

Candida albicans Suşlarının Proteinaz Enzim Aktivitelerinin Araştırılması

Meltem Uzun¹, Nuri Kiraz², Özdem Anğ¹

Özet: Bez dermatiti olan bebeklerin deri sürüntülerinden izole edilen 26; kistik fibrozlu hastaların balgamlarından izole edilen 12 ve sağlıklı bireylerin boğaz salgularından izole edilen 6 *Candida albicans* suşunun proteinaz enzim aktivitesi sığır serum albümin agarda (pH 4.5) araştırılmıştır. 26 suşun altısı (+), 14'ü (++); 12 suşun biri (+), dokuzu (++) proteinaz enzim aktivitesi gösterirken; kontrol grubundan izole edilen 6 suşun sadece biri (++) proteinaz enzim aktivitesi göstermiştir. *Candida*'ların en önemli virülans faktörlerinden birisi olan proteinaz enziminin aynı zamanda *Candida*'lara bağlı infeksiyonların patogeneğinde de önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda da hasta grubundan izole edilen suşlar, kontrol grubuna oranla daha yüksek oranda proteinaz enzim aktivitesi göstermiş ve aradaki fark istatistikî açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuçlara göre proteinaz enziminin *Candida albicans* suşlarında bir patojenite kriteri olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: *Candida albicans*, virülans, patojenite.

Summary: Investigation of proteinase enzyme activity of *Candida albicans* strains. The proteinase enzyme activity of *Candida albicans* strains was tested in 26 isolates obtained from dermal lesions of babies with diaper dermatitis, 12 isolates from sputa of cystic fibrosis patients and 6 isolates from throat swabs of healthy persons, using bovine serum albumin agar (pH 4.5). In the diaper dermatitis group, six strains were found (+) and 14 (++) out of 26; in the cystic fibrosis group, one was (+) and nine (++) out of 12; although only one strain was found (++) out of six isolates in the control group. The proteinase enzyme activity which is one of the most important virulence factors of *Candida* spp has at the same time an important role in the pathogenesis of *Candida* infections. In our study, the patient isolates showed a higher ratio of proteinase enzyme activity in contrast to the isolates from the control group and difference between two groups were found statistically significant ($p < 0.05$). According to these results, the proteinase enzyme activity may be considered as one of the pathogenicity criteria in *Candida albicans* strains.

Key Words: *Candida albicans*, virulence, pathogenicity.

Giriş

Mikroorganizmalar konak dokularına invazyonu kolaylaştıran çeşitli hidrolitik enzimler salgırlarlar. *Candida*'ların da bu tür enzimlere sahip olduğu, özellikle *Candida albicans*'ın diğer türlere göre daha fazla olmak üzere bu tür enzimler salgıladığı bilinmektedir. Bu enzimler içinde en önemlileri *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde rolü olduğu düşünülen proteinaz ve fosfolipaz enzimlerdir. *C. albicans*'ın ilk defa 1965 yılında Staib ve arkadaşları tarafından hücre dışına proteinaz enzimi salgıladığı gösterilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda enzimin farklı tipleri olduğu ortaya konulmuş, proteinaz enziminin önemli bir virülans faktörü olduğu konusunda bulgular elde edilmiştir (1).

Çalışmamızda bez dermatiti olan bebeklerin deri sürüntülerinden ve kistik fibrozlu hastaların balgamlarından izole edilen *C. albicans* suşlarının proteinaz enzim aktivitesi araştırılmış, sağlıklı bireylerden izole edilen suşlarla kıyaslanmıştır.

Yöntemler

Bez dermatiti olan bebeklerden alınan deri sürüntüleri, kistik fibrozlu hastalardan alınan balgam örnekleri ve sağlıklı bireylerden alınan boğaz salgıları Sabouraud dekstroz agara (SDA) ekilmiş ve 37°C'de bir hafta süreyle inkübe edilmiştir. Üreyen suşlar klamidospore oluşumunu araştırmak için mısır unlu Tween 80 agara çizgi şeklinde ekilmiş, fermentasyon ve asimilasyon deneyleri uygulanmıştır (2).

Araştırmalar sonucunda dermatitli bebeklerden 26; kistik fibrozlu hastalardan 12; sağlıklı bireylerden 6 *C. albicans* suşu tanımlanmıştır. *C. albicans* olarak tanımlanan bu suşlar, proteinaz enzim aktiviteleri araştırılmak üzere çalışma kapsamına alınmıştır.

Proteinaz enzim aktivitesini araştırmak için SDA'daki 48 saatlik saf kültürlerden, Sabouraud dekstroz buyyona pasaj yapılmış

ve etüvde bir süre bekletilmiştir. Steril distile su ile 10⁸ hücre/ml olacak şekilde ayarlama yapılmış, bu süspansiyonlardan, sığır serum albumin agara (pH 4.5) tek koloni düşecek şekilde ekim yapılmıştır. Besiyerleri 96-120 saat oda ısısında bekletilmiştir. Bu süre sonunda kolonilerin etrafındaki şeffaf zon incelenerek proteolitik aktivite düzeyi ölçülmüştür. Şeffaf zonu olmayanlar (-), koloni köşesinden itibaren 1-2 mm zon oluşturanlar (+), 3-5 mm zon oluşturanlar (++) olarak değerlendirilmiştir (3).

Çalışmada CBS 2730 nolu *C. albicans* suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme χ^2 testiyle yapılmıştır.

Sonuçlar

Deney sonuçları her gün gözlenmiş, ancak beşinci günün sonunda net olarak değerlendirilebilmiştir. Dermatitli bebeklerden izole edilen 26 *C. albicans* suşunun 6 (% 23)'ü (+); 14 (% 54)'ü (++) değerinde zon oluşturmuş, 6 (% 23) suş proteinaz enzim aktivitesi göstermemiştir. Balgamlardan izole edilen 12 suşun 1 (% 8)'i (+), 9 (% 75)'ü (++) değerinde zon oluştururken, 2 (% 16) suş (-) sonuç vermiştir.

Kontrol grubunun boğaz salgularından izole edilen suşların ise sadece 1 (% 16)'i (++) değerinde zon oluşturmuş, diğer suşlarda herhangi bir proteolitik aktivite saptanmamıştır. Suşlar toplu olarak değerlendirildiğinde, hasta grubundan izole edilen 38 *C. albicans* suşunun 30 (% 79)'u, kontrol grubundan izole edilen 6 *C. albicans* suşunun 1 (% 6)'i proteinaz enzim aktivitesi göstermiştir.

Hasta ve kontrol grubundan izole edilen *C. albicans* suşlarının proteinaz aktiviteleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Yapılan istatistikî değerlendirme sonucunda hasta grubu ile kontrol grubu arasında, proteinaz enzim aktivitesi açısından anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

İrdeleme

C. albicans'ın hücre dışına proteinaz enzimi salgıladığının ilk kez 1965 yılında Staib ve arkadaşları tarafından gösterilmesinden

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul

(2) Ösmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir

Tablo 1. Hastalardan ve Kontrol Grubundan İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarının Proteinaz Aktivite Dereceleri

Hasta Grubu	Proteinaz Aktivite Derecesi			Toplam
	Yok	(+)	(++)	
Bez Dermatitli	6	6	24	26
Kistik Fibroz	2	1	9	12
Kontrol Grubu	5	0	1	6
Toplam	13	7	24	44

$\chi^2=9.57$; SD=2; p<0.05

sonra konuya ilgi artmıştır. 1968 yılında Remold ve Fasold, enzimi saflaştırarak tiplendirmeyi başarmışlardır. İlk çalışmalarda, farklı suşlar tarafından salgılanan proteinazların, benzer molekül ağırlıkları nedeniyle aynı yapıda oldukları düşünülmüşse de daha sonra optimum pH, substrat özgüllüğü ve izoelektrik gibi özellikleri farklılıklar gösteren farklı proteinazların olduğu gösterilmiştir (4,5). Birçok çalışmada proteinaz enziminin *Candida*'ların patogeneğinde önemli bir virülans faktörü olduğu yolunda bulgular ortaya konmuştur. Proteinaz üreten ve üretmeyen *C. albicans* suşları ile yapılan çalışmalarda proteinaz üreten suşların daha patojen olduğu gösterilmiştir (6-9). *Candida* asid proteinaz (CAP)'ın IgA1 ve IgA2'nin hafif zincirlerini etkilemeksizin ağır zincirlerini sindirme yeteneğinde olduğu belirtilmiştir. Böylece gastrointestinal sistem ve mukozal yüzeylerde önemli bir immünolojik bariyer olan IgA'nın CAP tarafından yıkılması ile *Candida* kolonizasyonu kolaylaşmaktadır (1). Deri keratinin CAP tarafından sindirilebilir olması da deri ve epitel dokulara *Candida* kolonizasyonu ve invazyonunu kolaylaştıran önemli bir faktördür (10). Ancak CAP'ın saç keratinine etkisi gösterilememiştir. Klinik gözlemler de *Candida*'ların saçta infeksiyon oluşturmadığını doğrulamaktadır. Ayrıca keratin otoklavlandıktan sonra da özelliğini kaybetmemekte ve proteinaz oluşturan suşlar için uygun bir nitrojen kaynağı olmaktadır (11).

C. albicans tarafından oluşturulan asid proteinazın bir virülans faktörü olarak önemini gösteren başka bazı bulgular da mevcuttur. Sistemik *Candida* infeksiyonlarında saflaştırılmış proteinaza karşı oluşturulmuş antikorlar ELISA yöntemi ile gösterilmiştir (12). Sağlıklı kişilerin yanak mukozasından alınan epitel hücreleri in vitro olarak *C. albicans* ile inkübe edilmiştir. Ortama asid proteinaz inhibitörü olarak pepstatin A eklenen grupta kolonizasyonun gerçekleşmediği görülmüştür (9,13). Asid proteinazın plazma kallekrein-kinin sistemini aktive ederek damar geçirgenliğini artırdığı gösterilmiştir (14). Asid proteinazın mayayı konağın savunma sistemine karşı koruduğuna ilişkin bulgular vardır. Bu konuda çelişkili sonuçlar ortaya koyan çalışmalar varsa da, proteinaz salgılayan suşların, fagositoza ve hücre içi öldürmeye karşı daha dirençli oldukları görüşü ağırlık kazanmaktadır (15-18).

Candida'ların aderans ve invazyonlarında da enzimatik mekanizmaların rolü olduğu gösterilmiştir. *C. albicans*'ın oluşturduğu asid proteinaz gibi keratinolitik enzimler, epidermal keratin bariyerini sindirerek aşabilirler. Benzer şartlar altında deri katlarında harabiyet oluşturan *C. albicans* suşlarının nonpatojenik *Candida* türlerinden daha fazla miktarda asid proteinaz oluşturduğu gösterilmiştir (1).

Çalışmamızda hasta grubundan izole edilen *C. albicans* suşlarının, üst solunum yolları florasında komensal olarak bulunan *C. albicans* suşlarına göre daha yüksek oranda asid proteinaz oluşturduğu ve istatistikî açıdan aradaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur. Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiştir (14-21) ve

çalışmamızla, asid proteinaz enziminin, *C. albicans* tarafından oluşturulan infeksiyonlarda önemli bir virülans faktörü olarak rol oynadığı vurgulanmıştır.

Kaynaklar

1. Ray T L, Payne CD, Morrow BJ. *Candida albicans* acid proteinase: Characterization and role in candidiasis. *Adv Exp Med Biol* 1991; 306: 173-83
2. Rippon JW. *Medical mycology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988: 525
3. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-14
4. Negi M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 32-6
5. Portillo F, Gancedo C. Purification and properties of three intracellular proteinases from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1986; 881: 229-35
6. Bernardis FD, Agantensi L, Ross IK, Emerson GW, Lorenzini R, Sullivan PA, Cassone A. Evidence for a role of secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1990; 161: 1276-83
7. Bernardis FD, Morelli L, Ceddia T, Lorenzini R, Cassone A. Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. *J Med Vet Mycol* 1990; 28: 125-37
8. Ross LK, Bernardis FD, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 687-94
9. Ghannoum M, Elteen KA. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 407-13
10. Ray TL, Digre KB, Payne CD. Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 37-41
11. Hattori M, Yoshiura K, Negi M, Ogawa H. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1984; 22: 175-83
12. Ray TL, Payne CD. Detection of *Candida* acid proteinase (CAP) antibodies in systemic candidiasis by enzyme immunoassay. *Clin Rev* 1987; 35: 711A
13. Borg M, Ruchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 1988; 56: 626-31
14. Kamiñishi H, Tanaka M, Cho T, Maeda H, Hagihara Y. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 1990; 58: 2139-43
15. Macdonald F, Odds FC. Purified *Candida albicans* proteinase in the serologic diagnosis of systemic candidosis. *JAMA* 1980; 243: 2409-11
16. Kamiñishi H, Hagihara Y, Hayashi S, Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1986; 53: 312-6
17. Kuşümür S. Kandidalarda proteinaz aktivitesinin virülans ile ilişkisi. *Gazi Üniv Tıp Fak Derg* 1987; 30: 24-7
18. Kuşümür S, Elnahi H, Altan N. Virulence of proteinase positive and proteinase negative *Candida albicans* to mouse and killing of the yeast by normal human leukocytes. In: Tümbay E, Secliger HPR, Anđ Ö, eds. *Candida and candidiasis*. New York: Plenum, 1991: 159-66
19. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence of role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985; 3: 571-6
20. Kuşümür S, Elnahi H. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin patojenite testleri ile saptanması ve bunlarla asid proteinazın gösterilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1991; 21: 64-9
21. Ergin M, Kuşümür S. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. *Mikrobiyol Bil* 1994; 28: 338-4