

FLUKONAZOLUN SUBİNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ *CANDIDA ALBICANS*'IN BAZI VİRULANS FAKTÖRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ*

Aydan ÖZKÜTÜK, Yavuz DOĞAN, Sevin KIRDAR, Cem ERGON, Nuran YULUĞ

ÖZET

Candida albicans tüm dünyada invaziv infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu infeksiyonların artması ile beraber sıkılıkla kullanılan azol grubu antifungal ajanlara karşı bir direnç sorunu da ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda flukonazolun subinhibitör konsantrasyonlarında *C.albicans*'ın bazı virulans faktörlerinde (fosfolipaz aktivitesi, germ tüp oluşturma ve konak epitel hücresinde aderans) bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 2'si flukonazole duyarlı-S (MİK değerleri 2 ve 8 µg/ml), 2'si doza bağımlı duyarlı-D (MİK değerleri 16 µg/ml) ve 2'si de dirençli-R (MİK değerleri 64 µg/ml) olmak üzere 6 *C.albicans* suçu çalışmaya alınmıştır. Suglarda fosfolipaz aktivitesi, germ tüp oluşturma ve ağız epitel hücresinde aderans özellikleri başlangıçta ve flukonazolun dört subinhibitör konsantrasyonunda (1/2, 1/4, 1/8, 1/16xMİK) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak flukonazolun subinhibitör konsantrasyonlarında suşların germ tüp oluşturma aktivitesinin kaybolduğu ve *C.albicans*'ın ağız epitel hücrelerine aderansında azalma olduğu saptanmıştır. Aderanstaki azalma ile suş direnç oranları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Fosfolipaz aktivitesi subinhibitör konsantrasyonlarda da devam etmiş ve genel olarak artma eğilimi göstermiştir.

Anahtar sözcükler: SubMİK, *Candida albicans*, flukonazol, virulans

SUMMARY

Effect of subinhibitory concentrations of fluconazole on some virulence factors of Candida albicans.

Candida albicans causes invasive infections all over the world. The increase in these infections brings the problem of resistance to the frequently used azole group of antifungal agents. We investigated whether there was any change in some *C.albicans* virulence factors (phospholipase activity, germ tube formation and adherence to host epithelial cell) when subinhibitory concentrations of fluconazole were used. For this purpose we studied a total of six *C.albicans* strains, two sensitive to fluconazole (S) (minimum inhibitory concentration values of 2 and 8 µg/ml), two dose-dependent sensitive (D) (MIC value of 16 µg/ml) and two resistant (R) (MIC value 64 µg/ml). This virulence factors of the strains were studied at the beginning of the study and at four subinhibitory concentrations of fluconazole (1/2, 1/4, 1/8, 1/16xMIC). It was found that when subinhibitory concentrations of fluconazole are used the germ tube formation activity of the strains disappears and adherence of *C.albicans* to buccal epithelial cells decreases. However there was no significant relation between decrease in adherence and resistance level of strains. The phospholipase activity continued at subinhibitory concentrations and generally there was a tendency to increase.

Key words: SubMIC, *Candida albicans*, fluconazole, virulence

GİRİŞ

C.albicans insan normal deri ve mukozalarında bulunan fırsatçı bir mantar türüdür. Özellikle bağılık yanıtını baskınlamış hasta gruplarında hayatı tehdit eden, ciddi, invaziv infeksiyonlara yol açmaktadır (8,14). İnvaziv kandidozların ortaya çıkışında konak immun yanımı ile birlikte *Candida*'lara ait virulans faktörleri de rol oynamaktadır. Bu virulans faktörleri; aderans, germ tüp oluşturma, slime üretimi, endotoksin ben-

zeri aktivite, hücre membranı yapısında bulunan mannan antijeni, konak hücreleri yapısına moleküler benzeme, sideroforları kullanabilme yeteneği, proteinaz, hiyalüronidaz ve fosfolipaz enzimleridir (3,13).

Fungal infeksiyonların sağaltımında etkili dozun belirlenmesi için bakteriyel infeksiyonlarda olduğu gibi ilacın minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerleri kullanıl-

* Candida Mikrobiyolojisi ve Infeksiyonları Simpozyumu'nda sunulmuştur (21-22 Haziran 2002, Eskişehir).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir.

maktadır. Ancak ilacın etkisini sadece MİK değerleri üzerinden değerlendirmek yeterli değildir. Mevcut etki ilacın farmakokinetik, farmakodinamik özellikleri, mikroorganizmanın virulans faktörleri ve konağın immun yanıtı ile bir arada şekillenmektedir. Bakteriler üzerinde bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Antibiyotiklerin MİK altındaki değerlerde (subinhibitör konsantrasyonlar) de bakterilerin üremesi ve virulansına etkili olduğu bildirilmektedir (12). Ancak man-

tarlar üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır. İnvaziv fungal infeksiyonların sağaltımında azol grubu antifungal ajanlar sık olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda sık kullanılan azol türevlerinden flukonazolun subinhibitör konsantrasyonlarında *C.albicans*'ın bazı virulans faktörlerinde (fosfolipaz aktivitesi, germ tüp oluşturma ve konak epitel hücresına aderans) bir değişim olup olmadığına araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mikroorganizmalar: Çalışmamızda 2'si flukonazole duyarlı-S (MİK değerleri 2 ve 8 µg/ml), 2'si doza bağımlı duyarlı-D (MİK değerleri 16 µg/ml) ve 2'si de dirençli-R (MİK değerleri 64 µg/ml) olmak üzere 6 *C.albicans* suşu inceleme-ye alınmıştır.

Antifungal duyarlılık testi: Altı klinik izolatın flukonazole (Pfizer, Türkiye) duyarlılıklarını NCCLS M 27-A belgesine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmış ve kontrol amacıyla ile *C.albicans* ATCC 90028 suşu kullanılmıştır (10).

Flukonazolun subminimal inhibe edici konsantrasyonlarındaki etkisini gözlemek için önce her suşun fosfolipaz aktivitesi, germ tüp oluşturma ve konak epitel hücresına aderans özelliği araştırılmış, daha sonra da subinhibitör konsantrasyonlarda aynı virulans faktörleri tekrar değerlendirilmiştir. Subinhibitör konsantrasyon değerleri olarak suşun saptanmış minimal inhibe edici konsantrasyon değeri ve altındaki dört konsantrasyon değeri alınmıştır (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 x MİK).

Fosfolipaz aktivitesinin saptanması: Yöntem olarak Samaranayake ve ark. (11)'nın metodu uygulanmıştır. Yumurta sarılı agar hazırlamak için önce 184 ml distile su içe-risinde 13.0 g SDA, 11.7 g NaCl ve 0.111 g CaCl₂ içeren karışım hazırlanarak otoklavlanmıştır. Yumurta sarısı 500 g'de on dakika santrifüje edilmiş, 20 ml süpernatant sterilize edilmiş olan karışımı eklenmiştir. Klinik örneklerden daha önce izole edilmiş olan 6 *C.albicans* suşu SDA besiyerine pasajlanarak, 35-37°C'de inkübe edilmiş, üreyen kolonilerden, Thoma lamında sayılm yaparak steril serum fizyolojik solüsyonunda mililitrede 10⁷ maya olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan onar mikrolitre alınarak

yumurta sarılı agar yüzeyine inoküle edilmiştir. Oda ısısında yüzey kuruduktan sonra plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, koloni çapının koloni etrafındaki presipitasyon zonunun oluşturduğu toplam çapa bölünmesi ile presipitasyon aktivitesini gösteren Pz değeri hesaplanmıştır. Pz değeri 1.00'e eşit olan suşlar fosfolipaz olumsuz olarak değerlendirilirken Pz değeri 1.00'den küçük olanlar ise olumlu olarak değerlendirilmiştir (11).

Germ tüp testi: SDA'daki 24 saatlik saf kültürden alınan koloniler her biri 0.5 ml serum içeren tüplerde süspansiyon edilmiştir. Tüpler 37°C'de 3 saatte geçmeyecek şekilde inkübe edilmiş ve sürenin sonunda süspansiyonlardan alınan 1-2 damla örnek lam-lamel arası ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mayadan dışa doğru uzanan, eni maya hücresinin 1/2'si ve boyu hücrenin 3-4 katı olan oluşumlar germ tüp olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Aderans testi: İki gönlüllü kişinin yanak mukozası sterili ekuvyonla kazınarak epitel hücreleri steril tüpte toplanmış ve PBS ile süspansiyon edilip üç kez yıkandıktan sonra mililitrede 10⁵ olacak şekilde ayarlanmıştır. SDA'daki 24 saatlik saf kültürdeki maya kolonilerinden alınarak PBS'te süspansiyon edilip üç kez yıkılmıştır. Daha sonra maya süspansiyonu 10⁷/ml'ye ayarlanmıştır. Maya hücreleri ve epitel hücreleri 1'er ml plastik tüplere konulup 37°C'de shaker inkubatörde 1 saat bekletilmiştir. Sürenin sonunda her tüpten lamlar üzerrine 1 damla süspansiyondan damlatılmış ve kurutulduktan sonra kristal viyole boyası ile boyanmıştır. Aderans oranını belirlemek için maya hücrelerinin yaptığı epitel hücrelerinden toplam 100 tanesi sayılmıştır (7).

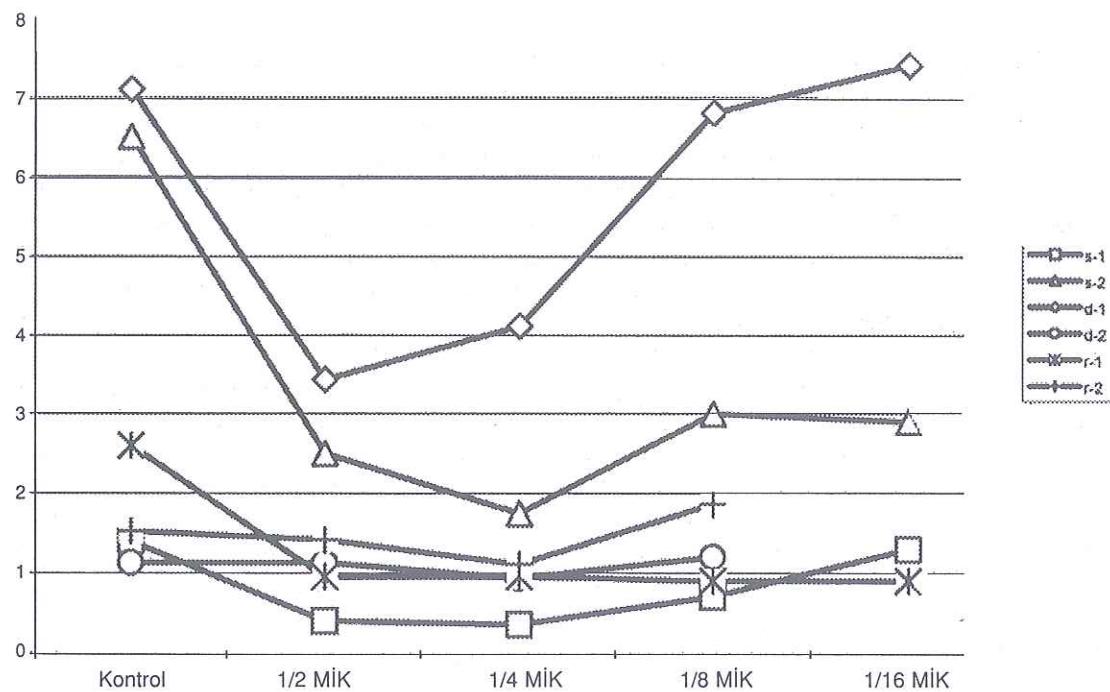
BULGULAR

Çalışmamızda ağız epitel hücrelerine tutunmada genel olarak bir azalma saptanmıştır. Azalmanın 1/2 ile 1/16 subinhibitör konsantrasyonları arasında suşlara göre değiştiği görülmüştür. S1 suşunda 1/8 subinhibitör konsantrasyonuna, S2 ve R1 suşlarında 1/16 ve D1 suşunda ise 1/4 subinhibitör konsantrasyonlarına kadar azalmanın sürdüğü gözlenmiştir. Suşların flukonazole direnci ile aderanstaki azalma arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Subinhibitör konsantrasyonlarda *C.albicans* suşlarının ağız epitel hücrelerine adezyon oranları şekil 1'de izlenmektedir.

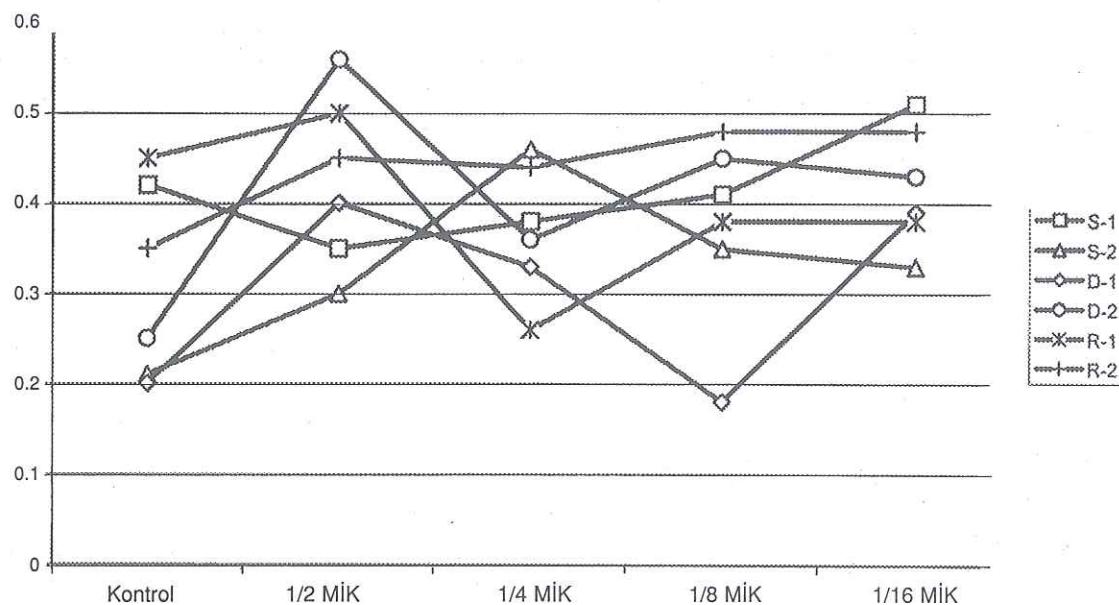
Suşların fosfolipaz aktivitesi S1 suşu dışında genel ola-

rak artma göstermiştir. S1 suşunda 1/16'ya dek aktivite azalmış, 1/16 subinhibitör konsantrasyonda artmıştır. Diğer suşlarda fosfolipaz aktivite artışı özellikle 1/2 subinhibitör konsantrasyonunda en yüksek olup, suşlar arasında farklılıklar göstermekte ve sıklıkla 1/8 x MİK'a kadar sürmektedir. Ancak fosfolipaz aktivitesindeki bu değişim ile diğer virulans faktörleri ve suşun direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Flukonazolun subMİK değerlerinde fosfolipaz aktivite varlığı şekil 2'de gösterilmektedir.

Germ tüp oluşumu ise tüm subinhibitör konsantrasyonlarda inhibe olmuştur.



Şekil 1. SubMİK değerlerinde *C.albicans* suşlarının ağız epitel hücrelerine tutunma oranları.



Şekil 2. Flukonazolun subMİK değerlerinde fosfolipaz aktivite varlığı (fosfolipaz aktivitesi 1-Pz değerine dönüştürülerek şekilde gösterilmiştir).

TARTIŞMA

Son yıllarda başta *Candida*'lar olmak üzere fungal infeksiyonların insidansında giderek artış görülmektedir. Bu durum AIDS pandemisi, geniş spektrumlu antibakteriyel ajanların kullanımını ve bağımlılığı baskılanmış hasta sayısındaki artış gibi birçok faktörle ilişkilidir (6). Konak immun yanıtında zayıflamaya neden olan bu faktörler yanında fungal virulans faktörleri de infeksiyonların patogenezinde rol oynamaktadır. *C.albicans*'a ait virulans faktörleri içinde konak epitel hücrelerine aderans, fosfolipaz aktivitesi ve germ türp oluşturma gibi çeşitli özellikler bulunmaktadır (3).

Artan infeksiyonlarla birlikte antifungal ilaçlar da sağaltım ve profilaktik amaçlı olarak sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Flukonazol en sık kullanılan antifungal ajanlardan olup sitokrom p450 enzim sistemini inhibe ederek ve fungal hücre membranında yer alan ergosterol sentezini engelleyerek etki göstermektedir (2). Sağlığında genel yaklaşım ilgili mikroorganizmayı inhibe edecek minimum antibiyotik konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi ve sağaltım dozlarının buna göre ayarlanması temeline dayanmaktadır. Ancak konak, mikroorganizma ve ilaç arasında daha karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. MİK değeri altındaki konsantrasyonlarda da ilaçın mikroorganizma üzerinde çeşitli etkileri olmaktadır.

İlacın subinhibitör konsantrasyonlarının mikroorganizmaların üremesine, morfolojisine, hücrelere adezyonuna ve virulans faktörleri üzerine etkili olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (9,12). Bazı araştırmacılar *C.albicans*'ın ağız epitel hücresinde adezyonu ile fosfolipaz aktivitesi arasında korelasyon bildirmekle birlikte (1), bir hayvan çalışmada düşük fosfolipaz aktivitesinde gastrointestinal hücrelere adezyonda artma gösterilmiştir (4). Yine bazı çalışmalarla antifungal ilaca maruziyet ile virulans faktörlerinden bazılılarındaki değişim araştırıldığında adezyonda azalma sıklıkla

görülmüş, ancak fosfolipaz aktivitesinde değişkenlikler gözlenmiştir (5,15).

Çalışmamızda flukonazolun subinhibitör konsantrasyonlarında *C.albicans*'ın bazı virulans faktörlerindeki değişiklikler ve bu değişikliklerin suş direnci ile bağlantılı olup olmadığı araştırıldığından; ağız epitel hücrelerine aderansda genel olarak bir azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın *Candida* hücre membranındaki bozulmaya bağlı olarak mevcut adezinlerin de bozulmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak aderanstaki azalma ile flukonazole direnç arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Suşların fosfolipaz aktivitesi S1 suş dışında genel olarak artma göstermiştir. S1 suşunda 1/16'ya dek aktivite azalmış, 1/16 subinhibitör konsantrasyonda artmıştır. Diğer suşlarda ise 1/2xMİK'den itibaren aktivitede artış görülmüştür. Ancak yine suş direnci ile fosfolipaz aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Flukonazolun subinhibitör konsantrasyonlarında suşların germ türp oluşturma aktivitesi de kaybolmuştur.

Sonuç olarak flukonazolun düşük dozları ile temas durumunda *C.albicans*'ın epitel hücrelerine tutunma gücünün zayıfladığı, germ türp oluşturma özelliğinin ortadan kaybolduğu bununla beraber fosfolipaz aktivitesinin ise indüklendiği gözlenmiştir. Mevcut sonuçlar subinhibitör konsantrasyonlarda *C.albicans*'ın aderans, fosfolipaz aktivitesi ve germ türp oluşturma faktörleri arasında bağımlı bir ilişkiyi desteklememiştir. Araştırılan virulans faktörlerinin birbirlerinden bağımsız olarak ve suşların direnci ile ilgili olmaksızın etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak virulans faktörlerinin ilişkilerinin tam olarak anlaşılmasında hayvan deneyleri ile ve daha çok suş üzerinde analizlerin yapılması patogenez üzerinde daha açıklayıcı olabilecegi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts, *J Gen Microbiol* 131:1217 (1985).
- 2- Bodey GP: Azole antifungal agents, *Clin Infect Dis* 14 (Suppl 1):161 (1992).
- 3- Calderone RA, Fonzi AW: Virulence factors of *Candida albicans*, *Trend Microb* 9:327 (2001).
- 4- Cole GT, Lynn KT, Seshan KR: An animal model for oropharyngeal, esophageal and gastric candidosis, *Mycoses* 33:7 (1990).
- 5- Fekete-Forgacs K, Gyüre L, Lenkey B: Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*, *Mycoses* 43:273 (2000).
- 6- Fridkin SK, Jarvis WR: Epidemiology of nosocomial fungal infections, *Clin Microbiol Rev* 9:499 (1996).
- 7- Fukayama M, Calderone RA: Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of the mutants, *Infect Immun* 59:1341 (1991).
- 8- John E, Edwards JR: Candida species, "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Disease*, 4. baskı" kitabında s. 2289, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 9- Lowdin E, Odenhol-Tornqvist I, Bengtsson S, Cars O: A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations, *Antimicrob Agents Chemother* 37:2200 (1993).
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Reference Method for Broth Dilution Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A*, NCCLS, Villanova, Pa (1996).

- 11- Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW: Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro, *Sabouradia* 22:201 (1984).
- 12- Töreci K, Kaygusuz A: Çeşitli antibiyotiklerin subminimal inhibitör konsantrasyonlarının çeşitli bakteriler üzerine etkileri. 1. Amikasin ile alınan sonuçlar, *ANKEM Derg* 8:368 (1994).
- 13- Vartivation SE: Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanism of fungi, *Clin Infect Dis* 14:30 (1992).
- 14- Warren GN, Hazen CK: *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance, "PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Yolken (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s. 723, ASM Press, Washington, DC (1995).
- 15- Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ: The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:317 (2001).