai profiliai. Neaptikta koreliacija su sukeliama susirgimais (Theelen ir kt., 2001).
	<i>M. furfur</i>	Gauti polimorfiniai profiliai, koreliuojantys su mielių sukeliama susirgimais (Gandra ir kt., 2006).
DGGE	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys. Neaptiktos vidurūšinės grupės (Theelen ir kt., 2001).
PFGE	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys. Vidurūšinės grupės nustatytos tik <i>M. furfur</i> (Theelen ir kt., 2001).
RFLP	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. nana</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. dermatis</i> , <i>M. yamatoensis</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys naudojant endonukleazes <i>Cfo</i> I ir <i>Ban</i> I (Oh ir kt., 2009).
tFLP	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i>	Identifikuotos visos tirtos rūšys (Gemmer ir kt., 2002).

ITS1, pirmas vidinis transkribuojamas intarpas; 26S D1/D2, didžiojo ribosominio subvieneto variabilūs domenai D1 ir D2; IGS1, pirmas tarpgentinis intarpas; *chs-2*, chitino sintazę koduojantis genas; AFLP, amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas; RAPD, atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR; DGGE, elektroforezė denatūruojančiame gelyje; PFGE, pulsuojančio lauko elektroforezė; RFLP, restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas; tFLP, galinių fragmentų ilgio polimorfizmas.

Didžiojo ribosominio subvieneto D1/D2 domenai apima maždaug 600 nukleotidų variabilų regioną, esantį 26S rRNR geno 5'-gale. Eksperimentiškai nustatyta, kad tos pačios rūšies atstovų D-domenų sekų panašumas yra $\geq 99\%$, o analizuojant sekas gauti duomenys koreliuoja su DNR hibridizacijos metodu gautais rezultatais (Fell ir kt., 2000; Scorzetti ir kt., 2002).

ITS lokusas išsidėstęs tarp 18S ir 26S rRNR genų (2 pav.). Jis skirstomas į ITS1 regioną, skiriantį 18S ir 5,8S rRNR genus bei ITS2 - esantį tarp 5,8S ir 26S rRNR genų. 18S ir 26S rRNR genų sekų ilgiai yra identiški visoms mielinų grybų rūšims, tuo tarpu ITS sekų ilgiai yra rūšiai specifiniai. 1999 metais mokslininkų grupė ITS regionų pagalba identifikavo *Trichosporon* rūšis ir nustatė, kad su retomis išimtimis konspecifinėse rūšyse šių regionų nukleotidų sekų panašumas yra $\sim 99\%$. Vėlesnių tyrimų metu pastebėta, kad kai kurioms rūšims (tame tarpe ir *Malassezia* genties atstovams) būdingas vidurūšinis šių sekų variabilumas, galintis siekti 3 %. Remiantis šiais duomenimis, buvo pasiūlyta kamieną priskirti atitinkamai rūšiai, jei jo ir referentinio rūšies kamieno ITS sekų panašumas $\geq 97\%$ (Cabanes ir kt., 2005; Makimura ir kt., 2000; Scorzetti ir kt., 2002; Sugita ir kt., 1999).

Pirmo tarpgeninio intarpo IGS1 sekų analizė rūšims identifikuoti naudojama retai, kadangi ši sritis pasižymi dideliu vidurūšiniu variabilumu. Literatūros duomenimis, IGS1 sekų analizė taikytina siekiant sugrupuoti mielių kamienus pagal jų pasiskirstymą ant sveikos bei seborėjinio ir atopinio dermatitų paveiktos odos. Aprašyta, kad analizuojant IGS1 sekas *M. globosa* ir *M. restricta* kamienai susitelkia į atskiras grupes priklausomai nuo jų išskyrimo vietos (Sugita ir kt., 2003a; Tajima ir kt., 2008). IGS1 sekų analizė taip pat naudota siekiant sugrupuoti *M. nana* kamienus pagal jų geografinę kilmę, bet šiuo atveju vidurūšinis polimorfizmas nenustatytas (de Bellis ir kt., 2010).

Chitino sintazę koduojantis genas (*chs-2*) taip pat naudojamas *Malassezia* genties mielėms identifikuoti, nors jo sekos pasižymi dideliu tarprūšiniu panašumu (95 %). Chitino sintazę koduojančio geno sekų analizė leido suskirstyti *M. pachydermatis* kamienus į tris genotipus, kurie susiję su

skirtingais šios rūšies mielių sukeliama susirgimais (Cafarchia ir kt., 2007; Kano ir kt., 1999) .

Kaip minėta anksčiau, *Malassezia* genties mieles sudėtinga kultivuoti, todėl ieškoma molekulinų metodų, kurie leistų greitai ir tiksliai jas identifikuoti. Literatūros duomenimis, keleto tyrimų metu *Malassezia* mielėms identifikuoti naudotas amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmo metodas (AFLP). AFLP analizės metu kiekvienos *Malassezia* rūšies kamienai išsiskyrė į genetinius pogrupius pagal klinikinę ir geografinę izoliatų kilmę. Autorių nuomone, kai tiriama didelė imtis, AFLP analizė tinkama identifikacijai, bet ji užima daug laiko, todėl rutiniuose klinikiniuose tyrimuose šis metodas nepritaikomas (Gupta ir kt., 2004b; Theelen ir kt., 2001).

Kelios mokslinės grupės naudojo atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (RAPD) metodą *Malassezia* mielėms identifikuoti. Rezultatai nevienareikšmiai. Vienų tyrimų metu gauti *Malassezia* kamienų polimorfiniai profiliai, kurie priklausė nuo izoliatų geografinės kilmės, šeimininko (t.y. žmogus ar gyvūnas), mėginio paėmimo vietos ir sukeliama susirgimo (Duarte, Hamdan, 2010; Gandra ir kt., 2006). Kito eksperimento metu taip pat gauti polimorfiniai profiliai, bet neaptikta jokios koreliacijos su mielių sukeliama susirgimais (Theelen ir kt., 2001).

Elektroforezė denatūruojančiame gelyje (DGGE) ir pulsuojančio lauko elektroforezė (PFGE) taip pat taikytos *Malassezia* genties mielėms apibūdinti. PFGE metodas tinka kamienams identifikuoti, kadangi skirtingų rūšių atvejais gaunami skirtingi kariotipai, bet nėra variacijos rūšies viduje. Nepaisant metodo tikslumo, jis retai naudojamas diagnostikoje dėl brangios ir sudėtingos analizės (Boekhout ir kt., 1998; Theelen ir kt., 2001).

Aprašyta, kad restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmo (PCR-RFLP) metodu analizuojant 26S, ITS1 ir ITS2 DNR sritis identifikuota 11 *Malassezia* rūšių. Taip pat nustatyta, kad *M. furfur* kamienai pasižymi geografine variacija: izoliatai, kurie buvo išskirti pietinėse ir rytinėse Europos šalyse, neturėjo *Ban I* restriktažės kirpimo vietos ITS2, kuo pasižymėjo iš kitų Europos regionų gauti kamienai (Gaitanis ir kt., 2009; Oh ir kt., 2009).

Galinių fragmentų ilgio polimorfizmo (tFLP) metodas taip pat naudojamas *Malassezia* rūšims identifikuoti ir genotipuoti. Analizės metu išskiriama mielių DNR, vykdoma rDNR PGR reakcija, po kurios produktas amplifikuojamas naudojant ITS1- ir ITS2- specifinius fluorescentiniais dažais žymėtus pradmenis. Gautų produktų ilgiai analizuojami fluorescentiniu DNR sekvenatoriumi. tFLP metodas patogus dėl to, kad atlikus analizę kiekvienai mėginyje buvusiai rūšiai gaunami tik du žymėti fragmentai, todėl metodą galima naudoti mišrių mėginių atveju. Pažymėtina, kad amplifikacijoms naudojami mikroskopiniams grybams universalūs pradmenys, o DNR ekstrakcija gali būti vykdoma tiesiogiai nuo paimto klinikinio mėginio be tolimesnio kultivavimo mitybinėje terpėje, kas dar labiau padidina metodo patrauklumą. Pagrindinis metodo trūkumas yra tas, kad jam atlikti reikalinga labai specializuota įranga (Gemmer ir kt., 2002).

Visi ankščiau išvardyti molekuliniai metodai yra tinkami *Malassezia* genties mielėms identifikuoti, bet daugumos jų pritaikymas klinikinėse laboratorijose yra ribotas dėl brangios ir sudėtingos analizės. Mikroskopinių grybų rūšims ir kamienams identifikuoti dažniausiai naudojamos ITS bei 26S rRNR D1/D2 sričių sekų analizė. Šios DNR sritys yra palyginus trumpos (~600 bazių porų), bet jų polimorfizmas leidžia identifikuoti kamienus tiek vidurūšiniame, tiek tarprūšiniame lygmenyje. Metodas patrauklus ir tuo, kad PGR metu naudojami visiems bazidiomicetiniams grybams universalūs pradmenys.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Reagentai, rinkiniai

Darbe naudoti reagentai ir cheminių medžiagų rinkiniai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Naudoti reagentai ir cheminių medžiagų rinkiniai.

Reagentai	Gamintojai
Agaras, cikloheksimidas, glicerolis, gliukozė, KCl, KH_2PO_4 , mielių ekstraktas, NaCl, natrio acetatas, natrio azidas, Na_2HPO_4 , oleino rūgštis, ortofenilendiaminas, salyklo ekstraktas, L-triptofanas, triptonas, tvinas 20, tvinas 40, tvinas 60, tvinas 80	Merck, Vokietija
Alyvuogių aliejus, jaučio serumo albuminas, kremoforas EL, diazonio mėlynasis B, tulžies druskos	Sigma-Aldrich, JAV
Ampicilinas, chloramfenikolis, sieros rūgštis, N,N-dimetilformamidas, vandenilio peroksidas	Roth, Vokietija
Bakteriologinis peptonas	Oxoid, Anglija
Biotinu žymėti pelės antikūnai prieš žmogaus IgE	BD Biosciences, JAV
DNR ekstrakcijos iš gelio rinkinys #K0513, genominės DNR skyrimo rinkinys #K0512, IPTG, MassRuler™ DNA Ladder Mix (Linijinių DNR fragmentų ilgio standartas), PGR klonavimo rinkinys #K1214, streptavidinas (žymėtas krienų peroksidaze), X-Gal	Thermo Fisher Scientific, JAV
Eskulinas, geležies amonio citratas	AppliChem, Vokietija
Glicerolio monostearatas	Alfa Aesar, Vokietija
Mielių identifikavimo sistema Api ID32C	BioMerieux, Prancūzija
Streptavidin-PE-Cy5	BD Pharmingen

2.2 Terpės, tirpalai, buferiai

Darbe naudotos mitybinės terpės ir jų sudėtis (1 l vandens) pateiktos 4 lentelėje, o tirpalai ir buferiai – 5 lentelėje.

4 lentelė. Naudotos mitybinės terpės.

Gliukozės, peptono, mielių ekstrakto agarizuota terpė (GPY)	Gliukozė	40 g
	Bakteriologinis peptonas	5 g
	Mielių ekstraktas	5 g
	Agaras	20 g
	Chloramfenikolis	50 mg
Modifikuota Leeming'o ir Notman'o agarizuota terpė (mLNA)	Gliukozė	10 g
	Bakteriologinis peptonas	10 g
	Tulžies druskos	8 g
	Mielių ekstraktas	2 g
	Glicerolio monostearatas	0,5 g
	Glicerolis	10 ml
	Tvinas 60	5 ml
	Alyvuogių aliejus	20 ml
	Agaras	15 g
	Chloramfenikolis	50 mg
Cikloheksimidas	50 mg	
Modifikuota Dixon'o agarizuota terpė (mDA)	Salyklo ekstraktas	36 g
	Bakteriologinis peptonas	10 g
	Tulžies druskos	20 g
	Tvinas 40	10 ml
	Glicerolis	2 ml
	Oleino rūgštis	2 ml
	Agaras	15 g
	Chloramfenikolis	50 mg
Cikloheksimidas	50 mg	
Eskulino agarizuota terpė	Bakteriologinis peptonas	10 g
	Geležies amonio citratas	1 g
	Eskulinas	1 g
	Agaras	15 g
Saburo agarizuota terpė (SGA)	Gliukozė	20 g
	Bakteriologinis peptonas	10 g
	Agaras	15 g

Pigmentų indukcijos agarizuota terpė (p-agaras)	Tvinas 80 Agaras L-Triptofanas	30 ml 20 g 15 mmol
Salyklo, mielių ekstrakto, gliukozės, peptono agarizuota terpė (MYGP)	Salyklo ekstraktas Mielių ekstraktas Bakteriologinis peptonas Gliukozė Agaras	3 g 3 g 5 g 10 g 20 g
LB agarizuota terpė	Triptonas Mielių ekstraktas NaCl Agaras Ampicilinas	10 g 5 g 10 g 15 g 50 mg
SOC terpė	Triptonas Mielių ekstraktas NaCl Gliukozė KCl	20 g 5 g 0,5 g 3,6 g 0,186 g

5 lentelė. Naudoti tirpalai ir buferiai.

DBB reagento darbinis tirpalas (laikomas lede ir ruošiamas prieš pat jo panaudojimą)	Diazonio mėlynasis B 0,1 M TRIS-HCl, pH 7,0	1 mg 1 ml
IPTG darbinis tirpalas	IPTG Distiliuotas vanduo	1,2 g 50 ml
X-Gal darbinis tirpalas	X-Gal N,N-dimetilformamidas	20 mg 1 ml
PBS (pH 7,4)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ Distiliuotas vanduo	8 g 0,2 g 1,44 g 0,24 g 1000 ml
PBS-0,1 % Tvinas 20	PBS (pH 7,4) Tvinas 20	100 ml 0,1 ml
BSA darbinis tirpalas	Jaučio serumo albuminas PBS (pH 7,4)	1 g 100 ml

PBS-T	PBS (pH 7,4) Tvinas 20	100 ml 0,05 ml
Acetatinis buferis 0,025 M (pH 5,5)	NaCOOCH ₃	
Ortofenilendiamino/H ₂ O ₂ substratas	Acetatinis buferis 0,025 M H ₂ O ₂ 30 % Ortofenilendiaminas	10 ml 0,01 ml 0,012 g
Dažymo buferinis tirpalas	PBS (pH 7,4) Jaučio serumas Natrio azidas	100 ml 2 ml 0,1 g

2.3 Tiriamieji asmenys

Mėginiai imti Alerginių susirgimų diagnostikos ir gydymo centre (Vilnius, Lietuva). Iš viso paimtas 241 mikrobiologinis pasėlis nuo tiriamųjų asmenų, kuriems nustatytas atopinis dermatitas, odos. Mėginiai suskirstyti į keturias grupes pagal tiriamų asmenų amžių ir AD pažeistas kūno vietas (6 lentelė).

Tyrime dalyvavo ir 40 AD nesergančių asmenų, nuo kurių odos paimti mikrobiologiniai pasėliai naudoti kaip neigiamos kontrolės.

Tiriamųjų asmenų paprašyta nevartoti priešgrybelinių preparatų ir hormoninių tepalų mažiausiai keturias savaites prieš paimant pasėlį. Lietuvos Bioetikos Komitetas leido atlikti tyrimą (1 priedas). Tiriamieji asmenys (arba jų tėvai (globėjai) pasirašė sutikimo dalyvauti tyrime formą.

Prieš tirtas mieles nukreiptų specifinių IgE antikūnų nustatymui paimti kraujo serumai iš 34 asmenų, kuriems nustatytas AD: 15 vyrų, 19 moterų; 16–65 metų amžiaus (vidutinis amžius $36,7 \pm 11,7$ metai). 19 šių serumų turėjo prieš namų dulkių erkių *D. pteronyssinus* ir *D. farinae* alergenų D1 ir D2 (kaip nustatyta Immulite[®] 2000 3GAllergy[™]) nukreiptus specifinius IgE antikūnus ($>0,7$ kU/l), o 15 – neturėjo ($<0,35$ kU/l). Neigiamai kontrolei imti serumai iš 14 AD nesergančių asmenų: 10 vyrų, 4 moterų; 16–65 metų amžiaus (vidutinis amžius $33,6 \pm 7,8$ metai).

6 lentelė. Mėginių suskirstymas į grupes.

Grupės	Viso tirta	Vyrai/ moterys	Vid. amžius metais ± SN
I grupė (pasėliai imti nuo 2–16 metų amžiaus AD sergančių asmenų rankų ar kojų)	69	35/34	5,8±4,3
II grupė (pasėliai imti nuo 2-16 metų amžiaus AD sergančių asmenų veido, kaklo ar liemens)	63	30/33	4,9±3,9
III grupė (pasėliai imti nuo 16–65 metų amžiaus AD sergančių asmenų rankų ar kojų)	58	23/35	33,9±10,7
IV grupė (pasėliai imti nuo 16–65 metų amžiaus asmenų veido, kaklo ar liemens)	51	19/32	36,7±11,2

2.4 Mielių kamieniai

Imunologinėje analizėje naudoti nuo atopinio dermatito pažeistos odos išskirti mielių kamieniai: *Candida famata* C94; *Candida pelliculosa* C18; *Candida parapsilosis* C230; *Candida quilliermondii* C65; *Rhodotorula rubra* R345; *Malassezia furfur* M33; *Malassezia furfur* M47.

2.5 Mielių identifikavimas klasikiniiais mikrobiologiniais metodais

Mėginių paėmimas ir pirminis išsėjimas

Pavyzdžiai imti nuo 5 cm² atopinio dermatito pažeistos odos ploto vatos tamponu, išsėti į transportinę mitybinę terpę ir per 1–2 valandas pristatyti į laboratoriją, kur jie išsėti ant GPY ir mLNA agarizuotų terpių. Auginta 32 °C dvi savaites.

DBB reakcija

Ant GPY ir (ar) mLNA agarizuotų terpių užaugusios kolonijos štrichais persėtos ant MYGP agarizuotos terpės ir augintos 32 °C 10 dienų. Po to lėkštelės su kultūromis palaikytos dvi valandas 55 °C temperatūroje ir apipiltos

šaltu DBB reagentu. Jei kultūra per 2 min. kambario temperatūroje nusidažė tamsiai raudona spalva, reakcija laikyta teigiama (Boekhout ir kt., 2010).

Katalazės reakcija

Ant objektinio stiklelio pernešta tiriamos kultūros kolonija ir užlašintas lašas vandenilio peroksido. Reakcija laikyta teigiama, jei matėsi kylantys į paviršių burbuliukai, susidarę nuo išsiskyrusio laisvojo deguonies (Boekhout ir kt., 2010).

β-gliukozidazės reakcija

Mėgintuvėlyje paruošta eskulino agarizuota terpė užsėta duriant jį mikrobiologine kilpele su tiriamą kultūrą. Auginta 37 °C 5 dienas. Jei terpė pajuodavo, reakcija laikyta teigiama (Boekhout ir kt., 2010).

Pigmentų ir fluorochromų gamyba naudojant triptofaną kaip vienintelį azoto šaltinį

Tiriama kultūra išsėta ant p-agaro ir auginta 32 °C temperatūroje iki 15 dienų. Reakcija laikyta teigiama, jei į terpę išsiskyrė rudas pigmentas, o apšvietus UV šviesa mielių kolonijos fluorescavo gelsvai-žalia spalva (Mayser ir kt., 1998b, 2004).

Augimas 40 °C temperatūroje

Kultūros užsėtos ant mLNA arba mDA agarizuotų terpių. Auginta 40 °C temperatūroje iki 14 dienų.

Tvinių 20, 40, 60, 80 ir kremoforo EL įsisavinimas kaip vienintelio lipidų šaltinio

Į 18 ml 50 °C temperatūros SGA terpę įmaišyta 2 ml sterilaus distiliuoto vandens su jame suspenduota tiriamą kultūrą (1 mikrobiologinė kilpa/ml) ir išpilstyta į sterilias Petri lėkšteles. Agarui sustingus, išpjauti penki 2 mm skersmens šulinėliai ir į juos išpilstyta po 15 μl tvino 20, tvino 40, tvino 60,

tvino 80 ir kremoforo EL. Auginta 7 dienas 32 °C temperatūroje (Gueho ir kt., 1996; Guillot ir kt., 1996).

Mielių identifikavimas asimiliaciniais testais

Mielių identifikavimo sistemą Api ID32C sudaro 32 tyrimo šulinėliai, kurių kiekviename yra po vieną dehidratuoto angliavandenio substratą. Šulinėliai užpildyti tiriamosios kultūros suspensija. Auginta 24–48 val. (pagal gamintojo rekomendacijas). Augimas kiekviename šulinėlyje įvertintas vizualiai. Identifikavimas atliktas naudojantis identifikavimo programine įranga mini API.

2.6 *Malassezia* kamienų identifikavimas molekuliniiais metodais

Genominės DNR skyrimas

Teigiama DBB reakcija pasižymėjusios mielės augintos ant mLNA agarizuotos terpės 32 °C penkias dienas. 10–20 mg tiriamos kultūros suspenduota 200 µl sterilaus distiliuoto vandens. Toliau genominė DNR skirta naudojant Genominės DNR skyrimo rinkinį #K0512 pagal gamintojo rekomendacijas.

Genominės DNR pagausinimas

Didžiojo rRNR subvieneto D1/D2 domenų sekoms pagausinti naudoti standartiniai pradmenys F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') ir LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') (Fell ir kt., 2000). rDNR geno ITS1 ir ITS2 regionų sekoms pagausinti naudoti pradmenys pITS-F (5'-GTC GTA ACA AGG TTA ACC TGC GG-3') ir pITS-R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Sugita ir kt., 1999). Genominė DNR pagausinta Eppendorf PCR sistema esant tokioms sąlygoms: pradinė denatūracija 95°C/2 min.; denatūracija 95 °C/1 min., lydymas 50 °C/2 min., elongacija 72 °C/3 min. (29 ciklai); galutinė elongacija 72 °C/7 min.

PGR produkto ekstrakcija

PGR produkto elektroforezė agarozės gelyje TE buferyje vykdyta pagal standartines metodikas (Sambrook, Russell, 2001). DNR koncentracija nustatyta vizualiai UV šviesoje lyginant su žinomos koncentracijos linijinių DNR fragmentų ilgio standartu MassRuler™ DNA Ladder Mix. DNR mėginys išpjautas iš agarozės, pasvertas ir patalpintas į plastikinį mėgintuvėlį. Toliau DNR ekstrakcija vykdyta naudojant DNR ekstrakcijos rinkinį #K0513 pagal gamintojo rekomendacijas.

PGR produkto transformacija ir plazmidinės DNR išskyrimas

PGR produktas įliguotas į plazmidinį vektorių pTZ57R/T naudojant PGR klonavimo rinkinį #K1214 pagal gamintojo rekomendacijas. Ligatas transformuotas į *Escherichia coli* kamieno DH5α ląsteles elektroporacijos būdu: šaltuose steriliuose mėgintuvėliuose sumaišyta 40 μl kompetentinės kultūros ir 2 μl ligato. Mišinys perkeltas į atšaldytas 2 mm elektroporacijos kiuvetes. Elektroporacija atlikta 2500 V 5 ms. Tuomet ląstelės perkeltos į mėgintuvėlius su SOC terpe. Inkubuota 37 °C vieną valandą. Mėginiai išsėti ant LB agarizuotos terpės. Auginta 37 °C 24 val. Transformantai atrinkti naudojant mėlynų-baltų kolonijų testą (X-Gal ir IPTG dėta pagal standartines rekomendacijas) (Sambrook, Russell, 2001).

Plazmidinė DNR iš *E. coli* skirta standartiniu šarminės lizės metodu (Sambrook, Russell, 2001).

DNR sekoskaita ir sekų analizė

DNR sekoskaita atlikta Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre (Vilnius, Lietuva) naudojant BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit rinkinį ir genetinį analizatorių 3130xl (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands).

DNR sekų analizė atlikta naudojantis programiniu paketu MEGA 4.0 (Tamura ir kt., 2007). Genetiniai atstumai paskaičiuoti naudojant Maximum

Composite Likelihood metodą (Tamura ir kt., 2004), o filogenetiniai medžiai sukonstruoti naudojant kaimynų apjungimo metodą (Saitou, Nei, 1987).

2.7 Imunologiniai metodai

Mielių ekstrakto paruošimas

Kamienai auginti GPY mitybiniame buljone (*R. rubra*, *C. pelliculosa*, *C. famata*, *C. guilliermondii*) ir mLNA mitybiniame buljone (*M. furfur*) 35 °C temperatūros purtyklėje keturias dienas. Mielių ląstelės suardytos naudojant BBx24 Bullet Blender[®] homogenizatorių (Next Advance, Inc., JAV). Naudota gamintojo rekomenduota metodika *Candida albicans* homogenizacijai. Po ląstelių ekstrakcijos homogenizatas atskirtas nuo nuosėdų ir cirkonio rutuliukų centrifuguojant 800 g 5 min. Baltymų koncentracija ekstraktuose nustatyta spektrofotometriškai matuojant 280 nm bangos ilgio šviesoje. Ekstraktai skiesti su PBS tiek, kad galutinė baltymų koncentracija juose būtų 250 µg/ml ir laikomi -20 °C temperatūroje.

Imunofermentinė analizė (ELISA)

Mielių ekstraktai skiesti PBS dešimt kartų ir po 100 µl išpilstyti į 96 šulinėlių ELISA plokšteles (Greiner Bio-one, Vokietija). Ekstraktų (antigenų) sorbcija vykdyta 24 val. 4 °C temperatūroje. Tuščios, antigenų neužimtos ELISA plokštelės vietos padengtos jaučio serumo albuminu (150 µl 1 % jaučio serumo albumino tirpalo). Tiriamieji serumai skiesti PBS-0,1 % Tvino 20 santykiu 1:10, išpilstyti po 100 µl į šulinėlius ir laikyti 24 val. 4 °C temperatūroje. Antriniai antikūnai (biotinu žymėti pelės antikūnai prieš žmogaus IgE antikūnus) skiesti PBS-T santykiu 1:600 ir išpilstyti į šulinėlius po 50 µl. Plokštelė inkubuota ant purtyklės 30 min. Į plokštelės šulinėlius išpilstyta po 50 µl krienų peroksidaze žymėto streptavidino ir inkubuota 30 min. ant purtyklės. Prisijungęs konjugatas nustatytas pagal spalvinę reakciją naudojant ortofenilendiamino/H₂O₂ substratą (100 µl). Fermentinė reakcija

sustabdyta įpylus 50 µl 2 M H₂SO₄. Absorbancija matuota 492 nm ilgio bangos šviesoje daugiakanaliu spektrofotometru Synergy 2 (BioTek, JAV).

Po kiekvienos inkubacijos šulinėlių turinys buvo iškratomas ir perplaunamas tris kartus, įpilant į kiekvieną šulinėlį po 200 µl PBS-T buferinio tirpalo. Kaip neigiama kontrolė naudotas PBS. Kitos naudotos kontrolės: tik antigeno, tik serumo arba tik konjugato. Kiekvienas testas kartotas du kartus.

Optinis tankis (OT) apskaičiuotas pagal formulę:

$OT = (A - K) - (B - K)$; kur A = mėginio dviejų pakartojimų vidutinis OT;
K = neigiamos kontrolės OT; B = neigiamos kontrolės (be serumo) dviejų pakartojimų vidutinis OT.

Konkurentinė imunofermentinė analizė

Konkurentinė imunofermentinė analizė atlikta siekiant įvertinti numanomą kryžminį antigeniškumą tarp keturių mielių rūšių. Kaip inhibuojantys skystosios fazės antigenai naudoti keturių mielių rūšių ekstraktai (baltymų koncentracija 75 µg/ml PBS buferyje). Sumaišyti trijų AD sergančių žmonių kraujo serumai (reaguojantys su visais atrinktais mielių ekstraktais) ir skiesti su inhibuojančiais skystosios fazės antigenais santykiu 1:10. Po 24 val. inkubacijos 4 °C temperatūroje serumų mišiniai perkelti į kietosios fazės antigenais padengtus mikroplokštelės šulinėlius (dengta po 100 µl atrinktų mielių ekstraktais, kuriuose baltymų koncentracija 25 µg/ml PBS buferyje). Tolesni žingsniai tokie pat, kaip imunofermentinėje analizėje. Kaip neigiama kontrolė naudotas PBS. Kiekvienas testas kartotas du kartus.

Inhibicija apskaičiuota pagal formulę:

$Inhibicija (\%) = (A/B) \times 100$; kur A = OT mėginio, inkubuoto su inhibuojančiais skystosios fazės antigenais; B = OT mėginio, neinkubuoto su inhibuojančiais skystosios fazės antigenais.

Immulite[®] inhibicinė analizė

Immulite[®] inhibicinė analizė atlikta siekiant nustatyti numanomą kryžminį antigeniškumą tarp keturių mielių rūšių ir namų dulkių erkių alergenų. Sumaišyti dviejų AD sergančių žmonių kraujo serumai (turintys specifinių IgE antikūnų prieš namų dulkių erkių alergenų D1 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) ir D2 (*Dermatophagoides farinae*). Serumų mišinys skiestas su tiriamais mielių ekstraktais (su kiekvienos mielių rūšies ekstraktu atskirai) ir išpilstytas į mikroplokštelės šulinėlius, atitinkamai padengtus tokiu pačiu mielių ekstraktu (25 µg/ml). Inkubuota 4 °C temperatūroje 24 val. Šis pirminis inkubavimas atliktas siekiant adsorbuoti prieš mieles nukreiptus specifinius IgE antikūnus (prijungiant juos prie kietosios fazės antigenų) ir (arba) blokuoti prieš mieles nukreiptų specifinių IgE antikūnų epitopus (antikūnams susijungiant su skystoje fazėje esančiais antigenais). Kontrolei serumų mišinys skiestas ir inkubuotas su PBS (vietoje mielių ekstrakto). Po pirminio inkubavimo serumų mišiniai tirti Immulite[®] 2000 3GAllergy[™] (Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd., Anglija) pagal gamintojo metodikas siekiant nustatyti specifinius IgE antikūnus prieš D1 ir D2 alergenų.

Inhibicija apskaičiuota pagal formulę:

Inhibicija (%) = $(A/B) \times 100$; kur A = specifinių IgE antikūnų kiekis (kU/l) serumų mišinyje inkubuotame su mielių ekstraktu; B = specifinių IgE antikūnų kiekis (kU/l) serumų mišinyje inkubuotame su PBS.

Tėkmės citometrija

Sumaišyta 100 µl serumo, praskiesto dažymo buferiniu tirpalu (1:10), su 5 µl mielių ląstelių suspensijos (10^7 ląst./ml). Inkubuota 4 °C temperatūroje 24 val. Nucentrifuguotos ir dažymo buferiniu tirpalu praplautos ląstelės sumaišytos su 20 µl biotinu žymėtų pelės antikūnų prieš žmogaus IgE antikūnus (100× praskiestų dažymo buferiniu tirpalu). Inkubuota 0,5 val. lede. Dažymo buferiniu tirpalu praplautos ir nucentrifuguotos ląstelės resuspenduotos 20 µl streptavidino, konjuguoto su fluorochromu (200×

praskiesto dažymo buferiniu tirpalu). Ląstelės inkubuotos 0,5 val. tamsoje ant ledo, pridėta 200 µl dažymo buferinio tirpalo ir analizuota tėkmės citometru FACS Calibur (BD Biosciences, JAV). Neigiamai kontrolei vietoje serumo ląstelės inkubuotos su dažymo buferiniu tirpalu.

2.8 Statistinė analizė

Skaičiavimai atlikti naudojantis standartinėmis statistikos skaičiavimo programomis *SPSS 15.0* ir *STATISTICA 6*. Mielių paplitimui žmonių amžiaus grupėse ir kūno dalyse įvertinti naudoti Stjudent'o *t*-testas ir porinis (priklausomas) *t*-testas. Imunofermentinės analizės rezultatų vidurkių tarp grupių palyginimai atlikti pagal Mann-Whitney *U* kriterijų. Immulite[®] inhibicijos analizės rezultatų statistinė koreliacija tarp grupių vertinta pagal Spearman'o koreliacijos eiliškumo kriterijų. Statistiškai patikimais laikyti rezultatai, kurių reikšmingumo lygmuo buvo $P < 0,05$.

3. DARBO REZULTATAI

Siekiant nustatyti mielių rūšių paplitimą ant AD pažeistos odos, buvo paimti mikrobiologiniai pasėliai nuo 241 asmens (vienas pasėlis nuo vieno tiriamojo). Kontrole naudoti mikrobiologiniai pasėliai, paimti nuo 40 AD nesergančių asmenų odos. Mėginiai išsėti ant dviejų standžių mitybinių terpių: GPY ir mLNA. Užaugusios mielių kolonijos identifikuotos klasikiniiais mikrobiologiniais metodais. Keturi *Malassezia* genčiai priklausantys izoliatai pasižymėjo netipinėmis savybėmis, todėl įprastiniai fiziologiniai ir biocheminiai metodai, paprastai naudojami *Malassezia* mielių apibūdinimui rūšies lygmenyje, netiko jų identifikacijai. Šiems kamienams atpažinti papildomai naudoti molekuliniai metodai.

3.1 Netipinių *Malassezia* kamienų identifikavimas

Trys iš keturių išskirtų netipinių *Malassezia* genties kamienų (M47, M54 ir M235) pasižymėjo panašiomis morfologinėmis ir fiziologinėmis savybėmis, kas leido juos preliminariai priskirti tai pačiai rūšiai. Šiuos izolatus galima buvo apibūdinti kaip *M. furfur*, kadangi jie pasižymėjo visomis šiai rūšiai būdingomis fiziologinėmis savybėmis, išskyrus tai, kad jie augo terpėje be papildomo lipidų šaltinio. DNR sekų analizės rezultatai patvirtino, kad tai netipinėmis savybėmis pasižymintys *M. furfur* kamieniai.

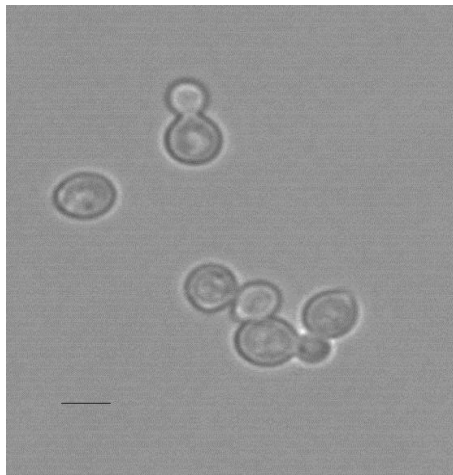
M. furfur netipinis kamienas M47 deponuotas Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA), kurioje jam suteiktas identifikacinis kodas ATCC MYA-4874.

Ketvirtą netipinį *Malassezia* (M8) izoliatą, remiantis jo fiziologinėmis savybėmis, galima buvo priskirti *M. nana* rūšiai, tačiau ši rūšis paplitusi tarp gyvūnų ir niekada nėra išskirta nuo žmonių odos. Molekuliniiais identifikavimo metodais nustatyta, kad šis kamienas yra artimiausias *M. restricta* rūšiai.

M. restricta netipinis izolatas M8 deponuotas Japonijos mikroorganizmų kolekcijoje (Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan).

3.1.1 *Malassezia furfur* netipinių kamienų identifikavimas klasikiniiais mikrobiologiniais metodais

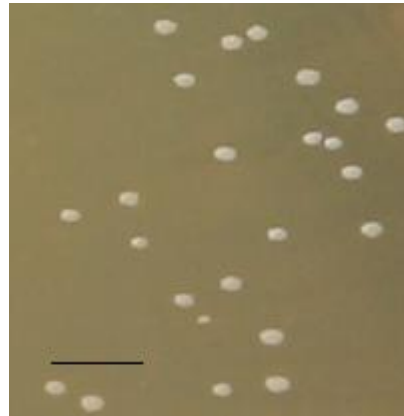
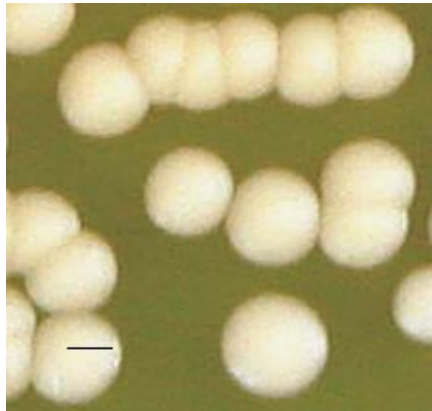
Po penkių dienų inkubacijos 32 °C ant mLNA mitybinės terpės *M. furfur* netipiniai kamienai suformavo baltas, kremines, 2–3 mm skersmens kolonijas lygiu paviršiumi. Mikroskopuojant ląstelės buvo apvalios, matėsi monopolinis pumpuravimas plačiajame poliuje. Ląstelių skersmuo varijavo 2,2–4,0 μm (3 pav.).



3 pav. *M. furfur* kamieno M47 vegetatyvinės ląstelės. Skalė 2 μm.

Buvo įvertintas šio kamieno augimas mitybinėse terpėse, kuriose vieninteliu lipidų šaltiniu naudoti kremoforas EL, tvinai 20, 40, 60 arba 80. Kolonijos pasižymėjo teigiama katalazės reakcija ir β-gliukozidazės aktyvumu. Kamienai aktyviai sintetino fluorochromus ir pigmentus terpėje, kurioje vieninteliu azoto šaltiniu naudotas triptofanas. Literatūros duomenimis, *M. furfur* yra vienintelė *Malassezia* genties atstovė, gebanti išskirti rudus su gelsvai žalsvu atspalviu pigmentus, ją auginant terpėje, kurioje triptofanas yra vienintelis azoto šaltinis. Kolonijos augo tiek 37 °C, tiek 40 °C temperatūroje. Daugeliu atžvilgiu šie kamienai fiziologiniu požiūriu buvo panašūs į *M. furfur*. Vienintelis skirtumas buvo tas, kad jie sugebėjo augti ant Saburo gliukozės agarizuotos mitybinės terpės be papildomo lipidų šaltinio. Augimas ant SGA skyrėsi nuo augimo ant mLNA: kolonijos buvo mažos (skersmuo apie 0,3 mm, lyginant su 2–3 mm kolonijomis, suformuojamomis ant mLNA) (4 ir 5 pav.).

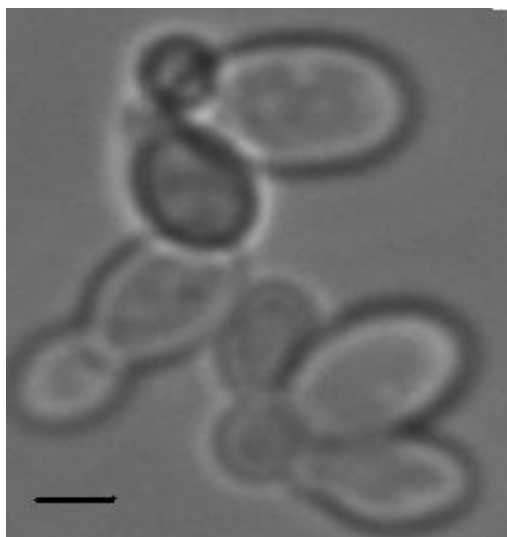
Siekiant nustatyti ar šios mielės gali išgyventi be papildomo lipidų šaltinio ilgesnį laiko tarpą, atlikti keturi persėjimai nuo SGA ant SGA terpės penkių dienų intervalais. Be to, nustatyta, kad kamienai geba augti Saburo gliukozės buljone: po penkių dienų inkubacijos 32 °C SGB ir persėjimo ant SGA kamienai suformavo mažas, 0,3 mm skersmens kolonijas.



4 pav. *M. furfur* kamieno M47 kolonijų dydis ant mLNA agaro po 5 dienų inkubacijos 32 °C. Skalė 1,5 mm. **5 pav.** *M. furfur* kamieno M47 kolonijų dydis ant SGA agaro po 5 dienų inkubacijos 32 °C. Skalė 1,5 mm.

3.1.2 *Malassezia restricta* netipinio kamieno identifikavimas klasikiniiais mikrobiologiniais metodais

Po penkių dienų inkubavimo 32 °C temperatūroje ant mLNA mitybinės terpės *M. restricta* netipinis kamienas suformavo baltas, 8–15 dienų laikotarpyje įgaunančias šviesiai gelsva atspalvį, 1,5–2 mm skersmens kolonijas lygiu paviršiumi. Mikroskopuojant ląstelės buvo ovalios formos, matėsi monopoliarinis pumpuravimas siaurajame poliuje. Ląstelių skersmuo siekė 2,2–3,8 × 4,1–5,7 μm (6 pav.).



6 pav. *M. restricta* kamieno M8 vegetatyvinės ląstelės. Skalė 2 μm .

Augimas buvo įvertintas ant mitybinių terpių, kuriose vieninteliu lipidų šaltiniu naudoti tviniai 20, 40, 60 arba 80. Terpėje su kremoforu EL ir SGA be papildomų lipidų neaugo. Kolonijos pasižymėjo silpnai teigiama katalazės reakcija. Eskulino neskaldė. Kamienai nesintetino fluorochromų ir pigmentų terpėje, kurioje triptofanas naudotas kaip vienintelis azoto šaltinis. Kolonijos augo 37 °C temperatūroje, bet neaugo 40 °C. Keturiolikos *Malassezia* rūšių ir keturių netipinių *Malassezia* kamienų pagrindinės fiziologinės savybės nurodytos 7 lentelėje.

7 lentelė. *Malassezia* rūšių ir keturių netipinių *Malassezia* kamienų pagrindinės fiziologinės savybės.

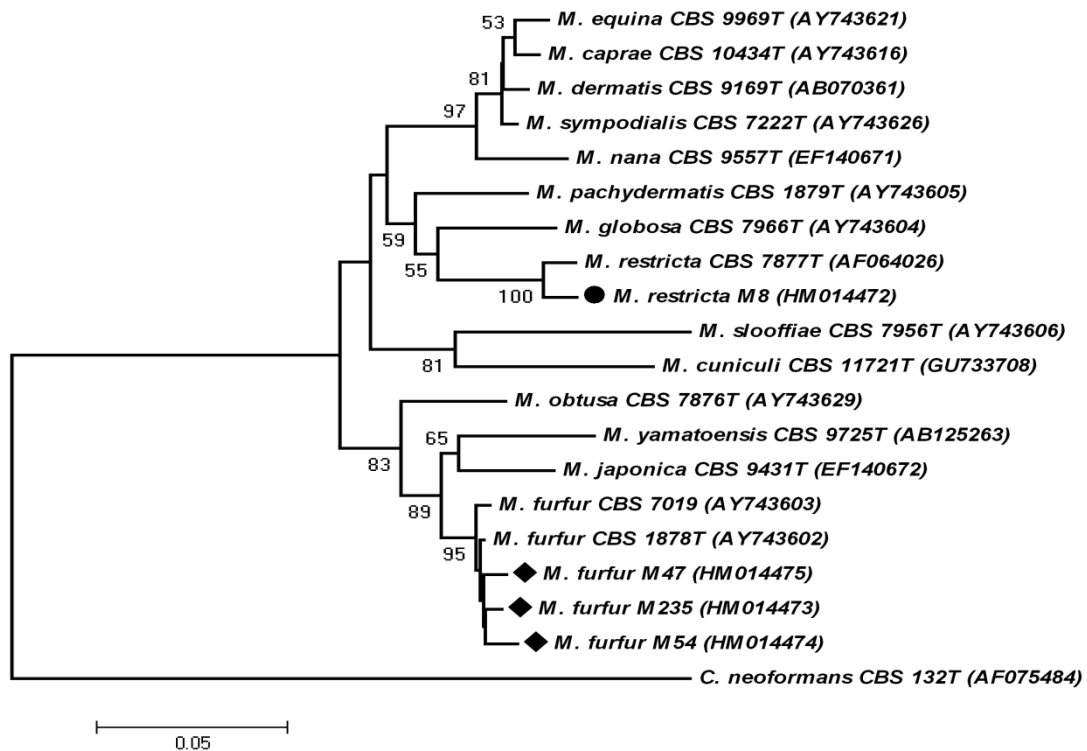
Rūšys	Augimas ant SGA	Tvinas 20	Tvinas 40	Tvinas 60	Tvinas 80	Kremofo ras EL	Katalazė	βGliukozidazė	Pigmentų gamyba	Augimas 37 °C	Augimas 40 °C
<i>M. caprae</i> ^a	–	+	w	w	w	–	+	+	?	–	–
<i>M. cuniculi</i> ^b	–	–	–	–	–	–	+	+	?	+	+
<i>M. dermatis</i> ^c	–	+	+	+	+	w, +	–	–	?	+	+
<i>M. equina</i> ^a	–	–	w	w	w	–	+	–	?	w	–
<i>M. furfur</i> ^d	–	+, –	+, –	+, –	+, –	+, –	+, –	w	+	+	+
<i>M. globosa</i> ^d	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–, w	–
<i>M. japonica</i> ^e	–	–	w	+	–	–	+	+	?	+	–
<i>M. nana</i> ^f	–	+	+	+	w	–	+	–	?	+	w
<i>M. obtusa</i> ^d	–	–	–	–	–	–	+	+	–	w	–
<i>M. pachyder.</i> ^d	+, w	+	+	+	+	+	+, w	+	w	+	+
<i>M. restricta</i> ^d	–	–	–	–	–	–	–	–	–	w	–
<i>M. slooffiae</i> ^d	–	+, w, –	+	+	–, w	–	+	–	–	+	+
<i>M. sympod.</i> ^d	–	–, w	+	+	+	–, w	+	+	–	+	+
<i>M. yamatoen.</i> ^g	–	+	+	+	+	?	+	?	?	+	–
<i>M.47, M.54, M.235</i>	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
<i>M.8</i>	–	+	+	+	+	–	+	–	–	+	–

+: teigiama reakcija; –: neigiama reakcija; w: silpna reakcija; ?: nėra duomenų.

^a Cabañes ir kt., 2007; ^b Cabanes ir kt., 2011a; ^c Sugita ir kt., 2002; ^d Guého ir kt., 1996; ^e Sugita ir kt., 2003; ^f Hirai ir kt., 2004; ^g Sugita ir kt., 2004.

3.1.3 Netipinių *Malassezia* kamienų identifikavimas molekuliniais metodais

Filogenetiniuose medžiuose, sukonstruotuose naudojant kaimynų apjungimo metodą, netipinių *M. furfur* kamienų didžiojo rRNR subvieneto D1/D2 domenų ir rRNR genų ITS1 ir ITS2 regionų sekos susigrupavo viename klasteryje su tipinio *M. furfur* CBS 1878^T kamieno sekomis (šakų patikimumas sudarė atitinkamai 95 % ir 99 %), o *M. restricta* izoliato M8 sekos – su tipinio *M. restricta* CBS 7877^T sekomis (šakų patikimumas 100 % ir 99 %) (7 ir 8 pav.).

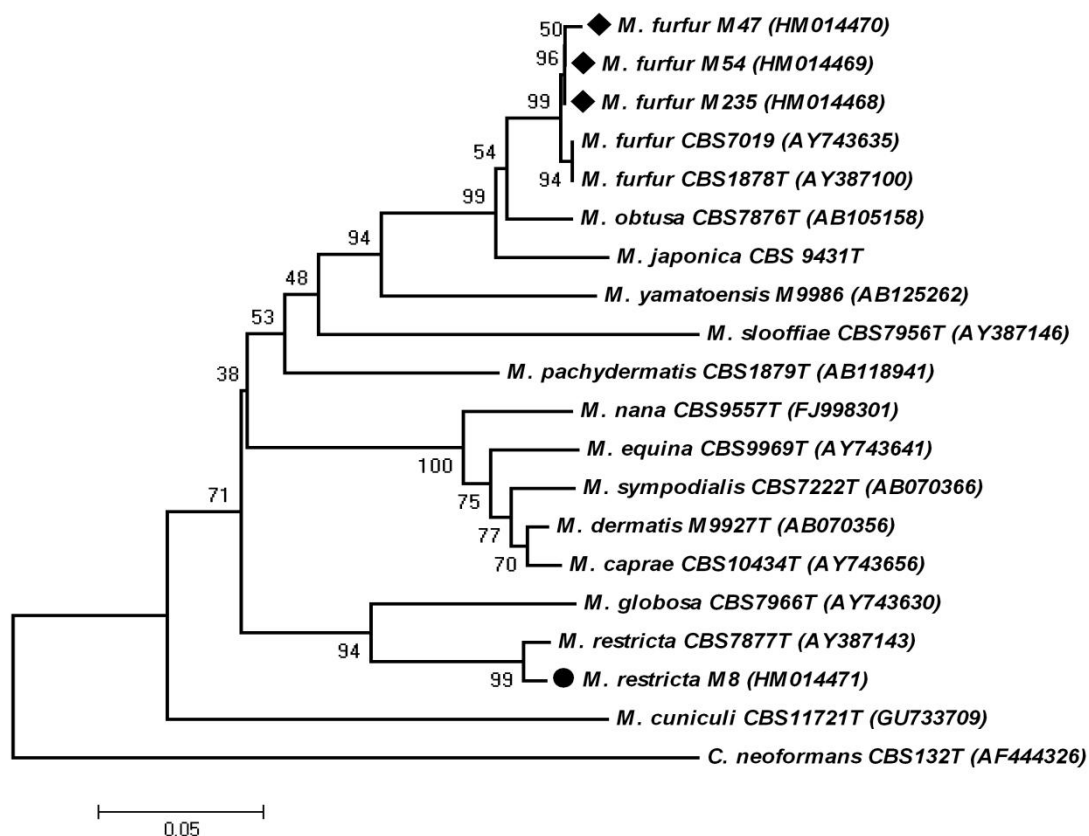


7 pav. Filogenetinis medis, sudarytas iš netipinių *Malassezia* kamienų ir kitų *Malassezia* genties atstovų D1/D2 26S rRNR geno sekų.

Cryptococcus neoformans CBS 132^T seka panaudota kaip išorinė grupė. Genų sekų banko registracijos numeriai pateikti skliausteliuose. Medis sukonstruotas naudojant kaimynų apjungimo metodą. Medžio patikimumas apskaičiuotas kiekvienai šakai atskirai (bootstrap'o metodika). Šakų išsiskyrimo taškuose pateiktos atitikimo kriterijaus vertės (%). Evoliuciniai nuotoliai apskaičiuoti didžiausios tikimybės metodu.

26S regiono sekų panašumas tarp tirtų kamienų M47, M54, M 235 ir tipinio *M. furfur* CBS 1878^T buvo atitinkamai 99,3 %, 98,9 % ir 99,5 %, o M8

kamieno su tipinio *M. restricta* CBS 7877^T – 97,8 %. ITS-5,8S regiono sekų panašumas tarp M47, M54, M 235 ir tipinio *M. furfur* CBS 1878^T kamieno sudarė atitinkamai 97,9 %, 98,2 % ir 98,5 %, o M8 kamieno su tipinio *M. restricta* CBS 7877^T – 73 %. Filogenetinės analizės būdu nustatyta, kad sekų skirtumai tarp išskirtų netipinių *M. furfur* ir tipinio *M. furfur* kamieno neperžengia variacijos (≤ 3 %), stebimos tarp tos pačios rūšies atstovų ribų, todėl izoliatai M47, M54 ir M235 identifikuoti kaip nuo lipidų nepriklausantys *M. furfur*. Sekų skirtumai tarp tipinio *M. restricta* kamieno ir netipinio *M. restricta* buvo didesni už rūšies viduje stebimą sekų variaciją. Darbo metu išskirtas atipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintis *M. restricta* kamienas gali būti naujos rūšies atstovas.



8 pav. Filogenetinis medis, sudarytas iš netipinių *Malassezia* kamienų ir kitų *Malassezia* genties atstovų ITS1-5,8S-ITS2 rNRN geno sekų. *Cryptococcus neoformans* CBS 132^T seka panaudota kaip išorinė grupė. Genų sekų banko registracijos numeriai pateikti skliausteliuose. Medis sukonstruotas naudojant kaimynų apjungimo metodą. Medžio patikimumas apskaičiuotas kiekvienai šakai atskirai (bootstrap'o metodika). Šakų išsiskyrimo taškuose pateiktos atitikimo kriterijaus vertės (%). Evoliuciniai nuotoliai apskaičiuoti didžiausios tikimybės metodu

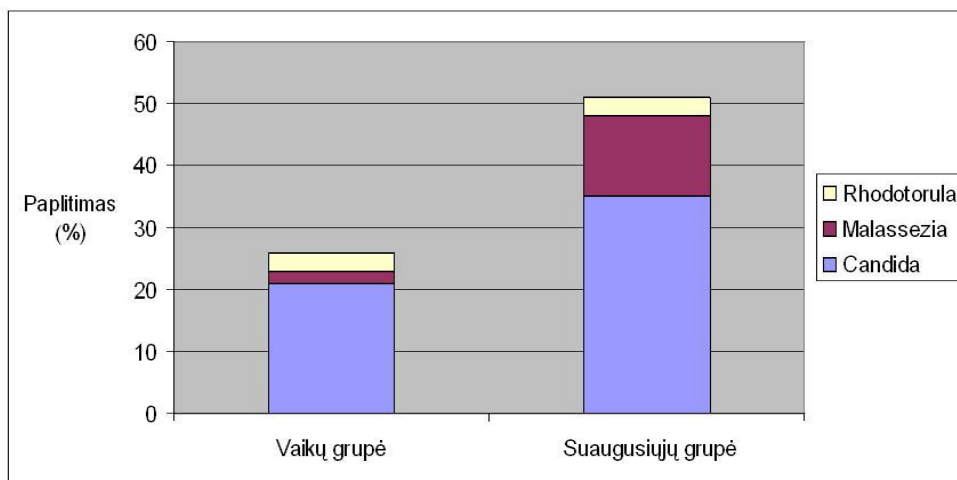
3.2 Mielių rūšių paplitimas ir pasiskirstymas ant atopinio dermatito pažeistos odos

Nuo AD pažeistos odos paimti mikrobiologiniai pasėliai suskirstyti į keturias grupes pagal AD pažeistas kūno vietas ir asmens amžių (6 lentelė, 40 psl.).

Iš viso mielės užaugo 89-iuose (36,9 %) iš 241 paimtų mėginių. Klasikiniais ir molekuliniais identifikavimo metodais nustatyta, kad išauginti kamienai priklausė trims gentims: *Candida*, *Malassezia* ir *Rhodotorula*.

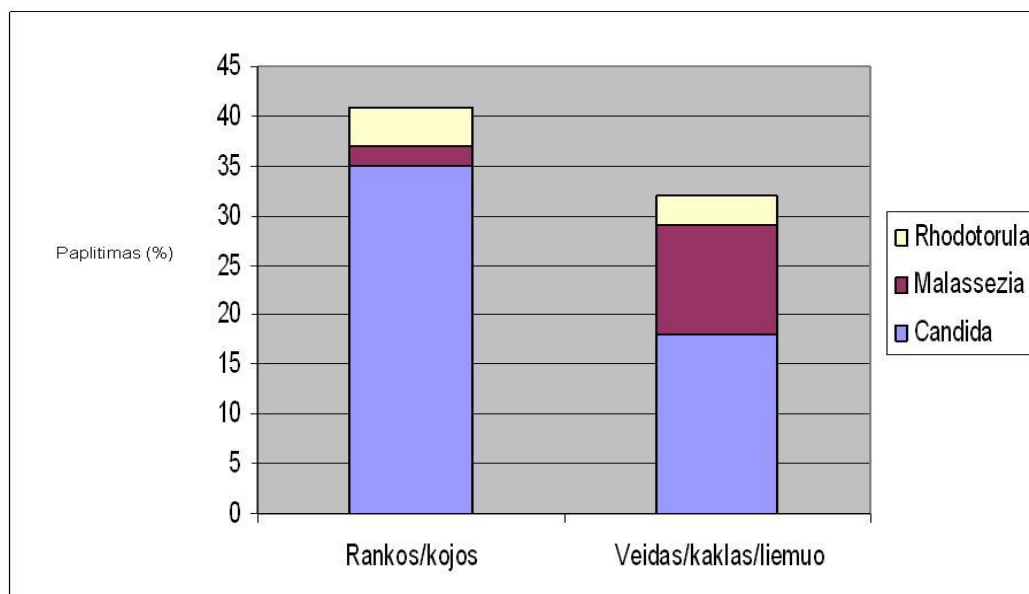
Candida genties mikroorganizmai sudarė dominuojančią daugumą, jie buvo išskirti iš 66 mėginių (27,4 %). Tik 16 pasėlių (6,6 %) išaugo *Malassezia* genčiai priklausančios mielės. *R. rubra* nustatyta 7 atvejais (2,9 %). Visose keturiose mėginių grupėse dažniausiai išskirtos mielių rūšys buvo: *C. famata*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* ir *M. furfur*. Dominuojanti rūšis abiejose amžiaus grupėse – *C. famata*, identifikuota 26,5 % atvejų vaikų amžiaus grupėje ir 25,5 % atvejų suaugusiųjų amžiaus grupėje. Kitos mielių rūšys išskirtos 0 % – 17 % dažniu pasėliuose, paimtuose nuo vaikų odos, ir 0 % – 23,6 % dažniu mėginiuose, paimtuose nuo suaugusiųjų odos.

Nustatyta, kad suaugusių asmenų AD pažeista oda du kartus dažniau yra kolonizuota mielėmis negu vaikų ($P < 0,0001$) (9 pav.).



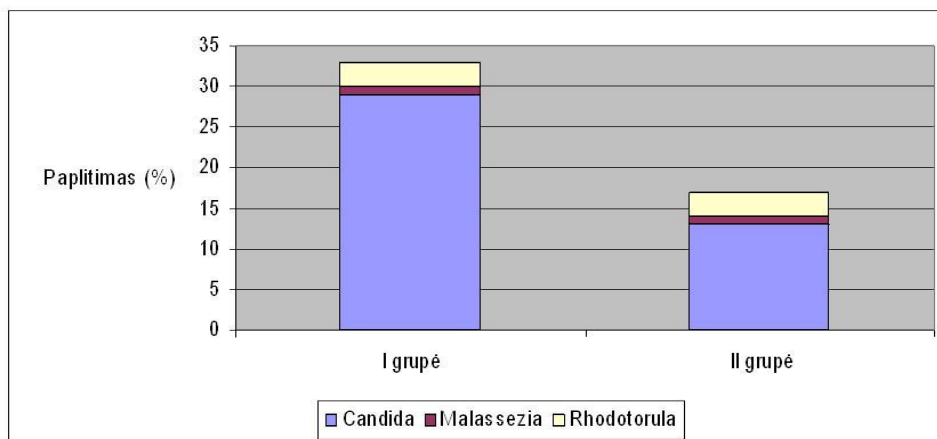
9 pav. Mielių rūšių paplitimas ant AD pažeistos odos vaikų (2–16 metų amžiaus; n=132) ir suaugusių (16–65 metų amžiaus; n=109) amžiaus grupėse.

Taip pat nustatytas *Malassezia* ir *Candida* genties mielių pasiskirstymo skirtingose kūno dalyse priklausomybė: *Malassezia* genčiai priklausančių mielių daugiausiai išskirta iš mėginių, paimtų nuo AD pažeistos veido, kaklo ar liemens odos ($P = 0,0047$), tuo tarpu kai *Candida* mielės dažniausiai kolonizavo rankas ir kojas ($P = 0,0029$) (10 pav.).



10 pav. *Candida* ir *Malassezia* rūšių paplitimas ant odos, priklausomai nuo AD pažeistos kūno vietos.

Iš mikrobiologinių pasėlių, paimtų nuo AD pažeistos vaikų odos, išskirtos *Malassezia* rūšys sudarė mažumą (aptiktos 2 mėginiuose), o *Candida* rūšys – daugumą (išskirtos 28 atvejais). Lyginant mielių pasiskirstymą ant kūno vaikų amžiaus grupėje, pastebėta, kad rankos ir kojos yra kolonizuojamos dažniau (67,6 %), lyginant su veidu, kaklu ir liemeniu (32,4 %) (11 pav.).

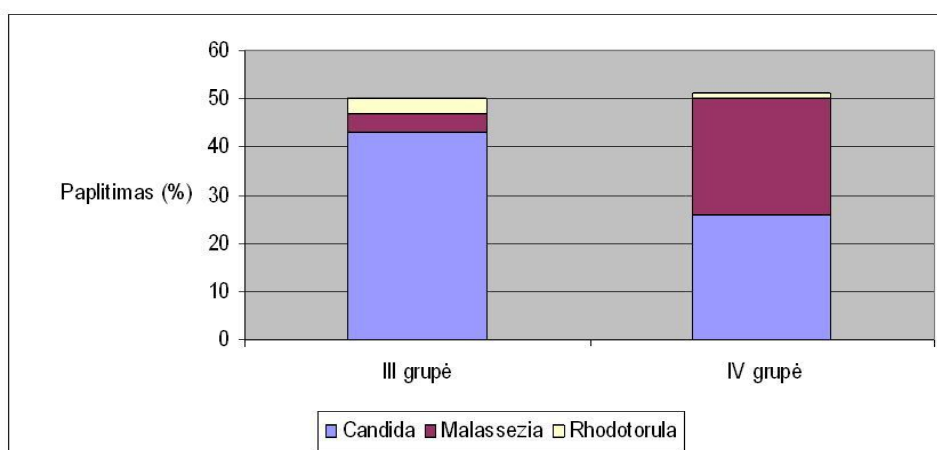


11 pav. Mielių rūšių paplitimas ant AD pažeistos vaikų odos.

I grupė: mėginiai imti nuo rankų ir kojų.

II grupė: mėginiai imti nuo veido, kaklo ir liemens.

Suaugusiųjų amžiaus grupėje mielės išskirtos iš 50,5 % mėginių. *Candida* rūšys identifikuotos 38 mėginiuose, paimtuose nuo suaugusių asmenų AD pažeistos odos. *Malassezia* mielės išskirtos 14, o *R. rubra* – 3 atvejais. Šioje amžiaus grupėje mielių paplitimas ant kūno buvo tolygus: rankos ir kojos kolonizuotos 50 %, o veido, kaklo ir liemens oda – 51 % atvejų. Mielių genčių pasiskirstymas ant kūno buvo toks: *Candida* rūšys dominavo ant rankų ir kojų (65,8 %), o *Malassezia* – ant veido, kaklo ir liemens (85,7 %) (12 pav.).



12 pav. Mielių rūšių paplitimas ant AD pažeistos suaugusių žmonių odos.

III grupė: mėginiai imti nuo rankų ir kojų.

IV grupė: mėginiai imti nuo veido, kaklo ir liemens.

Kontroliniai mikrobiologiniai pasėliai išsėti į tokias pačias mitybines terpes ir auginti tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir pasėliai, paimti nuo AD sergančių žmonių odos. Nuo AD nesergančių žmonių odos paimtuose mėginiuose mielės neišaugo.

3.3 Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš *Candida* rūšis ir *Rhodotorula rubra*, nustatymas atopiniu dermatitu sergančių asmenų kraujo serume

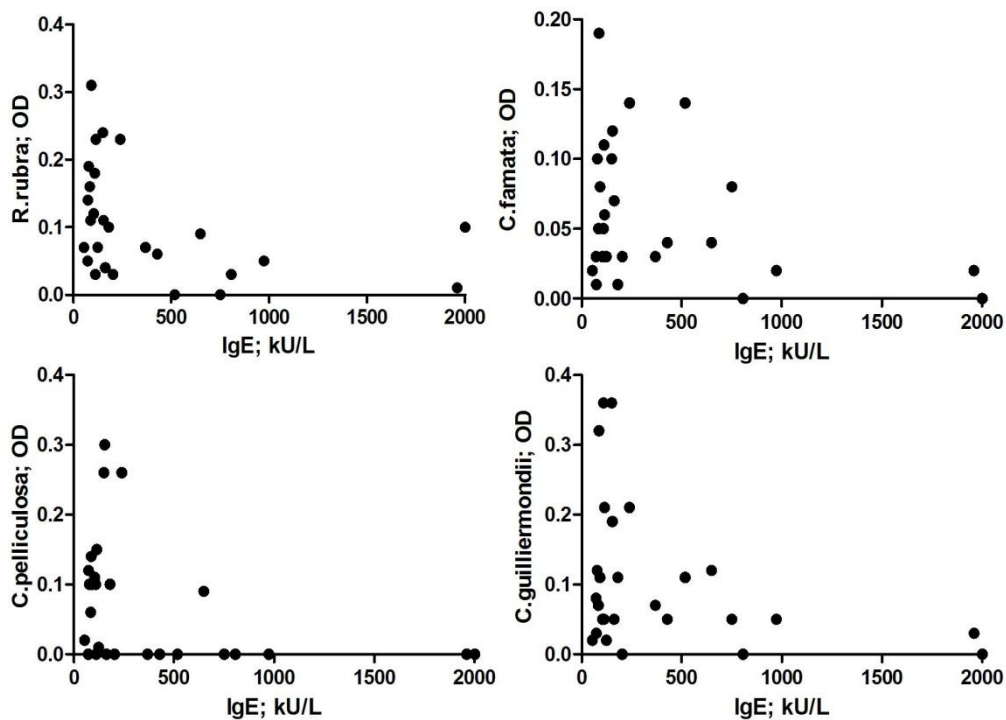
Prieš tirtas mieles nukreiptų specifinių IgE antikūnų nustatymui AD sergančių žmonių kraujo serume naudoti imunofermentinės analizės ir tėkmės citometrijos metodai.

3.3.1 Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš *Candida* rūšis ir *Rhodotorula rubra*, nustatymas imunofermentiniu metodu

Siekiant nustatyti, ar nuo AD pažeistos odos išskirtos mielės gali sukelti specifinių IgE antikūnų gamybą, atlikta imunofermentinė analizė. Eksperimentui atrinktos septynios mielių rūšys: *C. famata*; *C. pelliculosa*; *C. parapsilosis*; *C. quilliermondii*, *R. rubra*, tipinės ir netipinės *M. furfur*, bei netipinė *M. restricta*. Pagaminti šių mielių ekstraktai darbe naudoti kaip antigenai.

Eksperimento pradžioje tirti serumai buvo suskirstyti į dvi grupes: vieną grupę sudarė kraujo serumai, paimti iš AD sergančių asmenų, kitą – serumai, paimti iš AD nesergančių, žmonių. Toks skirstymas atliktas tikintis nustatyti koreliaciją tarp bendro IgE antikūnų ir specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš mielių ekstraktus, kiekio serume. Buvo iškelta prielaida, kad kuo didesnis bendras serume esančių IgE antikūnų kiekis, tuo didesnė tikimybė, kad jis reaguos su mielių ekstraktais. 13 paveiksle pavaizduota prieš tirtus mielių ekstraktus nustatytų specifinių IgE antikūnų kiekio priklausomybė nuo bendro serume esančių IgE antikūnų kiekio. Iš jame išsidėsčiusių duomenų matyti, kad

koreliacija tarp šių dviejų dydžių neaptikta: didžiausią kiekį bendrų IgE antikūnų turintys serumai silpnai reagavo su tiriamais mielių ekstraktais.

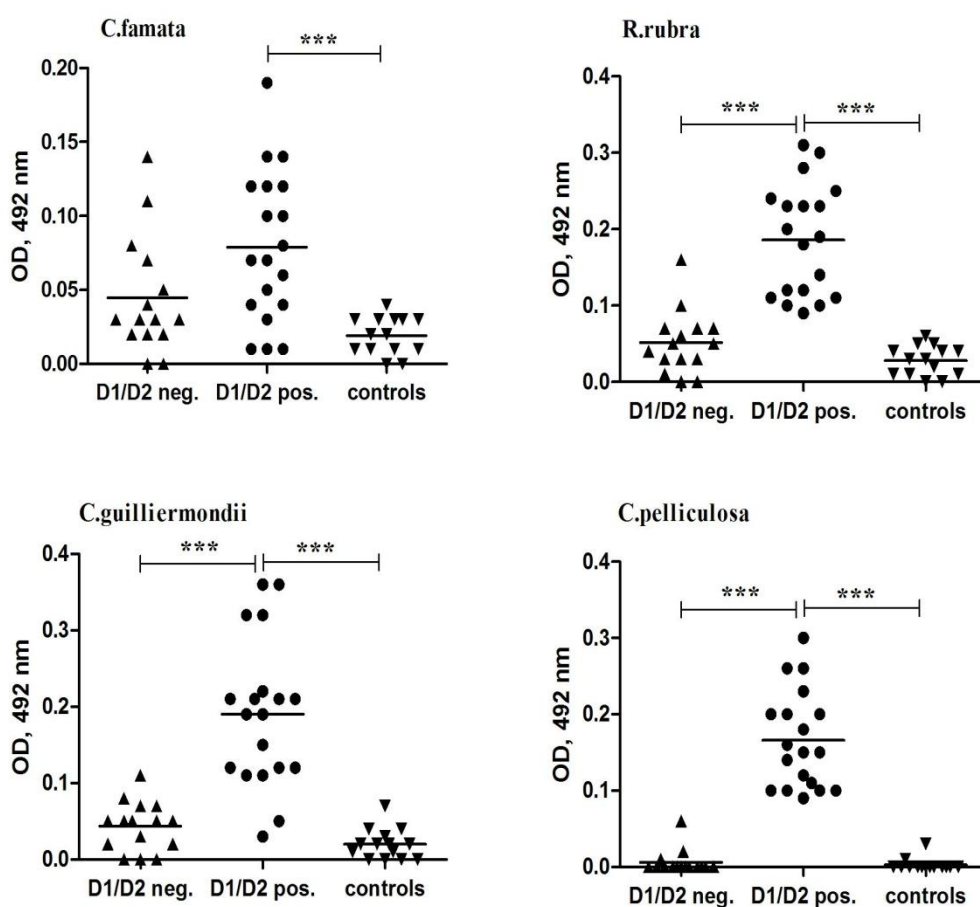


13 pav. Koreliacijos tarp bendro IgE antikūnų kiekio ir specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš mielių ekstraktus, kiekio AD pacientų kraujo serume analizė.

Aiškinantis, kas tarpusavyje sieja specifinius IgE antikūnus prieš tirtus mielių ekstraktus turinčius serumus, pastebėta, kad juose visuose taip pat yra specifinių antikūnų prieš namų dulkių erkių *D. pteronyssinus* ir *D. farinae* alergenų D1 ir D2 (kaip nustatyta Immulite[®] 2000 3GAllergy[™]). Remiantis šiuo pastebėjimu, serumai suskirstyti į tris grupes: serumus, turinčius specifinius IgE antikūnus prieš D1/D2 alergenų; serumus, neturinčius specifinių IgE antikūnų prieš D1/D2 alergenų ir kontrolinius serumus, paimtus iš AD nesergančių žmonių.

Analizuojant imunofermentinės analizės rezultatus nustatyta, kad IgE antikūnus prieš D1/D2 alergenų turintys serumai taip pat turi specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš keturis tirtus mielių ekstraktus. Dauguma šių serumų reagavo ne su vienu, bet su keliais mielių ekstraktais: 47 % tirtų serumų turėjo

specifinius IgE antikūnus, nukreiptus prieš tris tirtas rūšis, o 42 % serumų reagavo su visais keturiais mielių ekstraktais. Šie rezultatai leido daryti išvadą, kad tirtuose mielių ekstraktuose buvo heterogeninių – identiško specifiškumo kryžmiškai reaguojančių skirtingų mielių rūšių – antigenų. Kontrolinę grupę sudarantys serumai specifinių IgE antikūnų prieš tirtas mieles neturėjo. Lyginant rezultatus tarp serumų grupių nustatyta, kad silpniausias atsakas ir mažiausi skirtumai IgE surišime pasireiškia *C. famata* atveju (14 pav.).



14 pav. Imunofermentinės analizės metodu nustatyti specifiniai IgE antikūnai, nukreipti prieš keturių mielių rūšių ekstraktus AD sergančių pacientų kraujo serume.

***Skirtumai tarp dviejų grupių $P < 0,001$ (Mann-Whitney U testas)

D1/D2 neigiama grupė sudaryta iš serumų, neturinčių specifinių IgE antikūnų prieš *D. pteronyssinus* ir *D. farinae* ($<0,35$ kU/l);

D1/D2 teigiama grupė sudaryta iš serumų, turinčių specifinius IgE antikūnus, nukreiptus prieš namų dulkių erkes ($>0,7$ kU/l);

Kontrolinė grupė sudaryta iš AD nesergančių žmonių serumų.

Mann-Whitney *U* testas naudotas rezultatams tarp grupių palyginti. Statistiškai patikimai nustatytas specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš tirtų mielių ekstraktus buvimas serumuose, turinčiuose antikūnus prieš D1/D2 alergenų, lyginant su kontrolinės grupės serumais ($P < 0,0001$ *R. rubra*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*; $P = 0,0003$ *C. famata*). Taip pat statistiškai patikimi skirtumai nustatyti tarp turinčių specifinius IgE antikūnus, nukreiptus prieš D1/D2 alergenų ir jų neturinčių serumų grupių: $P < 0,0001$ *R. rubra*, *C. pelliculosa* ir *C. guilliermondii*.

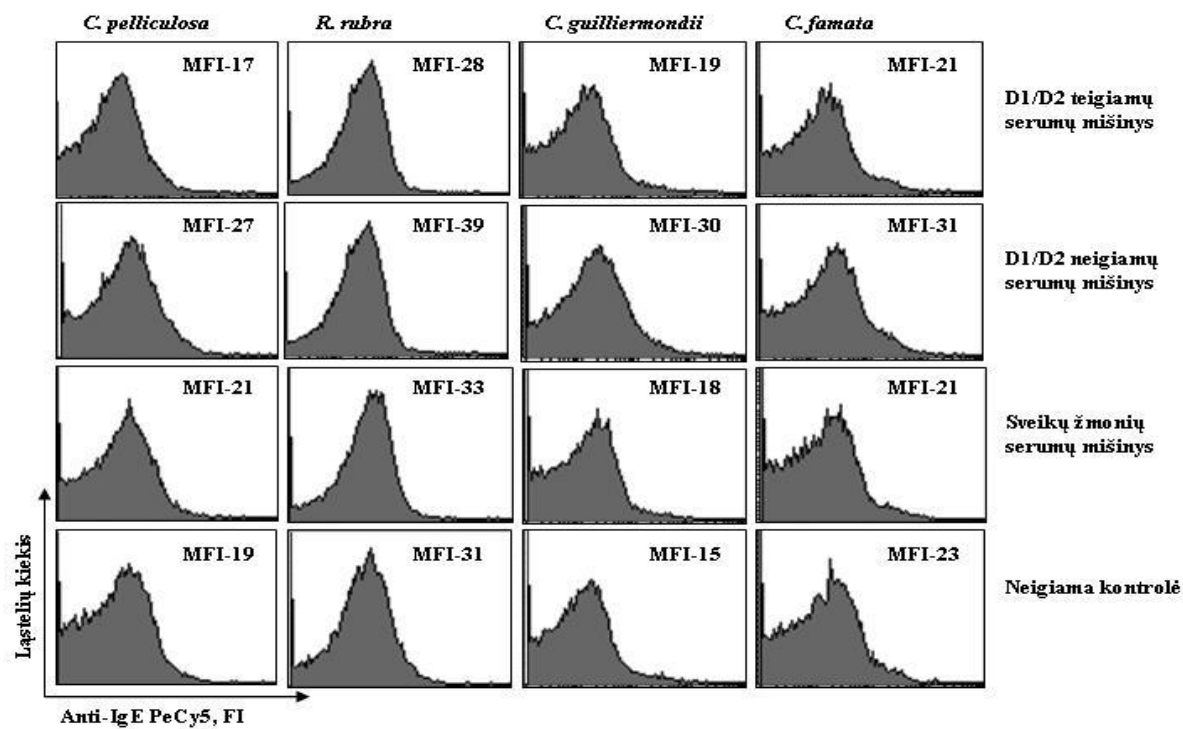
Mielių ekstraktai, paruošti iš *C. parapsilosis*, tipinių bei netipinių *M. furfur* ir netipinio *M. restricta* kamienų, nereagavo su tiriamais serumais. Tolimesniuose tyrimuose jie nenaudoti.

3.3.2 Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš *Candida* rūšis ir *Rhodotorula rubra*, nustatymas tėkmės citometrijos metodu

Imunofermentinėje analizėje naudoti mielių ekstraktai sudaryti iš visų ląstelės baltymų. Tiriamuose serumuose nustatyti specifiniai IgE antikūnai galėjo būti nukreipti prieš mielių viduląstelinius arba ląstelės paviršiuje esančius baltymus. Tėkmės citometrijos metodas naudotas siekiant nustatyti ar mielių paviršiuje yra antigenų, gebančių surišti IgE antikūnus.

Tėkmės citometrijos metodu tirtos mielių rūšys, iš kurių paruošti mielių ekstraktai surišo tiriamuose serumuose esančius specifinius IgE antikūnus. Mielių ląstelės inkubuotos su tiriamais serumais ir su fluorochromu žymėtais antriniais antikūnais (Anti-IgE Pe Cy5). 15 paveiksle pavaizduotų histogramų y ašyje pažymėtas ląstelių skaičius, o x ašyje – fluorescencijos intensyvumas, kuris šiuo atveju reiškia ląstelių membranoje ekspresuojamus paviršinius antigenus. Kuo fluorescencijos intensyvumas didesnis, tuo didesnė paviršinių antigenų ekspresija. Histogramose nurodytų maksimalios fluorescencijos intensyvumo (MFI) reikšmės nesiskiria tarp tirtų serumų grupių. Gauti rezultatai leido daryti išvadą, kad tirtos mielės neekspresuoja paviršinių IgE antikūnus surišančių antigenų. Imunofermentinės analizės metu tirtuose

serumuose nustatyti specifiniai IgE antikūnai buvo nukreipti prieš vidulastelinius mielių baltymus.



15 pav. Keturių mielių rūšių paviršinių antigenų, surišančių specifinius IgE antikūnus, ekspresijos įvertinimas tėkmės citometrijos metodu. MFI – maksimalus fluorescencijos intensyvumas. Neigiamai kontrolei vietoje tiriamų serumų naudotas FACS buferis.

3.4 Kryžminių reakcijų tarp trijų *Candida* rūšių ir *Rhodotorula rubra* mielių ekstraktų nustatymas

Imunofermentinės analizės metodu nustatyta, kad dauguma tirtų serumų turėjo specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš kelių mielių rūšių ekstraktus. Tokie rezultatai galėjo būti dėl: serumuose esančių kiekvienai tirtai mielių rūšiai specifinių IgE antikūnų; kryžminių reakcijų tarp identiškų antigenų – tiriamuose serumuose esančių IgE antikūnų, nukreiptų prieš visose tirtose mielėse esantį baltymą; tiriamuose serumuose esančių tiek kiekvienai mielių rūšiai, tiek vienam baltymui specifinių IgE antikūnų.

Siekiant įvertinti numanomą kryžminį antigeniškumą tarp keturių mielių rūšių atlikta konkurentinė imunofermentinė analizė. Tiriamieji serumai praskiesti iš skirtingų mielių rūšių pagamintais ekstraktais (inhibuojantys skystosios fazės antigenai) ir po 24 val. inkubacijos periodo perkelti į mikroplokštelės šulinėlius, padengtus tais pačiais mielių ekstraktais (kietosios fazės antigenai). Specifinių IgE antikūnų surišimo inhibicija pateikta dešimtoje lentelėje. *C. guilliermondii* skystosios fazės antigenai inhibavo serume esančių specifinių IgE antikūnų jungimąsi prie kietosios fazės *C. famata* ir *C. pelliculosa* mielių antigenų. *C. pelliculosa* skystosios fazės antigenai žymiai sumažino IgE antikūnų jungimąsi prie *R. rubra* baltymų, o *R. rubra* skystosios fazės antigenai šiek tiek inhibavo IgE antikūnų surišimą *C. pelliculosa* kietosios fazės antigenais. Šie rezultatai leido daryti išvadą, kad *C. guilliermondii* mielių ekstrakto buvo baltymų, turinčių tokius pačius arba panašius epitopus, kaip ir baltymai, esantys iš *C. famata* bei *C. pelliculosa* rūšių paruoštuose ekstraktuose. *C. pelliculosa* ir *R. rubra* mielių ekstraktuose taip pat buvo identiško specifiskumo antigenų (8 lentelė).

8 lentelė. Specifinių IgE antikūnų jungimosi prie kietosios fazės antigenų kryžminė inhibicija (%).

Kietosios fazės antigenas	Skystosios fazės antigenas			
	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>R. rubra</i>
<i>C. guilliermondii</i>	40±11,3	167,5±13	130±8	100±1
<i>C. famata</i>	55±4	152±12	129±5	120,5±2
<i>C. pelliculosa</i>	40±7	106,5±9	96,5±12	63±9
<i>R. rubra</i>	104,5±4	123,5±5	22±18	51±21

Pateikti dviejų eksperimento pakartojimų duomenys: vidutinis OT ± standartinis nuokrypis.

Konkurentinės imunofermentinės analizės rezultatai leido daryti išvadą, kad tiriamuose serumuose buvo specifiniai IgE antikūnai, nukreipti prieš kryžmiškai reaguojančius mielių antigenus.

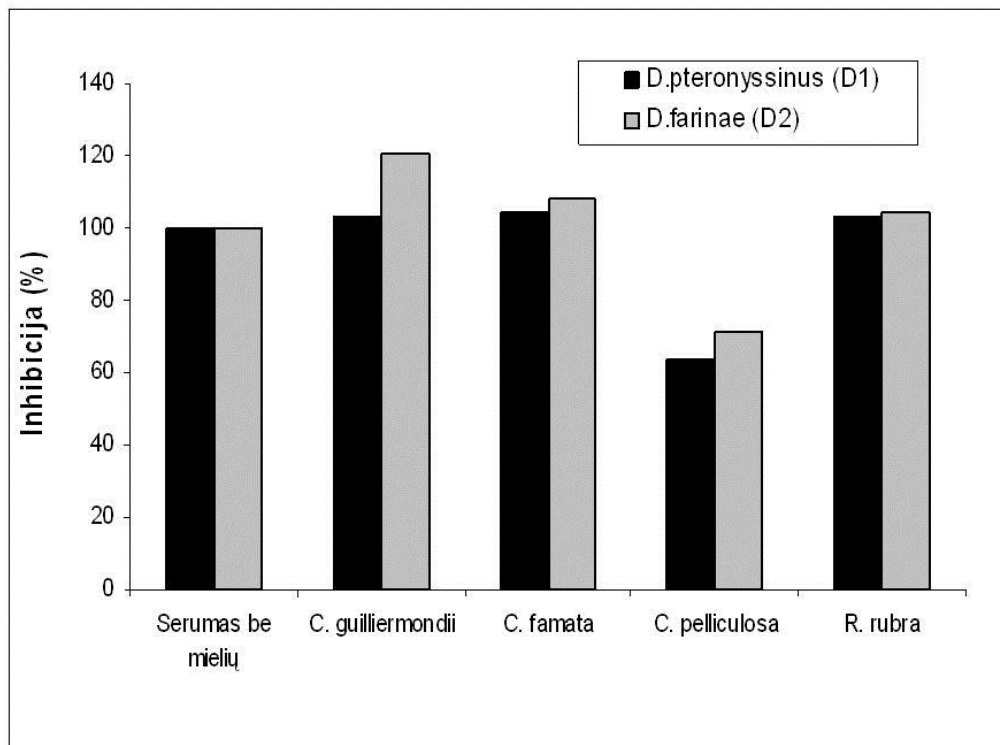
3.5 Kryžminių reakcijų tarp *Candida pelliculosa* mielių ekstrakto ir namų dulkių erkių D1 ir D2 alergenų nustatymas

Immulite[®] inhibicinės analizės metodu buvo tirtos numanomos kryžminės reakcijos tarp keturių mielių rūšių ekstraktų ir dviejų namų dulkių erkių alergenų D1 (*D. pteronyssinus*) ir D2 (*D. farinae*).

Tiriamų serumų mišinys skiestas su kiekvienu mielių ekstraktu atskirai (skystosios fazės antigenai) ir inkubuotas mikroplokštelės šulinėlyje, padengtame atitinkamai tokiu pačiu mielių ekstraktu (kietosios fazės antigenai). Šis pirminis inkubavimas atliktas siekiant adsorbuoti prieš mieles nukreiptus specifinius IgE antikūnus (prijungiant juos prie kietosios fazės antigenų) ir (arba) blokuoti prieš mieles nukreiptų specifinių IgE antikūnų epitopus (antikūnams susijungiant su skystoje fazėje esančiais antigenais).

Nustatyta, kad iš keturių tirtų mielių ekstraktų tik *C. pelliculosa* ekstraktas inhibavo specifinių IgE antikūnų jungimąsi prie D1 (63,4 %) ir D2

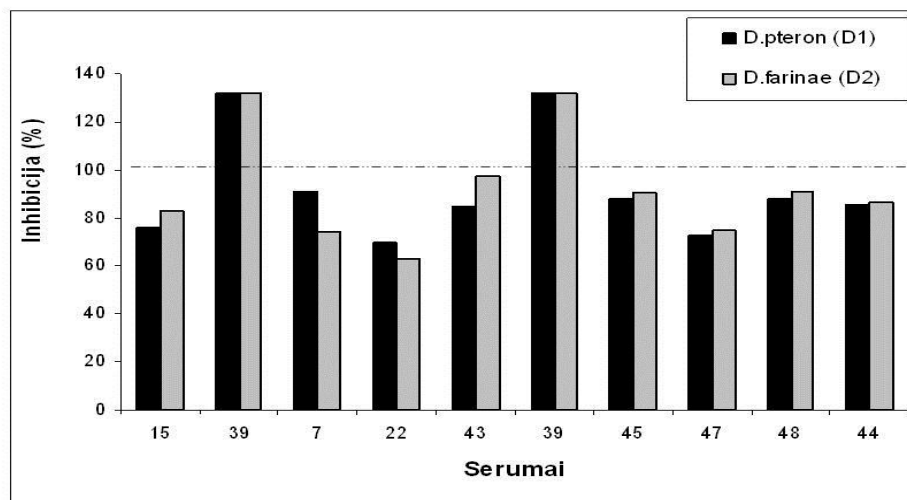
(71 %) alergenų. Kitų mielių rūšių ekstraktai visiškai neinhibavo IgE antikūnų surišimo (16 pav.).



16 pav. IgE antikūnų jungimosi prie namų dulkių erkių D1 (*D. pteronyssinus*) ir (D2) *D. farinae* alergenų inhibicija keturių mielių rūšių ekstraktais.

Kryžminei inhibicijai tarp *C. pelliculosa* baltymų ir namų dulkių erkių alergenų nustatyti atrinkta dešimt serumų, turinčių specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš D1/D2 alergenus ir prieš *C. pelliculosa* mielių ekstraktą. Analizuojant Immulite[®] inhibicinės analizės rezultatus nustatyta, kad po pirminio serumų inkubavimo su *C. pelliculosa* mielių ekstraktu aštuoniuose iš dešimties tirtų serumų sumažėjo specifinių IgE antikūnų prieš D1 ir D2 alergenus surišimas (17 pav.). Specifinių IgE antikūnų jungimosi prie D1 alergeno inhibiciją (%) sudarė $73,0 \pm 23,8$ (vidutinė reikšmė \pm standartinis nuokrypis), o D2 alergeno – $82,4 \pm 11,3$. Svarbu pažymėti, kad visų tirtų serumų atveju buvo inhibuotas jungimasis prie abiejų alergenų (D1 ir D2) arba nė prie vieno. Statistinei analizei naudojant neparametrinį Spearman'o koreliacijos metodą nustatyta, kad statistiškai reikšminga yra inhibicijos

koreliacija tarp D1 ir D2 antigenų ($r = 0,669$, $P = 0,03$). Gauti rezultatai leido daryti išvadą, kad *C. pelliculosa* antigenai ir namų dulkių erkių alergenai gali turėti panašius epitopus.



17 pav. Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš D1 ir D2 alergenų surišimo inhibicija (%) po pirminės serumų inkubacijos su *C. pelliculosa* ekstraktu. 100 % atitinka reikšmes, gautas serumus praskiedus ir inkubavus su PBS (vietoje mielių ekstrakto).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe išskirti ir identifikuoti trys netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintys *M. furfur* kamienai. Kaip minėta aukščiau, *Malassezia* genčiai šiuo metu priskiriama keturiolika rūšių. Visos jos yra lipofilinės prigimties. Manoma, kad *Malassezia* lipidų poreikis yra susijęs su šių mielių ekologine niša, kadangi jos dažniausiai išskiriamos nuo žmonių odos. Lipidų poreikis sietinas ir su jų išskiriamais virulentiškumo faktoriais, tokiais kaip lipazės ar fosfolipazės. Kai kurių autorių nuomone, šie fermentai dalyvauja patogeniškumą lemiančiuose mechanizmuose (Brunke, Hube, 2006; Cafarchia, Otranto, 2004; DeAngelis ir kt., 2005, 2007; Pini, Faggi, 2011). *M. pachydermatis* rūšies mielės laikomos nereikliausiomis tarp genties atstovų ir paprastai apibrėžiamos kaip „nuo lipidų nepriklausomos“, bet jos gali būti kultivuojamos tik peptonu (jo sudėtyje yra trumpų grandinių riebalų rūgščių) praturtintoje mitybinėje terpėje (t.y, Saburo mitybinėje terpėje) (Batra ir kt., 2005). Atlikus *M. globosa* ir *M. restricta* rūšims priklausančių mielių genomų sekoskaitą paaiškėjo, kad lipofiliškumas priklauso nuo to, kad jos neturi riebalų rūgščių sintazę koduojančio geno (Xu ir kt., 2007). Metabolizmo defektą kompensuoja didelis genų, koduojančių ekstraląstelines hidrolazes, kiekis. Nustatyta, kad *Malassezia* genčiai priklausančios mielės išskiria daugiau kaip 50 skirtingų baltymų, iš kurių 8 yra lipazės, o 3 – fosfolipazės. Šių fermentų sintezė priklauso nuo aplinkoje esančių lipidų (Xu ir kt., 2007). Atsižvelgiant į tai, kad lipofiliškumas yra šios genties mielėms būdinga genetiškai determinuota fiziologinė savybė, išskirti *M. furfur* kamienai, kurių augimas nepriklauso nuo aplinkoje esančių lipidų, yra sistematinis – biologiniu požiūriu vertinga medžiaga.

Unikaliu *Malassezia* genties atstovų poreikiu gauti lipidus iš aplinkos remiasi ir šių mielių klasifikacijos sistema, kuri taikoma izoliatams identifikuoti iki rūšies lygmens. Ši sistema naudojama laboratorijose iki šiol, bet per pastaruosius dešimt metų *Malassezia* genčiai priskiriamų rūšių skaičius padvigubėjo, todėl darosi vis sudėtingiau apibūdinti kamieną iki rūšies

remiantis gebėjimu utilizuoti penkis lipidus. Be to, literatūroje daugėja duomenų apie išskirtus įvairioms *Malassezia* rūšims priklausančių mielių kamienus, pasižyminčius tai rūšiai nebūdingomis fiziologinėmis savybėmis. Dažniausiai šios savybės būna susijusios su netipiška polisorbato junginių (tvinų) asimiliacija (Crespo ir kt., 2000; Gonzalez ir kt., 2009; Kaneko ir kt., 2007). Mūsų darbe taip pat ne visus išskirtus *Malassezia* genties kamienus pavyko identifikuoti vien klasikiniiais mikrobiologiniais metodais.

M. furfur kultivavimo požūriu laikoma viena iš nereikliausių lipofilinių rūšių, kadangi bet koks lipidų šaltinis skatina jos dauginimąsi. Tačiau sėkmingam jos kultivavimui ant Saburo agarizuotos mitybinės terpės būtina terpę praturtinti alyvuogių aliejumi arba oleino rūgštimi (Batra ir kt., 2005). Mūsų darbo metu išskirti *M. furfur* mielių kamienai augo ant standartinės sudėties Saburo agarizuotos terpės pakankamai ilgai (atlikti keturi persėjimai nuo SGA ant SGA kas penkios dienos). Reikėtų pabrėžti tą faktą, kad nors literatūroje daugėja duomenų apie išskirtus netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižyminčius *Malassezia* genčiai priklausančių mielių izoliatus, visi jie išlieka priklausomi nuo išorinio lipidų šaltinio. Netipiškumas aprašomas kaip neasimiliavimas ar asimiliavimas lipidų, kurių nenaudoja referentiniai rūšies kamienai. *M. pachydermatis*, kuri yra vienintelė nuo lipidų nepriklausoma genties atstovė, atveju netipiškumas aprašytas kaip nesugebėjimas augti mitybinėje terpėje, nepraturtintoje riebalų rūgštimis.

M. furfur rūšies mielės priklauso žmonių odos saprofitinei mikroflorai, tačiau literatūros duomenimis šiai rūšiai priklausančys kamienai yra išskirti iš įvairių mėginių, paimtų nuo šunų, arklių, galvijų, šikšnosparnių ir, netgi, nuo ligoninės grindų (Cafarchia ir kt., 2007; Crespo ir kt., 2000, 2002; Gandra ir kt., 2008; Tanaka ir kt., 2001). Lyginant įvairių mokslinių grupių atliktus darbus, pastebima, kad *M. furfur* rūšies atstovai pasižymi dideliu genotipiniu variabilumu. Aprašyti skirtingi genotipai siejami su išskirtų izoliatų geografine kilme, žmogaus, nuo kurio odos paimtas mėginys, amžiaus, kūno vietos ar odos susirgimo pobūdžio, bei šeimininko (t.y. nuo žmogaus ar gyvūno buvo

išskirtas kamienas) (Castella ir kt., 2005; Gaitanis ir kt., 2009; Gandra ir kt., 2006; Takahata ir kt., 2007).

Literatūroje yra aprašyti nuo lipidų priklausomi *M. pachydermatis* rūšies mielių kamienai, nesugebantys augti ant Saburo agarizuotos mitybinės terpės. Nors ši rūšis laikoma nepriklausoma nuo aplinkoje esančių lipidų šaltinio, minėti kamienai augo tik mitybinėse terpėse, kurių sudėtyje buvo ilgagrandžių (C12 – C24) riebalų rūgščių (Bond, Anthony, 1995; Cafarchia ir kt., 2007; Duarte ir kt., 2002). *M. pachydermatis* rūšiai priklausančios mielės dažniausiai išskiriamos nuo gyvūnų, bet aprašytas atvejis, kai ši rūšis buvo išskirta kaip komensalinis mikroorganizmas nuo gyvūnus (t.y. šunis) laikančių žmonių odos (Morris, 2005). Kai kurių autorių nuomone, išskirti nuo lipidų priklausomi *M. pachydermatis* rūšies kamienai galėjo būti adaptacijos prie kito šeimininko (t.y. prisitaikant gyventi ne ant gyvūno, bet žmogaus odos) stadijoje, kurios metu didėja jų priklausomumas nuo egzogeninių lipidų (Cafarchia ir kt., 2007).

Mūsų darbe išskirti netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintys *Malassezia* genties mielių kamienai galėjo būti adaptacijos prie aplinkos sąlygų stadijoje. Fenotipinis ir genotipinis variabilumas būdingas mikroorganizmams, kurie infekcijos metu ekspresuoja genus, dalyvaujančius kolonizacijoje ir patogeniniame procese, t.y. su šeimininkų infekavimo strategija. Aprašyta, kad *C. albicans* mielės, kurios priklauso žmogaus gleivinių normaliai mikroflorai, pasikeitus aplinkos sąlygoms (pav., imunosupresijos atveju), gali sukelti infekcijas ekspresuodama virulentiškumo faktorius koduojančius genus. Reaguojant į aplinkos signalus išsivystė adaptacijos prie šeimininko mechanizmas, kurio metu perjungiami įvairūs metabolitiniai keliai, siekiant užsitikrinti mitybinių medžiagų prieinamumą. Aprašyta, kad *Candida* genčiai priklausančiose mielėse egzistuoja koreliacija tarp fenotipo ir metabolizmo variabilumų, taip prisitaikant prie maisto medžiagų prieinamumo (Lan ir kt., 2002; Staib ir kt., 2001). Adaptacijos prie šeimininko teorija iškelta *Candida* mielių atveju, bet, mūsų nuomone, galima pritaikyti ir *Malassezia* genčiai priklausančioms mielėms. Šios dvi gentys yra filogenetiškai tolimi žmogaus komensaliniai mikroorganizmai ir oportunistiniai

patogenai, bet, išanalizavus genomų sekoskaitos rezultatus paaiškėjo, kad *M. globosa* ir *C. albicans* rūšių genome yra panašias ekstraląstelines hidrolazes koduojantys genai. Žinoma, kad patogeninių grybų išskiriami fermentai yra svarbūs jų invazijai ir išplitimui pas šeimininką, todėl peršasi išvada, kad ekstraląstelinės lipazės, fosfolipazės ir lipoksigenazės dalyvauja *Malassezia* genties mielių patogeniškumo mechanizme. Eksperimento autoriai iškėlė hipotezę, kad vienodų šeimų genų buvimas abejose gentyse susijęs su vienodomis jų funkcijomis mikroorganizmams kolonizuojant šeimininką ir ekspresuojant virulentiškumo faktorius koduojančius genus (Staib ir kt., 1999; Xu ir kt., 2007). Kai kurie autoriai teigia, kad *Malassezia* genties mielių išskiriamos lipazės susijusios su adaptavimusi prie žmogaus odos: metabolizuoja aplinkoje esančius lipidus ir integruoja riebalų rūgštis į mielių ląstelių sienelės (DeAngelis ir kt., 2005; Tajima ir kt., 2008). Neseniai atliktų eksperimentų rezultatai patvirtino prielaidą, kad lipazės ir fosfolipazės gali veikti kaip virulentiškumo faktoriai, nes jas koduojantys genai stipriau ekspresuojami *Malassezia* genčiai priklausančių mielių kamienuose, išskirtuose nuo seborėjinio dermatitu ar spalvotąja dedervine sergančių žmonių, lyginant su sveikais žmonėmis (Patino-Uzcategui ir kt., 2011). Taip pat manoma, kad odos paviršiuje esantys lipidai įtakoja *Malassezia* genčiai priklausančių mielių fenotipą, nes, kaip jau minėta, šios mielės geba tiesiogiai, be tolesnio metabolizmo, įterpti riebalų rūgštis į ląstelės lipidus. Fenotipinis perjungimas vyksta tarp komensalinio (arba imunosupresinio) ir patogeninio (arba imunostimuliacinio) būvių (Ashbee, Evans, 2002). Mūsų nuomone, pagal iš aplinkos gaunamus signalus *Malassezia* genties mielės reguliuoja įvairių lipazių ekspresiją ir taip optimaliai adaptuojasi prie aplinkos, t.y. lipazės dalyvauja tiek adaptacijos prie šeimininko, tiek patogeninio fenotipo mechanizme. Mūsų darbo metu nustatytos netipinės *Malassezia* mielių kamienų savybės gali būti tiesiog metabolizmo kelių perjungimas ekspresuojant alternatyvius genus, įvykęs dėl aplinkos sąlygų pasikeitimo ir organizmo perėjimo iš komensalinio į patogeninį būvį. Kaip minėta anksčiau, mielės mūsų tyrimo metu išskirtos nuo AD sergančių žmonių odos. AD

paveiktai odai būdingi niežtintys, uždegiminiai odos židiniai. Gali būti, kad AD sergantys žmonės, nuo kurių odos išskirti netipiniai *Malassezia* genties kamienai, vartojo vaistinius ar kosmetinius preparatus, kurie turėjo įtakos *Malassezia* mielių aplinkoje esančiai lipidų sudėčiai. Reaguojant į aplinkos signalus buvo perjungti metabolitiniai keliai siekiant užsitikrinti mitybinių medžiagų prieinamumą.

Malassezia genčiai priklausančių mielių gebėjimas grįžtamai perjungti fenotipą iš mielių į pseudohifų (septos neturi porų, todėl pavadinta pseudohifais) galėtų būti kaip pavyzdys, kad genų reguliacija oportunistiniuose mikroorganizmuose yra sudėtinga ir priklausoma ne nuo vieno, o nuo daugelio veiksnių. Viena iš pseudohifų funkcijų yra mikroorganizmo perkėlimas į gilesnius, daugiau maisto medžiagų turinčius odos sluoksnius, kur vėl įgaunama mielių morfologija ir formuojamos naujos kolonijos. Mikroskopuojant odos atplaišas, paimtas nuo spalvotąją dedervine sergančių žmonių, dažnai matomi pseudohifai su didelėmis, apvaliomis mielių ląstelėmis („spagečiai su mėsos kukuliais“) (Batra ir kt., 2005). *M. globosa* rūšies atstovai laikomi pagrindiniu spalvotosios dedervinės sukėlėju. Pirminėse kultūrose, paimtose nuo šia liga sergančių žmonių odos, dar galima mikroskopuojant pamatyti pseudohifus, bet micelinis augimas šiai rūšiai niekada nebuvo indukuotas *in vitro* (Brand, 2012). Literatūros duomenimis, naudojant skirtingas strategijas tik trims mokslininkų grupėms pavyko iššaukti pseudohifų susidarymą. Vienu atveju mitybinė terpė buvo praturtinta glicerinu (Dorn, Roehnert, 1977). Tais pačiais metais publikuoti eksperimento rezultatai, teigiantys, kad hifų indukciją skatina cholesterolis ir cholesterolio esteriai (Porro ir kt., 1977). Dar po kelių metų publikuotas straipsnis, aprašantis micelio susidarymą kultūroje, kuri inkubuota padidinto anglies dioksido sąlygomis (Faergemann, Bernander, 1979). Kadangi visais atvejais naudotos skirtingos kultivavimo sąlygos, o šiuos eksperimentus pakartoti labai sunku, lieka neaišku, kokie konkrečiai veiksniai įtakoja *Malassezia* genties mielių fenotipo pasikeitimą. Be to, *in vitro* atliekami eksperimentai ne visada gali atkartoti sąlygas, susidarancias *in vivo*.

Kaip minėta aukščiau, lipofiliškumas *Malassezia* genčiai priklausančiose mielėse yra genetiškai nulemta fiziologinė savybė. *M. globosa* ir *M. restricta* rūšims priklausančių mielių genomų sekoskaitą atlikę mokslininkai aprašė, kad šios dvi mielių rūšys neturi riebalų rūgščių sintazės geno, bet paminėjo, kad vieno iš nuskaitytų genų seka labai panaši į gyvūnuose esančios riebalų rūgščių sintazės geno seką. Tolesnių tyrimų metu buvo padaryta išvada, kad tai gali būti poliketidsintazės geno seka, nes lyginant baltymų sekas paaiškėjo, kad 68 iš 100 labiausiai panašių baltymų atlieka poliketidsintazių funkcijas. Daugelio kitų genų funkcijų nepavyko nustatyti (Xu ir kt., 2007). Kadangi mes išskyrėme netipinius *M. furfur* mielių kamienus, kurie geba bent kurį laiką tarpą išgyventi be iš aplinkos gaunamų lipidų, bandėme pagrįsti šią fiziologinę savybę literatūroje aprašytais duomenimis. *M. globosa* ir *M. restricta* yra stipriai priklausomos nuo lipidų, vienos iš reikliausių mitybiniu požiūriu rūšys, kurios neauga nė ant vieno iš *Malassezia* genties mielių identifikavimui naudojamo lipidų šaltinio. Kaip minėta aukščiau, *M. furfur* rūšies kamienai yra labiausiai paplitę aplinkoje, lengviausiai kultivuojami laboratorinėmis sąlygomis, ir pasižymintys dideliu genotipiniu variabilumu. Egzistuoja galimybė, kad ši rūšis sugeba pati susisintetinti lipidus, galbūt nedideliais kiekiais, kad išgyventų periodą, kai aplinkoje trūksta maisto medžiagų. Literatūroje nėra duomenų apie *Malassezia* genčiai priklausančių mielių gebėjimą kaupti lipidų atsargas ląstelėje. Jei šios genties atstovai yra visiškai priklausomi nuo aplinkoje esančių lipidų, evoliucijos eigoje turėjo išsivystyti mechanizmas, padedantis kurį laiką išgyventi mitybinių medžiagų trūkumo aplinkoje metu. Mūsų darbo metu išskirti netipiniai *M. furfur* rūšiai priklausantys kamienai augo lipidais nepraturtintose mitybinėse terpėse. Vienas iš galimų šios fiziologinės savybės paaiškinimų būtų alternatyvių metabolizmo kelių įjungimas ląstelėse ir (arba) sukauptų riebalų rūgščių atsargų panaudojimas.

Atlikus *M. globosa* rūšiai priklausančių kamienų geno sekoskaitą paaiškėjo, kad jame yra kryžminimosi genai. Filogenetiškai artimiausias *Malassezia* genčiai yra augalų patogenas *Ustilago maydis*. *Ustilago* rūšys turi a

lokusą, koduojantį feromonus ir feromonų receptorių, ir *b* lokusą, koduojantį homeodomeno transkripcijos faktorius. *M. globosa* rūšiai priklausančio kamieno genome aptikti genai yra analogiški *a* ir *b* lokusų genams. *M. restricta* rūšies kamienų genome taip pat aptiktos kelios homologinės kryžminimosi genams sekos (Xu ir kt., 2007). Kryžminimosi lokuse esantys genai yra labai konservatyvūs, net jei jie aptinkami grybuose, kuriems nebūdingas lytinis dauginimasis. Koduojančių sekų buvimas genome nėra įrodymas, kad geno seka yra teisingai transkribuojama ir transliuojama (Butler, 2010). Literatūroje duomenų apie *Malassezia* genčiai priklausančių mielių lytinį dauginimąsi nėra, bet kelių eksperimentų autoriai iškėlė prielaidas apie galimą keitimąsi genetinė medžiaga. Aprašyta, kad tiriant *M. pachydermatis* rūšiai priklausančių kamienų baltymų polimorfizmą identifikuoti 27 elektroforetiniai tipai (elektromorfos), kurie sudarė penkias grupes. Grupės sutapo su izoliatų šeimininkais (gyvūnų rūšimis, nuo kurių išskirti tiriamieji kamieniai). Dalinis atsitiktinis genotipų pasiskirstymas grupėse koreliavo su panašaus eksperimento, kuriame genetinis variabilumas tirtas analizuojant didžiojo rRNR subvieneto sekas, rezultatais. Remdamiesi įvairiais literatūros šaltiniais, autoriai tai aiškino genetinės medžiagos keitimusi tarp įvairių *M. pachydermatis* genetinių grupių (Midreuil ir kt., 1999). Tai, kad vienoje populiacijoje kai kurių *Malassezia* rūšių (t.y. *M. pachydermatis* bei *M. furfur*) kamienų ląstelės būna skirtingų dydžių ir formų, bei daugiau nei vieno genotipo ant šeimininko aptikimas taip pat aiškinamas skirtingu ploidiškumu, kas būdinga kitoms mielių rūšims (Guillot ir kt., 1997; Mittag, 1994). Literatūroje vis dažniau aprašomi netipinėmis savybėmis pasižymintys kamieniai, tokie kaip nuo lipidų priklausomi *M. pachydermatis* ar pleomorfiniai *M. furfur* variantai. Negalima atmesti galimybės, kad tarp *Malassezia* genčiai priklausančių mielių vyksta keitimasis genetinė medžiaga, kas paaiškintų netipines mūsų darbe išskirtų *M. furfur* ir *M. restricta* kamienų savybes.

Kaip jau minėta, pirmo ir antro nekoduojančių rRNR vidinių transkribuojamų intarpų regionų ITS1 ir ITS2 bei 26S rRNR geno variabilių D-domenų (D1 ir D2) sekų analizė naudojama bazidiomicetinių mielių

identifikacijai. Laikoma, kad identišką D1/D2 seką turintys mielių kamienai priklauso vienai rūšiai (Fell ir kt., 2000). Kamienai, kurių D1/D2 regiono sekos skiriasi dviem ir daugiau nukleotidų, priklauso skirtingoms rūšims. Kai kurios skirtingoms gentims priklausančios mielės turi identišką D1/D2 seką (pvz., *Cryptococcus magnus* ir *Filobasidium elegans*). Tokių kamienų identifikacijai dažniausiai atliekama vidinių transkribuojamų intarpų sekoskaita ir sekų analizė. Daugumai bazidiomicetinių mielių galioja bendra taisyklė: kamienas priskiriamas atitinkamai rūšiai, jei jo ir referentinio rūšies kamieno ITS sekų panašumas $\geq 97\%$ (Cabanés ir kt., 2005; Makimura ir kt., 2000; Scorzetti ir kt., 2002; Sugita ir kt., 1999). Literatūros duomenimis, lytiniu būdu daugintis gebančių mielių kamienų ITS ir D1/D2 DNR regionų sekos gali pasižymėti didesniais skirtumais. Pavyzdžiui, *Rhodosporidium* genčiai priklausančių mielių kamienai priskiriami skirtingoms rūšims, jei jų ITS sekų panašumas sudaro $\leq 92\%$ (Hamamoto ir kt., 2002; Scorzetti ir kt., 2002). Mūsų darbo metu išskirto netipinio *M. restricta* rūšies kamieno ITS-5,8S DNR regiono sekos panašumas su tipinio *M. restricta* CBS 7877T kamieno atitinkama DNR seka buvo tik 73 %. Skirtumas tarp sekų pakankamai didelis, kad netipinį kamieną galima būtų priskirti naujai rūšiai. Tačiau daugėjant netiesioginių įrodymų apie keitimąsi genetinė medžiaga tarp *Malassezia* genties mielių, reikėtų atlikti detalesnį tyrimą ir patikslinti genų sekų skirtumus, norint *Malassezia* mielių kamieną priskirti naujai rūšiai.

Ankstesni epidemiologiniai tyrimai buvo paremti tik klasikinės mikrobiologijos metodais, tad skirstymas į rūšis rėmėsi tik kamienų morfologinėmis, fiziologinėmis ir biocheminėmis savybėmis. Molekuliniams metodams tapus prieinamiems ir mažose laboratorijose dirbantiems mokslininkams, dauguma atliktų epidemiologinių eksperimentų rezultatų remiasi vien DNR sekoskaitos duomenimis. Molekuliniiais metodais gauti duomenys retai patvirtinami fenetiniais metodais, kadangi *Malassezia* genčiai priklausančios mielės yra sunkiai kultivuojamos (Paulino ir kt., 2006; Sugita ir kt., 2006; Tajima ir kt., 2008; Zhang ir kt., 2011). Egzistuoja galimybė, kad netipinių rūšių pasitaiko dažniau, bet jos nenustatomos, nes kamienų

identifikacijai naudojami vien klasikiniai mikrobiologiniai arba molekulinės biologijos metodai, o ne abu – papildantys vienas kitą. Didėjantis informacijos kiekis apie išskiriamus netipinius *Malassezia* genčiai priklausančių mielių kamienus gali reikšti, kad rūšies biologija yra svarbus kriterijus mielių sistematikoje, o vien tik DNR seka neaprašo rūšies.

Lipofilinės prigimties *Malassezia* genčiai priklausančios mielės yra oportunistiniai patogenai, sudarantys sveikos žmonių odos mikroflorą (Akaza ir kt., 2010b; Gao ir kt., 2010). Daugėja įrodymų, kad susiklosčius tam tikroms sąlygoms šios mielės gali dalyvauti tokių susirgimų kaip spalvotoji dedervinė, seborėjinis dermatitas ar atopinis dermatitas patogenezėje (Gupta ir kt., 2004a). Svarbu pabrėžti, kad AD atveju *Malassezia* genčiai priklausančių mielių ląstelių kiekis ant odos nebūtinai padidėja, bet ligos sukelti odos barjerinės funkcijos pažeidimai sudaro sąlygas šioms mielėms dalyvauti imunologinėse reakcijose (Selander ir kt., 2006). Literatūros duomenimis, visame pasaulyje *Malassezia* genčiai priklausančių mielių išauginama iš 46–100 % mikrobiologinių mėginių, paimtų nuo AD paveiktos ir 75–80 % sveikos žmonių odos. Dažniausiai išskiriamos rūšys yra: *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* ir *M. restricta* (Casagrande ir kt., 2006; Yim ir kt., 2010; Nakabayashi ir kt., 2000; Rincon ir kt., 2005; Sugita ir kt., 2006; Zhang ir kt., 2011). Pastebėta, kad *Malassezia* mielių paplitimui ant odos turi įtakos AD eigos sunkumas (apibrėžiamas SCORAD indeksu), pacientų amžius, lytis ir AD pažeistos kūno dalys (Akaza ir kt., 2010a; Kaga ir kt., 2009; Takahata ir kt., 2007; Zhang ir kt., 2011). Kitoms gentims priklausančių mielių paplitimas ant AD pažeistos odos mažai tirtas. Esamų tyrimų rezultatai leido padaryti išvadas, kad AD paveikta oda yra labiau kolonizuota ir jos mikrobiota yra įvairesnė lyginant su sveika oda. Paviršinis raginis odos sluoksnis formuoja apsauginį barjerą, neleidžiantį iš aplinkos prasiskverbti medžiagoms, kurių molekulinė masė per 500 daltonų. Didelės molekulinės masės mikroskopinių grybų junginiai negali prasiskverbti pro intaktinę odą. Sausoje odoje atsiradę įtrūkimai ar žaizdota atopinio dermatito oda leidžia mikroorganizmams pereiti odos barjerą ir sukelti imunologinį atsaką (Bieber, 2008). Kitos nuo AD

sergančių žmonių odos išskiriamos mielių rūšys, kurios gali įtakoti ligos eigą, yra šios: *C. albicans*, *Cryptococcus diffluens*, *Cr. liquefaciens* (Faergemann, 2002; Kato ir kt., 2007; Sugita ir kt., 2003b; Zhang ir kt., 2011). Mūsų atlikto tyrimo rezultatai patvirtina šiuos literatūroje paskelbtus duomenis ir leidžia teigti, kad AD pažeista oda yra intensyviau kolonizuota *Malassezia* ir *Candida* genčių mielėmis lyginant su sveika oda. Šis skirtumas iš dalies susijęs su odos fiziologinėmis ir aplinkos sąlygomis. AD susirgimo atveju grybų mikrobiotą veikia pasikeitęs odos pH, padidėjęs transepiderminis vandens praradimas ir sumažėjusi antimikrobinių peptidų ekspresija (Howell, 2007; Seidenari, Giusti, 1995; Selander, 2006).

Nuo kontrolinę grupę sudarančių žmonių odos paimtuose mikrobiologiniuose pasėliuose (paimtų nuo sveikos odos) mielės neišaugo. Kiti grybai, išskyrus *Malassezia* genties atstovus, nėra sveikos odos mikrofloros mikroorganizmai. Intaktinė oda formuoja fizinį barjerą, turintį daugelį apsauginių mechanizmų, todėl iš aplinkos patekę komensaliniai ar tranzitiniai mikroorganizmai yra pašalinami ir nesugeba ant jos ilgiau išgyventi. Kitaip yra su *Malassezia* genčiai priklausančiomis mielėmis, kurios dažnai išskiriamos nuo sveikos suaugusių žmonių odos (Akaza ir kt., 2010b; Ashbee, Evans, 2002). Mūsų tyrimo metu nuo kontrolinę grupę sudarančių žmonių odos paimtuose mikrobiologiniuose pasėliuose neišaugo *Malassezia* genčiai priklausančių mielių. Lyginant mūsų darbe gautus duomenis su kitose šalyse atliktų panašių eksperimentų rezultatais, Lietuvoje šios genties mielės išskiriamos retai. Tai invazinės Lietuvoje rūšys, todėl apie *Malassezia* genties mielių paplitimą iki šiol nėra paskelbtų epidemiologinių tyrimų rezultatų. Žinomas tik vienas rašytinis šaltinis apie *M. furfur* mielių išskyrimą nuo žmogaus odos Lietuvoje (Lugauskas ir kt., 2002). Laikomasi nuomonės, kad odos mikroaplinka yra svarbus faktorius *Malassezia* genčiai priklausančių mielių populiacijos vystymuisi, todėl vienas iš galimų šios situacijos paaiškinimų būtų geografinių padėčių skirtumai tarp šalių, kuriose atliekami panašūs tyrimai. Dar prieš dešimtmetį buvo pastebėta, kad toks susirgimas kaip spalvotoji dedervinė, kurią sukelia *M. furfur* mielės, yra paplitęs visame

pasaulyje, bet daugiausia šio susirgimo atvejų užfiksuojama atogrąžų klimato šalyse. *Malassezia* genties atstovų dominavimu drėgname ir šiltame klimato, kuriame didesni tokie odos paviršiaus parametrai kaip temperatūra ir drėgnumas, aiškinami ir besiskiriantys tarp įvairių šalių epidemiologinių tyrimų rezultatai (Aspiroz ir kt., 2002; Dutta ir kt., 2002; Gupta ir kt., 2004a; Khosravi ir kt., 2008; Midgley, 2000; Ramadan ir kt., 2012).

Analizuojant mūsų gautus rezultatus pastebėta, kad nė iš vieno mėginio *Malassezia* ir *Candida* gentims priklausančių mielių kamienų kartu neišskirta. Šių genčių atstovai dalijasi ta pačia ekologine niša, todėl buvo galima tikėtis išskirti jas abi kartu iš dalies mėginių. Galimas gauto rezultato paaiškinimas gali būti susijęs su augimo greičio skirtumais: reiklius kultivavimo sąlygoms, lėtai augančius *Malassezia* genties mielių kamienus galėjo užgošti *Candida* genčiai priklausančios mielės, kurios neturi specialių mitybinių reikalavimų. Be to, kelios *Candida* rūšys pasižymėjo kileriniu aktyvumu, nukreiptu prieš *M. furfur* mielių kamienus (šio darbo metu gauti neskelbti duomenys). Literatūros duomenimis, gebėjimas išskirti kitiems mikroorganizmams letalias medžiagas (taip vadinamas kilerinis fenomenas) yra plačiai paplitęs tarp mielių, kuomet taip pat galima būtų paaiškinti *Candida* mielių dominavimą *Malassezia* mielių atžvilgiu (Golubev, 1998).

Mūsų atlikto tyrimo metu nustatyta, kad suaugusių asmenų AD pažeista oda du kartus dažniau yra kolonizuota mielėmis negu vaikų. Mikrobiologiniuose pasėliuose, paimtuose nuo vaikų odos, *Malassezia* genties mielių išskirta 1,4 %. Šie rezultatai atitinka literatūroje aprašytus eksperimentų rezultatus, kurie leido suformuluoti išvadą, kad odos kolonizavimas *Malassezia* genčiai priklausančiomis mielėmis išauga maždaug paauglystės metu ir yra susijęs su šiame amžiaus tarpsnyje stebimu riebalinių liaukų veiklos suaktyvėjimu (Cunningham ir kt., 1992; Ong ir kt., 2010; Sugita ir kt., 2010; Takahata ir kt., 2007). Literatūros duomenimis, AD sergančių vaikų oda dažniausiai yra infekuota bakterijomis *Staphylococcus aureus*, kurios išskiriami toksinai blogina ligos eigą, nes indukuoja toksinams specifinių IgE gamybą ir aktyvina Th2 ląsteles, eozinofilus bei keratinocitus. Vyrauja

nuomonė, kad vaikų odą mielės kolonizuoja itin retai. Manoma, kad reti odos kolonizacijos mielėmis atvejai yra susiję su pernelyg dažnu antibiotikų vartojimu, kadangi po antibakterinės terapijos padidėja tikimybė užsikrėsti mielinėmis (ypatingai *Candida*) infekcijomis (Baker, 2006; Bunikowski ir kt., 1999, 2000).

Iš 51 % mėginių, paimtų nuo suaugusių žmonių odos, išskirti mieliniai grybai. Lyginant literatūroje aprašytų panašių tyrimų rezultatus pastebėta, kad AD pažeistos odos kolonizacijos mielėmis dažnis šioje amžiaus grupėje yra panašus ir sudaro ~50 % (Yim ir kt., 2010; Saghazadeh ir kt., 2010). Suaugusių žmonių amžiaus grupėje dominavo *C. famata* ir *C. pelliculosa* rūšims priklausančios mielės. Šios dvi rūšys, kaip ir *R. rubra*, yra plačiai paplitusios aplinkoje ir dažnai išskiriamos iš tokių substratų kaip dirva, vandens telkiniai, vaisiai, daržovės, sūris ir kiti organiniai junginiai, bet retai pasitaiko klinikiniuose mėginiuose (Barnett, Yarrow, 2000; Lugauskas ir kt., 2002; Neofytos ir kt., 2007; Pfaller, Diekema, 2007). Šiuos mikroorganizmus būtų galima priskirti tranzitinei odos mikroflorai, bet dažnas jų aptikimas mūsų tirtuose mėginiuose leidžia daryti prielaidą, kad jie gali dalyvauti AD patogenezėje. Įrodyta, kad odą pakartotinai veikiant haptenu – nevisaverčiu antikūnu, nesugebančiu sužadinti imuninio atsako, bet sugebančiu reaguoti su specifiniais antikūnais – prasideda T ląstelių diferencijacija ne į Th1 limfocitus (atsakingus už uždelsto tipo padidintą jautrumą), bet į Th2 (atsakingus už greito tipo padidintą jautrumą su specifinių IgE antikūnų gamyba) (Kitagaki ir kt., 1995). Remiantis šiomis išvadomis, galima suformuluoti prielaidą, kad AD sergantys individai pasižymi padidintu jautrumu į savo odos mikroflorą. Dauguma mūsų tyrimo metu išskirtų mielių yra nepatogeniniai, aplinkoje plačiai paplitę mikroorganizmai. Atsižvelgiant į antigeninį variabilumą ir kryžminių reakcijų gausą tarp grybų rūšių, buvo iškelta prielaida, kad jos įtakoja imuninius procesus, vykstančius AD eigoje.

Siekiant nustatyti, ar mūsų tyrimo metu nuo AD pažeistos odos išskirtos ir identifikuotos mielės gali sukelti specifinių IgE antikūnų gamybą, atlikta imunofermentinė analizė, kurios metu kaip antigenai naudoti iš mielių

pagaminti baltymų ekstraktai. Iš *C. parapsilosis*, *M. furfur* ir *M. restricta* rūšims priklausančių mielių paruošti ekstraktai nereagavo su tiriamais serumais. Literatūros duomenimis, šiuo metu identifikuoti ir klonuoti 13 alergenų genai iš dviejų *Malassezia* rūšių. Aprašyta, kad 70-80 % AD sergančių asmenų kraujo serume yra specifinių IgE antikūnų prieš šiuos alergenus. Vyrauja nuomonė, kad iš visų mikroskopinių grybų *Malassezia* genties atstovai turi didžiausią įtaką AD išsivystymui ir eigai (Simon-Nobbe ir kt., 2008; Svejgaard ir kt., 2004). Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš tirtas *Malassezia* rūšis, neaptikimas kraujo serume galėtų būti paaiškintas tuo, kad Lietuvoje šios genties mielės palyginti retai išskiriamos iš mėginių, paimtų nuo žmonių odos. Kaip minėta aukščiau, *Malassezia* genčiai priklausančių mielių paplitimą įtakoja klimatinės sąlygos, tad jos labiau būdingos atogrąžoms. Tikėtina, kad žmonėms pradėjus dažniau lankytis egzotiškuose kraštuose, šie mikroorganizmai buvo atvežti į Lietuvą, bet jų plitimą riboja aplinkos sąlygos, kurios čia nėra optimalios *Malassezia* genties atstovams. Be to, imuninė sistema į mikroskopinius grybus paprastai reaguoja formuodama ląstelinį imunitetą ir T ląstelėms diferencijuojantis į Th1 limfocitus, kurių receptoriai atpažįsta mikroorganizmų sintetinius baltymus. Tik ilgalaikis ir pakartotinas veikimas antigenais (šiuo atveju *Malassezia* mielėmis) gali sukelti Th2 limfocitų gamybą ir specifinių IgE antikūnų sintezę. Skirtingai nuo *Malassezia*, *Candida* genties mielės yra nereiklūs aplinkos sąlygoms mikroorganizmai, kurie Lietuvoje dažnai išskiriami iš mėginių, paimtų nuo žmonių odos. Šiuo metu yra identifikuoti ir klonuoti du *Candida* alergenai, bet iki šiol nesutariama, ar šie mikroorganizmai dalyvauja alerginėse reakcijose ir turi įtakos AD eigai. Specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš *Candida* antigenus, aptikimo AD sergančių asmenų kraujo serume dažnis skiriasi lyginant įvairių tyrimų rezultatus (Khosravi ir kt., 2008; Kosonen ir kt., 2005). Literatūroje aprašytas eksperimentas, kurio metu iš *C. albicans* mielės išskirti trys 46-, 43- ir 37-kDa antigenai, reaguojantys su specifiniais IgE antikūnais. Identifikavus šių baltymų aminorūgščių sekas, paaiškėjo, kad jie yra homologiški *S. cerevisiae* mielės enolazei, fosfogliceratkinazei ir aldolazei.

Žinoma, kad *S. cerevisiae* šie baltymai dideliais kiekiais kaupiasi citoplazmoje ir jų bei glikolizės fermentų sintezė reguliuojama koordinuotai. Manoma, kad fermentų sintezė panašiai reguliuojama ir *C. albicans* ląstelėje. Autoriai iškėlė prielaidą, kad įvykus ląstelių lizei į aplinką patenka dideli kiekiai glikolizės fermentų, kurie veikia kaip antigenai. Taigi, nors *Candida* genčiai priklausančios mielės pasižymi silpnomis alergizuojančiomis savybėmis, saprofitinio augimo metu jos išskiria potencialiai alergizuoti galinčias medžiagas, kurios sukelia specifinių IgE antikūnų sintezę (Ishiguro ir kt., 1992; Savolainen ir kt., 1990).

Imunofermentinės analizės metodu gauti optiniai tankiai, rodantys specifinių IgE antikūnų (nukreiptų prieš tirtas mielių rūšis) kiekį kraujo serumuose yra nedideli lyginant su kontroliniais mėginiais. Tokie rezultatai leidžia daryti išvadą, kad specifinio baltymo (baltymų?) kiekis mielių ekstraktuose yra labai nedidelis. Tyrimo metu taip pat bandyta mėginius titruoti, t.y. 24 valandų intervalais serumai buvo pernešami iš vieno šulinėlio, padengto vienos mielės ekstraktu ant kito šulinėlio, padengto tuo pačiu ekstraktu. Atlikus matavimus paaiškėjo, kad visuose titruotuose mikroplokštelės šulinėliuose išliko toks pat optinis tankis. Tai leidžia daryti prielaidą, kad specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš tirtas mielių rūšis kiekis tirtuose serumuose buvo pakankamai didelis (šio darbo metu gauti neskelbti duomenys).

Literatūroje yra aprašytų eksperimentų, kurių metu nustatyta, kad kuo didesnis AD sergančio asmens kraujo serume esantis bendro IgE kiekis, tuo daugiau tame serume aptinkama specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš *C. albicans* ir *Malassezia* genčiai priklausančias mieles. Remiantis šiais duomenimis, mūsų atlikto tyrimo pradžioje taip pat tikėtasi nustatyti koreliaciją tarp bendro IgE ir specifinių IgE, nukreiptų prieš baltymų ekstraktus, kiekio serume. Buvo iškelta prielaida, kad kuo didesnis bendras serume esančių IgE antikūnų kiekis, tuo didesnė tikimybė, kad jis reaguos su mūsų paruoštais mielių ekstraktais. Koreliacijos tarp šių dviejų dydžių neaptikta. Kaip minėta aukščiau, tikėtina, kad *Candida* mielių baltymai nesugeba sukelti stiprios, prieš

juos nukreiptos specifinių IgE antikūnų gamybos, o greičiau veikia kaip ligos eigą sunkinantis faktorius dėl kryžminių reakcijų su kitais alergenais. Koreliacija tarp bendro ir specifinių IgE antikūnų kiekių dažniau stebima sunkaus AD, o ne lengvo ar vidutinio (kaip mūsų tirtų asmenų) atvejais (Kaga ir kt., 2009).

Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad prieš tirtas mieles nukreipti specifiniai IgE antikūnai dažniausiai aptinkami serumuose, turinčiuose specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš namų dulkių erkių alergenus. Namų dulkių erkės laikomos svarbiausiais rizikos faktoriais, gebančiais sukelti alergijas namų sąlygomis, o *D. pteronyssinus* ir *D. farinae* – labiausiai paplitusios erkių rūšys visame pasaulyje (Takai ir kt., 2005). Literatūros duomenimis, svarbiausi šių erkių alergizuojantys baltymai yra tarpusavyje homologiški, o 80 % namų dulkių erkėms jautrių individų serumuose aptinkami prieš juos nukreipti specifiniai IgE antikūnai. Aprašyta, kad šie alergenai geba kryžmiškai reaguoti su skirtingų erkių rūšių bei kitų bestuburių išskirtais baltymais (Sidenius ir kt., 2001; Thomas ir kt., 2004). Taip pat yra žinoma, kad dauguma mikroskopiniuose grybuose esančių alergizuojančių baltymų turi homologinius IgE antikūnus surišančius atitikmenis organizmuose, nepriklausančiuose grybų karalystei (Simon-Nobbe ir kt., 2008). Be to, literatūros duomenimis, vidutinės ar sunkios eigos AD yra susijęs su įsijautrinimu dulkių erkėms ir mikroskopiniams grybams (Scalabrin ir kt., 1999). Remiantis šiais duomenimis, mes iškėlėme prielaidą, kad mūsų tirtos mielių rūšys gali būti susijusios su AD eiga dėl kryžminių reakcijų, vykstančių tarp jų ir namų dulkių erkių alergizuojančių baltymų.

Taip pat darbo metu tėkmės citometrijos metodu bandyta nustatyti, ar tirtuose serumuose esantys prieš mielių ekstraktus nukreipti specifiniai IgE antikūnai gali atpažinti tirtų mielių ląstelių paviršiuje išsidėsčiusius antigenus. Antikūnai neprisijungė prie tirtų mielių ląstelių paviršiaus. Panašūs rezultatai aprašyti ir kitų autorių darbuose. Tai leidžia teigti, kad dauguma identifikuotų mikroskopinių grybų alergenų yra viduląsteliniai baltymai, kurie patenka į

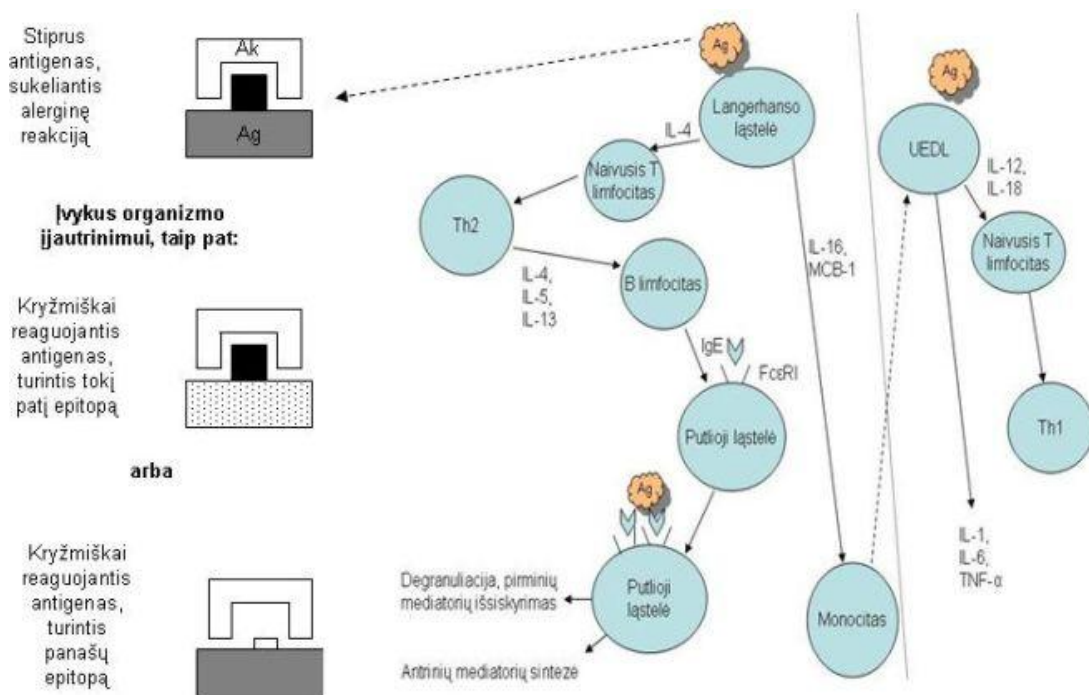
aplinką ląstelių žūtis metu arba yra tikslingai išskiriami (Simon-Nobbe ir kt., 2008).

Dauguma mūsų tirtų serumų turėjo specifinių IgE antikūnų, nukreiptų ne prieš vieną, bet prieš kelias tirtas mielių rūšis. Konkurentinės inhibicinės imunofermentinės analizės metodu nustatyta nepilna kryžminė inhibicija tarp IgE klasės antikūnų. Tai leidžia teigti, kad mūsų tirtos mielių rūšys turi rūšiai specifinius ir dalinai persidengiančius antigenus. Panašūs rezultatai gauti ir kitų mokslinių grupių atliktų eksperimentų metu. Manoma, kad sensibilizacija tik viena mikroskopinio grybo rūšimi vyksta retai, nes daugumos jautrių individų kraujo serume cirkuliuoja specifiniai IgE antikūnai prieš keletą mieliagybių rūšių ir (ar) genčių (Savolainen ir kt., 1998; Simon-Nobbe ir kt., 2008).

2001 metais buvo pasiūlyta teorija, kad, įgijus jautrumą konkrečiai alergizuojančiai medžiagai (panalergenui), individo kraujo serume esantys IgE antikūnai gali susirišti su kryžmiškai reaguojančiais junginiais, kilusiais iš įvairių nesusijusių šaltinių (Mari, 2001). Ši teorija buvo iškelta tiriant augaluose esančius alergenų. Pastaraisiais metais vis daugėja duomenų, kad panaši situacija yra ir mikroskopinių grybų atveju. Oficialiame alergenų nomenklatūros sąrašė (<http://www.allergen.org>) nurodytas 101 iš mikroskopinių grybų išskirtas alergenas; 48 iš jų yra homologiški baltymai, galintys kryžmiškai reaguoti su specifiniais antikūnais, nukreiptais prieš atitinkamus kitų rūšių baltymus (Cramer, 2011b). Kaip pavyzdį galima pateikti MnSOD. Daugėja duomenų, kad MnSOD sudaro kryžmiškai reaguojančių alergenų šeimą. Eksperimentų metu įrodyta, kad specifiniai IgE antikūnai, nukreipti prieš *A. fumigatus* sintetinamą MnSOD, kryžmiškai reaguoja su žmogaus MnSOD. Palyginus šių baltymų kristalines struktūras buvo aptikti keli panašūs epitopai, galintys surišti tuos pačius antikūnus (Cramer ir kt., 1996; Fluckiger ir kt., 2002a). Homologiškas aminorūgščių sekas turinčios ir kryžminėse reakcijose dalyvauti gebančios MnSOD taip pat aprašytos tokiuose organizmuose kaip *Drosophila melanogaster*, *Hevea brasiliensis*, *E. coli*, *S. cerevisiae* ir *M. sympodialis* (Frealle ir kt., 2005). Kiti šiuo metu geriausiai ištirti kryžmiškai reaguojantys grybų baltymai yra

ciklofilinas, tioredoksinas ir rūgštinis ribosominis P2 baltymas. Visi jie yra filogenetiškai konservatyvūs baltymai, galintys sukelti su IgE antikūnų sinteze susijusias autoimunines reakcijas, nukreiptas prieš atitinkamus žmogaus baltymus (Fluckiger ir kt., 2002b; Valenta ir kt., 2009; Zeller ir kt., 2008).

Vis didėjant AD aktualumui svarbu nustatyti įvairius susirgimo patogenezę įtakojančius veiksnius ir jų veikimo mechanizmus. Šiame darbe nustatyta, kad AD pažeistą odą dažnai kolonizuoja komensalinės, plačiai žmogaus gyvenamojoje aplinkoje paplitusios mielės. Pažeista odos apsauginė barjerinė funkcija leidžia šiems mikroorganizmams patekti į organizmą ir inicijuoti imunologines reakcijas. Mikroorganizmui kontaktuojant su individu, kurio organizmas jau yra sensibilizuotas tam tikrais alergenais, gali pasunkėti AD eiga dėl kryžmiškai reaguojančių epitopų tarp identiško specifiškumo skirtingų biologinių rūšių antigenų (18 pav.).



18 pav. Atopinio dermatito imunologinis mechanizmas.

Greitas padidėjusio jautrumo reakcijas inicijuoti gali tik stiprus, visavertis antigenas (alergenai), gebantis susijungti su antigeną pateikiančios ląstelės membranoje esančia MHC II molekule ir sukelti IgE sintezę. Įvykus organizmo sensibilizacijai, tolesnėse imunologinėse reakcijose jau gali dalyvauti ir silpni alergenai, turintys tokius pačius ar panašius epitopus, kaip ir reakcijas pradėjęs antigenas. Šie kryžmiškai reaguojantys alergenai patys nesugeba sensibilizuoti organizmo, bet gali dalyvauti jau vykstančiame uždegiminiame procese ir amplifikuoti reakcijas.

Skirtingai nuo kitose šalyse atliktų panašių tyrimų rezultatų, mūsų darbo metu tirtuose kraujo serumuose nenustatyta specifinių IgE antikūnų, nukreiptų prieš išskirtas *Malassezia* genčiai priklausančias mieles. Reti šios genties atstovų išskyrimo atvejai Lietuvoje paaiškina gautus rezultatus. Netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižyminčių *Malassezia* kamienų išskyrimas gali reikšti, kad šios mielės aklimatizuojasi prie jų gyvenamajai aplinkai nebūdingo klimato ir ateityje jos bus mūsų krašte paplitęs alergizuoti gebantis mikroorganizmas.

IŠVADOS

1. 36,9 % atvejų atopinio dermatito pažeista oda yra kolonizuojama *Candida*, *Malassezia* ir *Rhodotorula* genties mielėmis.
2. Sistematinė ir filogenetinė analizė leidžia teigti, kad išskirtas netipinis *Malassezia restricta* kamienas M8 gali būti naujos rūšies atstovas.
3. Išskirti netipinėmis fiziologinėmis savybėmis pasižymintys *Malassezia* genties kamienai M47, M54 ir M235 identifikuoti kaip nuo išorinio lipidų šaltinio nepriklausantys *Malassezia furfur*.
4. Mielės suaugusių asmenų atopinio dermatito pažeistą odą kolonizuoja du kartus dažniau negu vaikų ($P < 0,0001$).
5. Atopiniu dermatitu sergančių asmenų kraujo serume aptinkama prieš kryžmiškai reaguojančius mielių viduląstelinis antigenus nukreiptų specifinių IgE antikūnų.
6. *Candida pelliculosa* ir namų dulkių erkių *Dermatophagoides pteronyssinus* ir *Dermatophagoides farinae* alergenai gali turėti panašius epitopus.

MOKSLINIŲ STRAIPSNIŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. **Zinkevičienė A.**, Vaičiulionienė N., Baranauskienė I., Kvedarienė V., Ėmužytė R., Čitavičius D. Cutaneous yeast microflora in patients with atopic dermatitis, *Cent. Eur. J. Med.* 2011; 6, 713-719.
2. **Zinkevičienė A.**, Norkūnas V., Čitavičius D. Atypical non-lipid-dependent strains of *Malassezia furfur*, *Cent. Eur. J. Biol.* 2012; 7, 241-249.
3. **Zinkevičienė A.**, Girkontaitė I., Čitavičius D. Specific immunoglobulin E antibodies to saprophytic yeasts in sera of atopic patients allergic to house dust mites, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – numatoma publikuoti šių metų 6 numeryje.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. Donaldui Čitavičiui, nepailstančiam mokslininkui, kuris suteikė galimybę vykdyti mokslinius tyrimus ir laisvę įgyvendinti idėjas.

Taip pat dėkoju dr. Irutei Girkontaitei už vertingas pastabas, reiklumą ir nuolatinį padaršinimą nepavykus dar vienam eksperimentui.

Norėčiau padėkoti visiems Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros darbuotojams ir studentams už palaikymą, naudingus patarimus ir diskusijas.

Dėkoju UAB „Alerginių susirgimų diagnostikos ir gydymo centras“ kolektyvui už kantriai rinktus mikrobiologinius pasėlius ir nuolatinę paramą.

Ypatingai dėkoju savo šeimai už tikėjimą manimi, kantrybę ir paskatinimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aalberse R.C. (2007) Assessment of allergen cross-reactivity. *Clin. Mol. Allergy*, 5,2.
2. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. (2001) Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas, Šviesa.
3. Ahearn D.G., Simmons R.B. (1998) *Malassezia Baillon. The Yeasts. A Taxonomic Study*. Amsterdam, Elsevier Science Publishing.
4. Akaza N., Akamatsu H., Sasaki Y., Takeoka S., Kishi M., Mizutani H., Sano A., Hirokawa K., Nakata S., Matsunaga K. (2010a) Cutaneous *Malassezia* microbiota in atopic dermatitis patients differ by gender and body part. *Dermatology*, 221, 253-260.
5. Akaza N., Akamatsu H., Sasaki Y., Takeoka S., Kishi M., Mizutani H., Sano A., Hirokawa K., Nakata S., Matsunaga K. (2010b) Cutaneous *Malassezia* microbiota of healthy subjects differ by sex, body part and season. *J. Dermatol.*, 37, 786-792.
6. Akdis C.A., Akdis M., Bieber T., Bindslev-Jensen C., Boguniewicz M., Eigenmann P., Hamid Q., Kapp A., Leung D.Y., Lipozencic J., Luger T.A., Muraro A., Novak N., Platts-Mills T.A., Rosenwasser L., Scheynius A., Simons F.E., Spergel J., Turjanmaa K., Wahn U., Weidinger S., Werfel T., Zuberbier T. (2006) Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy*, 61, 969-987.
7. Alfvén T., Braun-Fahrlander C., Brunekreef B., von Mutius E., Riedler J., Scheynius A., van Hage M., Wickman M., Benz M.R., Budde J., Michels K.B., Schram D., Ublagger E., Waser M., Pershagen G. (2006) Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle – the PARSIFAL study. *Allergy*, 61, 414-421.
8. Andersson A., Rassol O., Schmidt M., Kodzius R., Fluckiger S., Zargari A., Cramer R., Scheynius A. (2004) Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 271, 1885-1894.
9. Andrasfalvy M., Peterfy H., Toth G., Matko J., Abramson J., Kerekes K., Vamosi G., Pecht I., Erdei A. (2005) The beta subunit of the type I Fcε receptor is a target for peptides inhibiting IgE-mediated secretory response of mast cells. *J. Immunol.*, 175, 2801-2806.
10. Asako Y., Saito A., Yasueda H., Kawaguchi H., Akiyama K., Endo M., Onishi Y., Takesako K. (2002) Analysis of IgE reactivities of purified allergens from *Candida albicans* and *Malassezia furfur* among patients with atopic dermatitis. *Arerugi*, 51, 615-621.
11. Ashbee H.R., Evans E.G. (2002) Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 21-57.

12. Asher M.I., Montefort S., Bjorksten B., Lai C.K., Strachan D.P., Weiland S.K., Williams H. (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368, 733-743.
13. Aspiroz C., Ara M., Varea M., Rezusta A., Rubio C. (2002) Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia*, 154, 111-117.
14. Baker B.S. (2006) The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 144, 1-9.
15. Barnett J.A., Yarrow D. (2000). *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge, University Press.
16. Batlles Garrido J., Torres-Borrego J., Bonillo Perales A., Rubi Ruiz T., Gonzalez Jimenez Y., Momblan De Cabo J., Aguirre Rodriguez J., Jimenez Liria R., Losilla Maldonado A., Daza Torres M. (2010) Prevalence and factors linked to atopic eczema in 10- and 11-year-old schoolchildren. Isaac 2 in Almeria, Spain. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 38, 174-180.
17. Batra R., Boekhout T., Gueho E., Cabanes F.J., Dawson T.L., Gupta A.K. (2005) *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.*, 5, 1101-1113.
18. Benham R.W. (1939) The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* – a lipophilic fungus. *J. Investig. Dermatol.*, 2, 187-203.
19. Bieber T. (2008) Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, 358, 1483-1494.
20. Bieber T. (2010) Atopic dermatitis. *Ann. Dermatol.*, 22, 125-137.
21. Boekhout T., Gueho-Kellermann E., Mayser P., Velegraki A. (2010) *Malassezia* and the skin. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg.
22. Boekhout T., Kamp M., Gueho E. (1998) Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.*, 36, 365-372.
23. Bond R., Anthony R.M. (1995) Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 537-542.
24. Bowyer P., Fraczek M., Denning D.W. (2006) Comparative genomics of fungal allergens and epitopes shows widespread distribution of closely related allergen and epitope orthologues. *BMC Genomics*, 7, 251.
25. Bradley M., Soderhall C., Luthman H., Wahlgren C.F., Kockum I., Nordenskjold M. (2002) Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 1539-1548.
26. Brand A. (2012) Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int. J. Microbiol.*, 2012, 517529.
27. Brunke S., Hube B. (2006) MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology*, 152, 547-554.
28. Bunikowski R., Mielke M., Skarabis H., Herz U., Bergmann R.L., Wahn U., Renz H. (1999) Prevalence and role of serum IgE antibodies to the

- Staphylococcus aureus*-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103, 119-124.
29. Bunikowski R., Mielke M., Skarabis H., Worm M., Anagnostopoulos I., Kolde G., Wahn U., Renz H. (2000) Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105, 814-819.
 30. Butler G. (2010) Fungal sex and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23, 140-159.
 31. Cabanes F.J., Hernandez J.J., Castella G. (2005) Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 277-283.
 32. Cabanes F.J., Theelen B., Castella G., Boekhout T. (2007) Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.*, 7, 1064-1076.
 33. Cabanes F.J., Vega S., Castella G. (2011) *Malassezia cuniculi sp.nov.*, a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.*, 49, 40-48.
 34. Cafarchia C., Gasser R.B., Figueredo L.A., Latrofa M.S., Otranto D. (2011a) Advances in the identification of *Malassezia*. *Mol. Cell. Probes*, 25, 1-7.
 35. Cafarchia C., Latrofa M.S., Figueredo L.A., da Silva Machado M.L., Ferreiro L., Guillot J., Boekhout T., Otranto D. (2011b) Physiological and molecular characterization of atypical lipid-dependent *Malassezia* yeasts from a dog with skin lesions: adaptation to a new host? *Med. Mycol.*, 49, 365-374.
 36. Cafarchia C., Otranto D. (2004) Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 4868-4869.
 37. Cafarchia C., Latrofa M., Testini G., Parisi A., Guillot J., Gasser R.B., Otranto D. (2007) Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. *Mol. Cell. Probes*, 21, 229-238.
 38. Capristo C., Romei I., Boner A.L. (2004) Environmental prevention in atopic eczema dermatitis syndrome (AEDS) and asthma: avoidance of indoor allergens. *Allergy*, 59, Suppl. 78, 53-60.
 39. Casagrande B.F., Fluckiger S., Linder M.T., Johansson C., Scheynius A., Cramer R., Schmid-Grendelmeier P. (2006) Sensitization to the yeast *Malassezia sympodialis* is specific for extrinsic and intrinsic atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 2414-2421.
 40. Castella G., Hernandez J.J., Cabanes F.J. (2005) Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet. Microbiol.*, 108, 291-296.
 41. Chang C.Y., Chou H., Tam M.F., Tang R.B., Lai H.Y., Shen H.D. (2002) Characterization of enolase allergen from *Rhodotorula mucilaginosa*. *J. Biomed. Sci.*, 9, 645-655.
 42. Chou H., Tam M.F., Chang C.Y., Lai H.Y., Huang M.H., Chou C.T., Lee S.S., Shen H.D. (2003) Characterization of the novel *Candida albicans* 29

- kDa IgE-binding protein – purification, cDNA isolation and heterologous expression of Cand a 3. *Allergy*, 58, 1157-1164.
43. Chou H., Tam M.F., Lee S.S., Tai H.Y., Chang C.Y., Chou C.T., Shen H.D. (2005) A vacuolar serine protease (Rho m 2) is a major allergen of *Rhodotorula mucilaginosa* and belongs to a class of highly conserved pan-fungal allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 138, 134-141.
 44. Clemmensen O.J., Hjorth N. (1983) Treatment of dermatitis of the head and neck with ketoconazole in patients with type I sensitivity to *Pityrosporum orbiculare*. *Semin. Dermatol.*, 2, 26-29.
 45. Cookson W.O., Ubhi B., Lawrence R., Abecasis G.R., Walley A.J., Cox H.E., Coleman R., Leaves N.I., Trembath R.C., Moffatt M.F., Harper J.I. (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat. Genet.*, 27, 372-373.
 46. Cramer R. (2011a) Immunoglobulin E-binding autoantigens: biochemical characterization and clinical relevance. *Clin. Exp. Allergy*,
 47. Cramer R. (2011b) The problem of cross-reactivity in the diagnosis of fungal allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 41, 302-304.
 48. Cramer R., Faith A., Hemmann S., Jaussi R., Ismail C., Menz G., Blaser K. (1996) Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.*, 184, 265-270.
 49. Crespo M.J., Abarca M.L., Cabanes F.J. (2000) Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2383-2385.
 50. Crespo M.J., Abarca M.L., Cabanes F.J. (2002) Occurrence of *Malassezia spp.* in horses and domestic ruminants. *Mycoses*, 45, 333-337.
 51. Cunningham A.C., Ingham E., Gowland G. (1992) Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. *Br. J. Dermatol.*, 127, 476-481.
 52. Darabi K., Hostetler S.G., Bechtel M.A., Zirwas M. (2009) The role of *Malassezia* in atopic dermatitis affecting the head and neck of adults. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 60, 125-136.
 53. de Bellis F., Castella G., Cabanes F.J., Bond R. (2010) Absence of DNA sequence diversity of the intergenic spacer I region in *Malassezia nana* isolates from cats. *Med. Mycol.*, 48, 427-429.
 54. DeAngelis Y.M., Gemmer C.M., Kaczvinsky J.R., Kenneally D.C., Schwartz J.R., Dawson T.L.Jr. (2005) Three etiologic facets of dandruff and seborrheic dermatitis: *Malassezia* fungi, sebaceous lipids, and individual sensitivity. *Dermatol. Symp. Proc.*, 10, 295-297.
 55. DeAngelis Y.M., Saunders C.W., Johnstone K.R., Reeder N.L., Coleman C.G., Kaczvinsky J.R., Gale C., Walter R., Mekel M., Lacey M.P., Keough T.W., Fieno A., Grant R.A., Begley B., Sun Y., Fuentes G., Youngquist R.S., Xu J., Dawson T.L.Jr. (2007) Isolation and expression of a *Malassezia globosa* lipase gene, LIP1. *J. Invest. Dermatol.*, 127, 2138-2146.
 56. Dorn M., Roehnert K. (1977) Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol.*, 69, 244-248.

57. Duarte E.R., Hamdan J.S. (2010) RAPD differentiation of *Malassezia spp.* from cattle, dogs and humans. *Mycoses*, 53, 48-56.
58. Duarte E.R., Lachance M.A., Hamdan J.S. (2002) Identification of atypical strains of *Malassezia spp.* from cattle and dog. *Can. J. Microbiol.*, 48, 749-752.
59. Dubakienė R. (2002) *Alergologija*. Vilnius, Žiburys.
60. Dutta S., Bajaj A.K., Basu S., Dikshit A. (2002) Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycologic study in India. *Int. J. Dermatol.*, 41, 823-824.
61. Eichstedt E. (1846) Pilzbildung in der *Pityriasis versicolor*. *Frorip Neue Notizen aus dem Gebeite der Naturkunde Heilkinde*, 39, 270.
62. Elias P.M., Steinhoff M. (2008) „Outside-to-inside“ (and now back to „outside“) pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 128, 1067-1070.
63. Faergemann J. (2002) Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 545-563.
64. Faergemann J., Bernander S. (1979) Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: a mycological investigation. *Sabouraudia*, 17, 171-179.
65. Faergemann J., Bernander S. (1981) Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouraudia*, 19, 117-121.
66. Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell-Tallman A. (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1351-1371.
67. Floistrup H., Swartz J., Bergstrom A., Alm J.S., Scheynius A., van Hage M., Waser M., Braun-Fahrlander C., Schram-Bijkerk D., Huber M., Zutavern A., von Mutius E., Ublagger E., Riedler J., Michaels K.B., Pershagen G. (2006) Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 59-66.
68. Fluckiger S., Mittl P.R., Scapozza L., Fijten H., Folkers G., Grutter M.G., Blaser K., Cramer R. (2002a) Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *J. Immunol.*, 168, 1267-1272.
69. Fluckiger S., Scapozza L., Mayer C., Blaser K., Folkers G., Cramer R. (2002b) Immunological and structural analysis of IgE-mediated cross-reactivity between manganese superoxide dismutases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 128, 292-303.
70. Frealle E., Noel C., Viscogliosi E., Camus D., Dei-Cas E., Delhaes L. (2005) Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 45, 411-422.
71. Gaitanis G., Bassukas I.D., Velegraki A. (2009) The range of molecular methods for typing *Malassezia*. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 22, 119-125.
72. Gandra R.F., Gambale W., de Cassia Garcia Simao R., da Silva B.C., Ruiz L.S., Durigon E.L., de Camargo L.M., Giudice M.C., Sanfilippo L.F., de Araujo J., Paula C.R. (2008) *Malassezia spp.* in acoustic meatus

- of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. *Mycopathologia*, 165, 21-26.
73. Gandra R.F., Simao R.C., Matsumoto F.E. de Silva B.C., Ruiz L.S., da Silva E.G., Gambale W., Paula C.R. (2006) Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients. *Mycopathologia*, 162, 273-280.
 74. Gao Z., Perez-Perez G.I., Chen Y., Blaser M.J. (2010) Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 3575-3581.
 75. Gemmer C.M., DeAngelis Y.M., Theelen B., Boekhout T., Dawson Jr.T.L. (2002) Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3350-3357.
 76. Golubev W. (1998) Mycocins (Killer toxins). In *The yeast, a taxonomic study* 4th edn. Edited by C.P. Kurtzman, Fell J.W. Amsterdam, Elsevier Science Publishing.
 77. Gonzalez A., Sierra R., Cardenas M.E., Grajales A., Restrepo S., Cepero de Garcia M.C., Celis A. (2009) Physiological and molecular characterization of atypical isolates of *Malassezia furfur*. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 48-53.
 78. Gueho E., Batra R., Boekhout T. (2010) The genus *Malassezia* Baillon. In *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. Edited by C.P. Kurtzman, Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam, Elsevier Science Publishing.
 79. Gueho E., Midgley G., Guillot J. (1996) The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, 337-355.
 80. Guillot J., Deville M., Berthelemy M., Provost F., Gueho E. (2000) A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 400-403.
 81. Guillot J., Gueho E., Chevrier G., Chermette R. (1997) Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res. Vet. Sci.*, 62, 22-25.
 82. Guillot J., Gueho E., Lesourd M., Midgley G., Chevrier G., Dupont B. (1996) Identification of *Malassezia* species, a practical approach. *J. Mycol. Med.*, 6, 103-110.
 83. Gupta A.K., Batra R., Bluhm R., Boekhout T., Dawson T.L.Jr. (2004a) Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 51, 785-798.
 84. Gupta A.K., Boekhout T., Theelen B., Summerbell R.C., Batra R. (2004b) Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analysis of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 4253-4260.
 85. Gupta A.K., Kohli Y., Summerbell R.C. (2000) Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1869-1875.

86. Haagerup A., Bjerke T., Schiøtz P.O., Dahl R., Binderup H.G., Tan Q., Kruse T.A. (2004) Atopic dermatitis – a total genome-scan for susceptibility genes. *Acta Derm. Venereol.*, 84, 346-352.
87. Hamamoto M., Nagahama T., Tamura M. (2002) Systematic study of basidiomycetous yeasts – evaluation of the ITS regions of rDNA to delimit species of the genus *Rhodosporidium*. *FEMS Yeast Res.*, 2, 409-413.
88. Hemmann S., Blaser K., Cramer R. (1997) Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156, 1956-1962.
89. Hirai A., Kano R., Makimura K., Duarte E.R., Hamdan J.S., Lachance M.A., Yamaguchi H., Hasegawa A. (2004) *Malassezia nana sp.nov.*, a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 623-627.
90. Howell M.D. (2007) The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 7, 413-417.
91. Howell M.D., Kim B.E., Gao P., Grant A.V., Boguniewicz M., DeBenedetto A., Schneider L., Beck L.A., Barnes K.C., Leung D.Y. (2007) Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120, 150-155.
92. Howell M.D., Wollenberg A., Gallo R.L., Flaig M., Streib J.E., Wong C., Pavicic T., Boguniewicz M., Leung D.Y. (2006) Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 836-841.
93. Hwang C.Y., Chen Y.J., Lin M.W., Chen T.J., Chu S.Y., Chen C.C., Lee D.D., Chang Y.T., Wang W.J., Liu H.N. (2010) Prevalence of atopic dermatitis, allergic rhinitis and asthma in Taiwan: a national study 2000 to 2007. *Acta Derm. Venereol.*, 90, 589-594.
94. Illi S., von Mutius E., Lau S., Nickel R., Gruber C., Niggemann B., Wahn U. (2004) The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 925-931.
95. Ishibashi Y., Sugita T., Nishikawa A. (2006) Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48, 400-409.
96. Ishiguro A., Homma M., Torii S., Tanaka K. (1992) Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. *Infect. Immun.*, 60, 1550-1557.
97. Yamaguchi N., Sugita R., Miki A., Takemura N., Kawabata J., Watanabe J., Sonoyama K. (2006) Gastrointestinal *Candida* colonisation promotes sensitization against food antigens by affecting the mucosal barrier in mice. *Gut.*, 55, 954-960.
98. Yasueda H., Hashida-Okado T., Saito A., Uchida K., Kuroda M., Onishi Y., Takahashi K., Yamaguchi H., Takesako K., Akiyama K. (1998) Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 240-244.

99. Yim S.M., Kim J.Y., Ko J.H., Lee Y.W., Choe Y.B., Ahn K.J. (2010) Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of the patients with atopic dermatitis. *Ann. Dermatol.*, 22, 41-47.
100. Johansson S.G., Bieber T., Dahl R., Friedmann P.S., Lanier B.Q., Lockey R.F., Motala C., Ortega Martell J.A., Platts-Mills T.A., Ring J., Thien F., Van Cauwenberge P., Williams H.C. (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 832-836.
101. Kaga M., Sugita T., Nishikawa A., Wada Y., Hiruma M., Ikeda S. (2009) Molecular analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota from the skin of patients with atopic dermatitis of different severities. *Mycoses*, 54, 24-28.
102. Kanbe T., Utsunomiya K., Ishiguro A. (1997) A crossreactivity at the immunoglobulin E level of the cell wall mannoproteins of *Candida albicans* with other pathogenic *Candida* and airborne yeast species. *Clin. Exp. Allergy*, 27, 1449-1457.
103. Kaneko T., Makimura K., Abe M., Shiota R., Nakamura Y., Kano R., Hasegawa A., Sugita T., Shibuya S., Watanabe S., Yamaguchi H., Abe S., Okamura N. (2007) Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3737-3742.
104. Kaneko T., Makimura K., Onozaki M., Ueda K., Yamada Y., Nishiyama Y., Yamaguchi H. (2005) Vital growth factors of *Malassezia* species on modified CHROMagar *Candida*. *Med. Mycol.*, 43, 699-704.
105. Kano R., Aizawa T., Nakamura Y., Watanabe S., Hasegawa A. (1999) Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. *Microbiol. Immunol.*, 43, 813-815.
106. Kato H., Sugita T., Ishibashi Y., Nishikawa A. (2007) Evaluation of the levels of specific IgE against *Cryptococcus diffluens* and *Cryptococcus liquefaciens* in patients with atopic dermatitis. *Microbiol. Immunol.*, 51, 945-950.
107. Khosravi A.R., Bandghorai A.N., Moazzeni M., Shokri H., Mansouri P., Mahmoudi M. (2008) Evaluation of *Candida albicans* allergens reactive with specific IgE in asthma and atopic eczema patients. *Mycoses*.
108. Khosravi A.R., Eidi S., Katirae F., Ziglari T., Bayat M., Nissiani M. (2009) Identification of different *Malassezia* species isolated from patients with *Malassezia* infections. *World J. Zoology*, 4, 85-89.
109. Kitagaki H., Fujisawa S., Watanabe K., Hayakawa K., Shiohara T. (1995) Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J. Invest. Dermatol.*, 105, 749-755.
110. Kosonen J., Lintu P., Kortekangas-Savolainen O., Kalimo K., Terho E.O., Savolainen J. (2005) Immediate hypersensitivity to *Malassezia furfur* and *Candida albicans* mannans *in vivo* and *in vitro*. *Allergy*, 60, 238-242.
111. Lan C.Y., Newport G., Murillo L.A., Jones T., Scherer S., Davis R.W., Agabian N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic

- switching in *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 14907-14912.
112. Laouini D., Kawamoto S., Yalcindag A., Bryce P., Mizoguchi E., Oettgen H., Geha R.S. (2003) Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. J. Allergy Clin. Immunol., 112, 981-987.
 113. Lee Y.A., Wahn U., Kehrt R., Tarani L., Businco L., Gustafsson D., Andersson F., Oranje A.P., Wolkertstorfer A., Berg A., Hoffmann U., Kuster W., Wienker T., Ruschendorf F., Reis A. (2000) A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. Nat. Genet., 26, 470-473.
 114. Leeming J.P., Notman F.H. (1987) Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. J. Clin. Microbiol., 25, 2017-2019.
 115. Limacher A., Glaser A.G., Meier C., Schmid-Grendelmeier P., Zeller S., Scapozza L., Cramer R. (2007) Cross-reactivity and 1.4-Å crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family. J. Immunol., 178, 389-396.
 116. Lin Y.T., Wang C.T., Chiang B.L. (2007) Role of bacterial pathogens in atopic dermatitis. Clin. Rev. Allergy Immunol., 33, 167-177.
 117. Lin S., Cicala C., Scharenberg A.M., Kinet J.P. (1996) The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. Cell, 85, 985-995.
 118. Lindborg M., Magnusson C.G., Zargari A., Schmidt M., Scheynius A., Cramer R., Whitley P. (1999) Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display technology. J. Invest. Dermatol., 113, 156-161.
 119. Lugauskas A., Paškevičius A., Repečkienė J. (2002) Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. Vilnius: Aldorija.
 120. Madison K.C. (2003) Barrier function of the skin: „la raison d’etre“ of the epidermis. J. Invest. Dermatol., 121, 231-241.
 121. Mayser P., Haze P., Papavassilis C., Pickel M., Gruender K., Gueho E. (1997) Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. Br. J. Dermatol., 137, 208-213.
 122. Mayser P., Imkampe A., Winkeler M., Papavassilis C. (1998a) Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. Arch. Dermatol. Res., 290, 277-282.
 123. Mayser P., Tows A., Kramer H.J., Weiß R. (2004) Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. Mycoses, 47, 34-39.
 124. Mayser P., Wille G., Imkampe A., Thoma W., Arnold N., Monsees T. (1998b) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. Mycoses, 41, 265-271.
 125. Makimura K., Tamura Y., Kudo M., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H. (2000) Species identification and strain typing of *Malassezia* species

- stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol.*, 49, 29-35.
126. Marenholz I., Nickel R., Ruschendorf F., Schulz F., Esparza-Gordillo J., Kerscher T., Gruber C., Lau S., Worm M., Keil T., Kurek M., Zaluga E., Wahn U., Lee Y.A. (2006) Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 118, 866-871.
 127. Mari A. (2001) Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 125, 57-65.
 128. Mari A., Schneider P., Wally V., Breitenbach M., Simon-Nobbe B. (2003) Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin. Exp. Allergy*, 33, 1429-1438.
 129. Midgley G. (1989) The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts *in vivo* and *in vitro*. *Mycopathologia*, 106, 143-153.
 130. Midgley G. (2000) The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Med. Mycol.*, 38, 9-16.
 131. Midreuil F., Guillot J., Gueho E., Renaud F., Mallie M., Bastide J.M. (1999) Genetic diversity in the yeast species *Malassezia pachydermatis* analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1287-1294.
 132. Misery L. (2010) Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 41, 259-266.
 133. Mittag H. (1994) Fine structural investigation of *Malassezia furfur*: I. Size and shape of the yeast cells and a consideration of their ploidy. *Mycooses*, 37, 393-399.
 134. Morris D.O. (2005) *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 83-88.
 135. Nakabayashi A., Sei Y., Guillot J. (2000) Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med. Mycol.*, 38, 337-341.
 136. Neofytos D., Horn D., De Simone J.A.Jr. (2007) *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patients with sickle cell disease: case presentation and literature review. *South. Med. J.*, 100, 198-200.
 137. Nograles K.E., Zaba L.C., Shemer A., Fuentes-Duculan J., Cardinale I., Kikuchi T., Ramon M., Bergman R., Krueger J.G., Guttman-Yassky E. (2009) IL-22-producing „T22“ T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 123, 1244-1252.
 138. Nomura T., Sandilands A., Akiyama M., Liao H., Evans A.T., Sakai K., Ota M., Sugiura H., Yamamoto K., Sato H., Palmer C.N., Smith F.J., McLean W.H., Shimizu H. (2007) Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119, 434-440.

139. Novak N., Bieber T. (2003) Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112, 252-262.
140. Novak N., Bieber T., Leung D.Y. (2003) Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112, 128-139.
141. Oh B.H., Song Y.C., Lee Y.W., Choe Y.B., Ahn K.J. (2009) Comparison of nested PCR and RFLP for identification and classification of *Malassezia* yeasts from healthy human skin. *Ann. Dermatol.*, 21, 352-357.
142. Okada H., Kuhn C., Feillet H., Bach J.F. (2010) The „hygiene hypothesis“ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.*, 160, 1-9.
143. Ong P.Y., Ferdman R.M., Church J.A. (2010) Late-onset of IgE sensitization to microbial allergens in young children with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, 162, 159-161.
144. Onishi Y., Kuroda M., Yasueda H., Saito A., Sono-Koyama E., Tunasawa S., Hashida-Okado T., Yagihara T., Uchida K., Yamaguchi H., Akiyama K., Kato I., Takesako K. (1999) Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 261, 148-154.
145. Palmer C.N., Irvine A.D., Terron-Kwiatkowski A., Zhao Y., Liao H., Lee S.P., Goudie D.R., Sandilands A., Campbell L.E., Smith F.J., O'Regan G.M., Watson R.M., Cecil J.E., Bale S.J., Compton J.G., DiGiovanna J.J., Fleckman P., Lewis-Jones S., Arseculeratne G., Sergeant A., Munro C.S., El Houate B., McElreavey K., Halkjaer L.B., Bisgaard H., Mukhopadhyay S., McLean W.H. (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, 38, 441-446.
146. Panja G. (1927) The *Malassezia* of the skin, their cultivation, morphology and species. *Trans. 7th Congr. Far East. Assoc. Trop. Med.*, 338, 853-860.
147. Patino-Uzcategui A., Amado Y., Cerepo de Garcia M., Chaves D., Tabima J., Motta A., Cardenas M., Bernal A., Restrepo S., Celis A. (2011) Virulence gene expression in *Malassezia spp.* from individuals with seborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 131, 2134-2136.
148. Paulino L.C., Tseng C.H., Strober B.E., Blaser M.J. (2006) Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 2933-2941.
149. Pffaler M.A., Diekema D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol Rev.*, 20, 133-163.
150. Pini G., Faggi E. (2011) Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. *Rev. Iberoam. Micol.*, 28, 179-182.
151. Platts-Mills T.A., Woodfolk J.A. (2011) Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol. Rev.*, 242, 51-68.

152. Porro M.N., Passi S., Caprilli F., Mercantini R. (1977) Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Dermatol.*, 69, 531-534.
153. Purvis D.J., Thompson J.M., Clark P.M., Robinson E., Black P.N., Wild C.J., Mitchell E.A. (2005) Risk factors for atopic dermatitis in New Zealand children at 3.5 years of age. *Br. J. Dermatol.*, 152, 742-749.
154. Raap U., Goltz C., Deneka N., Bruder M., Renz H., Kapp A., Wedi B. (2005) Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 1268-1275.
155. Ramadan S., Sortino M., Bulacio L., Marozzi M.L., Lopez C., Ramos L. (2012) Prevalence of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Rosario, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.*, 29, 14-19.
156. Rasool O., Zargari A., Almqvist J., Eshaghi H., Whitley P., Scheynius A. (2000) Cloning, Characterization and expression of complete coding sequences of three IgE binding *Malassezia furfur* allergens, Mal f 7, Mal f 8 and Mal f 9. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4355-4361.
157. Riedl M., Diaz-Sanchez D. (2005) Biology of diesel exhaust effects on respiratory functions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 221-228.
158. Rincon S., Celis A., Sopo L., Motta A., Cepero de Garcia M.C. (2005) *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatological lesions. *Biomedica*, 25, 189-195.
159. Ring J., Abeck D., Neuber K. (1992) Atopic eczema: role of microorganisms on the skin surface. *Allergy*, 47, 265-269.
160. Rippke F., Schreiner V., Doering T., Maibach H.I. (2004) Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 5, 217-223.
161. Saghazadeh M., Farshi S., Hashemi J., Mansouri P., Khosravi A.R. (2010) Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, and normal subjects. *J. Mycol. Med.*, 20, 279-282.
162. Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
163. Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
164. Sampson H.A. (2004) Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 805-819.
165. Sandilands A., Terron-Kwiatkowski A., Hull P.R., O'Regan G.M., Clayton T.H., Watson R.M., Carrick T., Evans A.T., Liao H., Zhao Y., Campbell L.E., Schmuth M., Gruber R., Janecke A.R., Elias P.M., van Steensel M.A., Nagtzaam I., van Geel M., Steijlen P.M., Munro C.S., Bradley D.G., Palmer C.N., Smith F.J., McLean W.H., Irvine A.D. (2007) Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat. Genet.*, 39, 650-654.

166. Sator P.G., Schmidt J.B., Honigsmann H. (2003) Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 48, 352-358.
167. Savolainen J., Koivikko A., Kalimo K., Nieminen E., Viander M. (1990) IgE, IgA and IgG antibodies and delayed skin response towards *Candida albicans* antigens in atopics with and without saprophytic growth. *Clin. Exp. Allergy*, 20, 549-554.
168. Savolainen J., Kortekangas-Savolainen O., Nermes M., Viander M., Koivikko A., Kalimo K., Terho E.O. (1998) IgE, IgA, and IgG responses to common yeasts in atopic patients. *Allergy*, 53, 506-512.
169. Savolainen J., Lintu P., Kosonen J., Kortekangas-Savolainen O., Viander M., Pene J., Kalimo K., Terho E.O., Bousquet J. (2001) *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clin. Exp. Allergy*, 31, 125-134.
170. Scalabrin D.M., Bavbek S., Perzanowski M.S., Wilson B.B., Platts-Mills T.A., Wheatley L.M. (1999) Use of specific IgE in assessing the relevance of fungal and dust mite allergens to atopic dermatitis: a comparison with asthmatic and nonasthmatic control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104, 1273-1279.
171. Schafer T., Heinrich J., Wjst M., Adam H., Ring J., Wichmann H.E. (1999) Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104, 1280-1284.
172. Scheynius A., Johansson C., Buentke E., Zargari A., Linder M.T. (2002) Atopic eczema/dermatitis syndrome and *Malassezia*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 127, 161-169.
173. Schmid-Grendelmeier P., Fluckiger S., Disch R., Trautmann A., Wuthrich B., Blaser K., Scheynius A., Cramer R. (2005) IgE-mediated and T cell-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 1068-1075.
174. Schmid-Ott G., Jaeger B., Adamek C., Koch H., Lamprecht F., Kapp A., Werfel T. (2001) Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 107, 171-177.
175. Schmidt M., Zargari A., Holt P., Lindbom L., Hellman U., Whitley P., van der Ploeg I., Harfast B., Scheynius A. (1997) The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur. J. Biochem.*, 246, 181-185.
176. Schultz Larsen F.V., Holm N.V. (1985) Atopic dermatitis in a population based twin series. Concordance rates and heritability estimation. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)*, 114, 159.
177. Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Statzell-Tallman A. (2002) Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.*, 2, 495-517.

178. Seidenari S., Giusti G. (1995) Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm. Venereol.*, 75, 429-433.
179. Selander C., Zargari A., Mollby R., Rasool O., Scheynius A. (2006) Higher pH level, corresponding to that on the skin of patients with atopic eczema, stimulates the release of *Malassezia sympodialis* allergens. *Allergy*, 61, 1002-1008.
180. Shen H.D., Choo K.B., Lee H.H., Hsieh J.C., Lin W.L., Lee W.R., Han S.H. (1991) The 40-kilodalton allergen of *Candida albicans* is an alcohol dehydrogenase: molecular cloning and immunological analysis using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy*, 21, 675-681.
181. Sidenius K.E., Hallas T.E., Poulsen L.K., Mosbech H. (2001) Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. *Allergy*, 56, 723-733.
182. Simon-Nobbe B., Denk U., Poll V., Rid R., Breitenbach M. (2008) The spectrum of fungal allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 145, 58-86.
183. Simpson C.R., Newton J., Hippisley-Cox J., Sheikh A. (2009) Trends in the epidemiology and prescribing of medication for eczema in England. *J. R. Soc. Med.*, 102, 108-117.
184. Singh B.P., Sinha S., Arora N. (2008) Cross reactive allergens: status and their clinical implications. *Indian J. Allergy Asthma Immunol.*, 22, 105-118.
185. Spergel J.M. (2010) From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 105, 99-106.
186. Staib P., Kretschmar M., Nichterlein T., Kohler G., Michel S., Hof H., Hacker J., Morschhauser J. (1999) Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol. Microbiol.*, 32, 533-546.
187. Staib P., Wirsching S., Strauss A., Morschhauser J. (2001) Gene regulation and host adaptation mechanisms in *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 183-188.
188. Strachan D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj.*, 299, 1259-1260.
189. Sugita T., Kodama M., Saito M., Ito T., Kato Y., Tsuboi R., Nishikawa A. (2003a) Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3022-3027.
190. Sugita T., Nishikawa A., Ikeda R., Shinoda T. (1999) Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1985-1993.
191. Sugita T., Saito M., Ito T., Kato Y., Tsuboi R., Takeuchi S., Nishikawa A. (2003b) The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. *Microbiol. Immunol.*, 47, 945-950.

192. Sugita T., Suzuki M., Goto S., Nishikawa A., Hiruma M., Yamazaki T., Makimura K. (2010) Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med. Mycol.*, 48, 229-233.
193. Sugita T., Tajima M., Takashima M., Amaya M., Saito M., Tsuboi R., Nishikawa A. (2004) A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.*, 48, 579-583.
194. Sugita T., Tajima M., Tsuboku H., Tsuboi R., Nishikawa A. (2006) Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol. Immunol.*, 50, 549-552.
195. Sugita T., Takashima M., Kodama M., Tsuboi R., Nishikawa A. (2003c) Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 4695-4699.
196. Sugita T., Takashima M., Shinoda T., Suto H., Unno T., Tsuboi R., Ogawa H., Nishikawa A. (2002) New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1363-1367.
197. Sundberg E.J., Li H., Llera A.S., McCormick J.K., Tormo J., Schlievert P.M., Karjalainen K., Mariuzza R.A. (2002) Structures of two streptococcal superantigens bound to TCR beta chains reveal diversity in the architecture of T cell signaling complexes. *Structure*, 10, 687-699.
198. Svejgaard E., Larsen P.O., Deleuran M., Ternowitz T., Roed-Petersen J., Nilsson J. (2004) Treatment of head and neck dermatitis comparing itraconazole 200 mg and 400 mg daily for 1 week with placebo. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 18, 445-449.
199. Tajima M., Sugita T., Nishikawa A., Tsuboi R. (2008) Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J. Invest. Dermatol.*, 128, 345-351.
200. Takahata Y., Sugita T., Kato H., Nishikawa A., Hiruma M., Muto M. (2007) Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br. J. Dermatol.*, 157, 1178-1182.
201. Takai T., Kato T., Yasueda H., Okumura K., Ogawa H. (2005) Analysis of the structure and allergenicity of recombinant pro- and mature Der p 1 and Der f 1: major conformational IgE epitopes blocked by prodomains. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 555-563.
202. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599.
203. Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11030-11035.

204. Tanaka R., Nishimura K., Kamei K., Murayama S.Y. (2001) Assimilation test of *Malassezia furfur* isolated from the environment. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 42, 123-126.
205. Theelen B., Silvestri M., Gueho E., van Belkum A., Boekhout T. (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.*, 1, 79-86.
206. Thomas D.S., Ingham E., Bojar R.A., Holland K.T. (2008) *In vitro* modulation of human keratinocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production by the capsule of *Malassezia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 54, 203-214.
207. Thomas W.R., Smith W.A., Hales B.J. (2004) The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med. J.*, 27, 563-569.
208. Valenta R., Mittermann I., Werfel T., Garn H., Renz H. (2009) Linking allergy to autoimmune disease. *Trends Immunol.*, 30, 109-116.
209. Van Abbe N.J. (1964) The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosmetic Chem.*, 52, 173-188.
210. Vilhelmsson M., Glaser A.G., Martinez D.B., Schmidt M., Johansson C., Rhyner C., Berndt K.D., Scheynius A., Cramer R., Achour A., Zargari A. (2008) Mutational analysis of amino acid residues involved in IgE-binding to the *Malassezia sympodialis* allergen Mala s 11. *Mol. Immunol.*, 46, 294-303.
211. Watanabe S., Kano R., Sato H., Nakamura Y., Hasegawa A. (2001) The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 116, 769-773.
212. Weidinger S., Illig T., Baurecht H., Irvine A.D., Rodriguez E., Diaz-Lacava A., Klopp N., Wagenpfeil S., Zhao Y., Liao H., Lee S.P., Palmer C.N., Jenneck C., Maintz L., Hagemann T., Behrendt H., Ring J., Nothen M.M., McLean W.H., Novak N. (2006) Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 118, 214-219.
213. Werfel T., Breuer K. (2004) Role of food allergy in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 4, 379-385.
214. Wilde P.F., Stewart P.S. (1968) A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. *Biochem. J.*, 108, 225-231.
215. Williams H., Flohr C. (2006) How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 118, 209-213.
216. Williams H., Robertson C., Stewart A., Ait-Khaled N., Anabwani G., Anderson R., Asher I., Beasley R., Bjorksten B., Burr M., Clayton T., Crane J., Ellwood P., Keil U., Lai C., Mallol J., Martinez F., Mitchell E., Montefort S., Pearce N., Shah J., Sibbald B., Strachan D., von Mutius E., Weiland S.K. (1999) Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103, 125-138.

217. Williams H., Grindlay D.J. (2009) What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2007 and 2008. Part 1. Definitions, causes and consequences of eczema. *Clin. Exp. Dermatol.*, 35, 12-15.
218. Woodfolk J.A. (2005) Allergy and dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 30-43.
219. Xu J., Saunders C.W., Hu P., Grant R.A., Boekhout T., Kuramae E.E., Kronstad J.W., Deangelis Y.M., Reeder N.L., Johnstone K.R., Leland M., Fieno A.M., Begley W.M., Sun Y., Lacey M.P., Chaudhary T., Keough T., Chu L., Sears R., Yuan B., Dawson T.L., Jr. (2007) Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18730-18735.
220. Zargari A., Selander C., Rasool O., Ghanem M., Gadda G., Cramer R., Scheynius A. (2007) Mala s 12 is a major allergen in patients with atopic eczema and has sequence similarities to the GMC oxidoreductase family. *Allergy*, 62, 695-703.
221. Zeller S., Glaser A.G., Vilhelmsson M., Rhyner C., Cramer R. (2008) Immunoglobulin-E-mediated reactivity to self antigens: a controversial issue. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 145, 87-93.
222. Zhang E., Tanaka T., Tajima M., Tsuboi R., Nishikawa A., Sugita T. (2011) Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol. Immunol.*, 55, 625-632.
223. Zutavern A., Hirsch T., Leupold W., Weiland S., Keil U., von Mutius E. (2005) Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study. *Clin. Exp. Allergy*, 35, 1301-1308.



LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Kodas 188710595, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel./faks. + (370) 5 212 45 65, www.ssm.lt/bioetika

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2007-07-19 Nr.: 24

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: Atopinių dermatitą lydinčių pirminės ir antrinės infekcijos sukėlėjų analizė
Protokolo Nr.: 1 Versijos Nr.: 1 Data: 2007 m. birželio 4 d.
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma: Versija: 1 Data: 2007 m. birželio 15 d.
Pagrindinis tyrėjas: Auksė Zinkevičienė
Biomedicininio tyrimo vieta: Istaigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas, Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra Istaigos adresas: Čiurlionio 21, Vilnius Istaigos pavadinimas: UAB „Alerginių susirgimų diagnostikos ir gydymo centras“ Istaigos adresas: Sėlių 64, Vilnius Istaigos pavadinimas: UAB „Biomedicinos tyrimų centras“ Istaigos adresas: Povilaičio 18, Vilnius Istaigos pavadinimas: A. Bardzilauskienės TČB Mikrobiologijos laboratorija Istaigos adresas: Žygimantų 8-5, Vilnius

Leidimas išduotas Lietuvos bioetikos komiteto posėdžio, įvykusio 2007 m. liepos 13 d., sprendimu.

Lietuvos bioetikos komiteto biomedicininį tyrimų ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1	Gyd. Gintarė Breivienė	Pediatrija	ne
2	Gyd. Vytautas Čepulis	Onkologija	taip
3	Doc. Eugenijus Gefenas	Bioetika	taip
4	Doc. Zita Liubarskienė	Filosofija	taip
5	Dr. Andrius Narbekovas	Teologija	taip
6	Prof. Algimantas Raugšlė	Pediatrija	ne
7	Doc. Krescentius Stoškus	Filosofija	taip
8	Grd. Vytautas Tutkus	Mikrochirurgija	taip
9	Dakt. Zdeleckienė	Teisė	ne

Lietuvos bioetikos komitetas dirba vadovaudamasis Geros Klinikinės Praktikos taisyklėmis, kurias siūloma priimti Europos Sąjungos, Japonijos ir JAV valdžios struktūroms

Pirmininkas



Eugenijus Gefenas