

# Virulentni čimbenici gljivice vrste *Candida albicans*

---

**Kosalec, Ivan; Pepeljnjak, Stjepan; Matica, Biserka; Jarža-Davila, Neda**

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2005, 61, 381 - 396**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:723159>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



## Virulentni čimbenici gljivice vrste *Candida albicans*

IVAN KOSALEC<sup>1\*</sup>, STJEPAN PEPELJNJAK<sup>1</sup>, BISERKA MATICA<sup>2</sup>, NEDA JARŽA-DAVILA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Schrottova 39/I, <sup>2</sup>Služba za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo grada Zagreba, Mirogojska 3, Zagreb

### UVOD

Kvasci su veoma rasprostranjeni eukariotski mikroorganizmi. Filogenetski su vrlo raširena skupina mikroorganizama i ubrajaju se u skupinu askomikota (*Ascomycota*), odnosno *Hemiascomycetes* (u kojoj se nalaze medicinski važne vrste roda *Candida* i *Geotrichum*) i u skupinu bazidiomikota (*Basidiomycota*), odnosno *Hymenomycetes* (u koju se ubrajaju medicinski važne vrste roda *Cryptococcus*, *Malassezia* i *Trichosporon*) i *Urediniomycetes* (s medicinski važnim vrstama roda *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*) (1). Hemiaskomicete sadrže red *Saccharomycetales*, unutar kojeg se nalaze filogenetski vrlo slične vrste roda *Candida*. Pripadnici reda saharomicetales:

- nemaju sposobnost tvorbe hifa ili su im hife samo rudimentarne,
- vegetativne stanice (blastospore) dijele se pupanjem ili fisijom (cijepanjem),
- stanična stjenka ne sadrži hitin,
- askusi se tvore pojedinačno ili u lancima (2, 3).

Poznato je više od 100.000 vrsta gljivica, a nekoliko stotina vrsta ubraja se u oportunističke patogene (4). ●sim medicinski značajnih gljivica koje uzrokuju mikoze, nekoliko desetaka vrsta upotrebljava se u prehrambenoj industriji, primjerice za proizvodnju vitamina, organskih kiselina i tvari s baktericidnom i fungicidnom aktivnošću (npr. *Penicillium* i *Acremonium* vrste) te se još traže nove vrste i sojevi gljivica koje će tvoriti za čovjeka korisne supstancije. Neke se vrste gljivica upotrebljavaju kao biofungicidi u poljoprivredi (vrste *Trichoderma harzianum* i *T. virens*) (5, 6), neke su vrste nezaobilazan čimbenik pri proizvodnji namirnica: kruha, piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda (na primjer vrste *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, vrste roda *Candida* i druge), a s nekim vrstama plijesni oplemenjuje se okus i miris sireva (vrste

---

\* Mr. sc. Ivan Kosalec, mr. pharm., Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Schrottova 39/I, 10000 Zagreb; E-pošta: ikosalec@pharma.hr

*Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*). Neke orijentalne namirnice sadržavaju plijesni (vrste *Aspergillus oryzae*, *A. soyae*, *A. tamarii*, *Rhizopus* sp.) čija je uloga u fermentaciji bitan korak pri proizvodnji npr. koja, tamarija, misoa, tempeha, raznih sireva i sličnog (7).

Tijekom evolucije, gljivice su razvile mehanizme preživljavanja i prilagodile se na mnogim nepovoljnim vanjskim čimbenicima kao što su temperatura, vlaga, oskudan hranidbeni supstrat, pH, UV i druga zračenja te nazočnosti drugih mikroorganizama u životnoj sredini s kojima su vezane kompetativnim odnosima za hranidbeni supstrat (4). No, gljivice su razvile mehanizme preživljavanja u i na čovjeku i životinjama, gdje su najčešće prisutne kao apatogena komenzalna flora i samo u određenim uvjetima postaju patogene, odnosno prelaze u invazivni oblik uzrokujući mikoze.

Smatra se da je Hipokrat prvi opisao kliničku sliku mikoze u ljudi (kandidijazu usne šupljine) u 5. stoljeću prije Krista. Prvi opis etiološkog čimbenika, odnosno mikroskopske slike vrste *C. albicans* iz kliničkog materijala opisao je Langenbeck, nakon 23 stoljeća, ili točnije 1839. godine (8). Mikoze uzrokovane gljivicama bilježene su sve do pedesetih godina prošlog stoljeća sporadično, a najčešći uzročnik mikoza bila je vrsta *C. albicans*. Rijetko su opisane mikoze s drugim gljivičnim vrstama (8). Upravo početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća pa sve do danas, uporaba novih načina liječenja malignih bolesti, pojavom sve većeg broja imunokompromitiranih pacijenata (uslijed hematoloških i drugih malignih bolesti, presađaka koštane srži i organa i posljedične terapije, neutropenije te infekcije s HIV-om i epidemije SIDE), primjenom antibiotika širokog spektra, dugotrajnom terapijom kortikosteroidnim lijekovima, povećanom uporabom centralnovenskih i drugih katetera, asistirajućom ventilacijom, dugotrajnom hemodijalizom, bilježi se kontinuirano povećanje populacija pacijenata s mikozama uzrokovanih kvascima i kvascima sličnim gljivicama. Osim navedenih rizičnih čimbenika pacijenta za razvoj mikoza, neuroendokrine i imunološke promjene tijekom fizičkih, emotivnih i kemijskih stresova također su čimbenici rizika (9). Velik broj mikoza stečeno je u bolnicama egzogenim putem (nozokomijalne infekcije stečene pri hospitalizaciji uslijed traume, opekotina ili kirurškog zahvata) te se, osim endogenih mikoza koje uzrokuje komenzalna flora, danas smatra da gotovo svaka gljivica, ako se razviju uvjeti u imonokompromitiranih pacijenata, može dovesti u životnu opasnost pacijenta (10).

Osim danas najučestalije vrste *C. albicans*, velik je broj drugih vrsta kvascima sličnih mikroorganizama koji su u porastu kao uzročnici mikoza, često i glavni uzročnici velike smrtnosti u imunokompromitiranih pacijenata. U tablici 1. prikazani su najčešći izolati vrsta roda *Candida* i najznačajniji rizični čimbenici za razvoj kandidijaze. Osim vrste *C. albicans* kao najučestalijeg izolata, poznato je i opisano stotinjak non-*albicans Candida* vrsta, od kojih je manje od 70 opisano kao uzročnici između 35 i 65% svih kandidijaza. Najučestalije non-*albicans Candida* vrste su *C. parapsilosis* (20–40% od svih non-*albicans* vrsta *Candida*), *C. tropicalis* (10–30%), *C. krusei* (10–35%) i *C. glabrata* (5–40%). Ostale su vrste roda *Candida* također u porastu *C. guilliermondii* (2–5%) i *C. lusitaniae* (1–8%) (11). Vrste roda *Candida* mogu uzrokovati različite oblike bolesti, od lokaliziranih (kožnih, sluzničke) do diseminiranih. Onihomikoza je je-

dan od oblika lokalne infekcije na noktima prstiju ruku i nogu, a kroničan oblik mukokutane kandidijaze najčešći je u pacijenata sa stečenim deficitom T-limfocita. Kandidijaza usne šupljine također je povezana s deficijencijom T-limfocita, odnosno infekcijama virusom HIV-a (SIDA), ali i upotrebom širokospektralnih antibiotika i inhalacijom kortikosteroida u astmatičara. Epiglotitis i ezofagitis najčešće se javljaju u pacijenata s imunodeficijencijom. Gastrointestinalne infekcije uzrokovane vrstama roda *Candida* povezane su s upotrebom širokospektralnih antibiotika. Učestali su i cistitis i pijelonefritis povezani s dugotrajnom uporabom katetera, kao i vulvovaginitis. Najčešći je oblik infekcije s vrstama roda *Candida* u imunodeficijentnih pacijenata fungemija nakon primarne kolonizacije u nekom organu (gastrointestinalni sustav) ili uslijed prodora izazvanog intravaskularnim ili intraurinarnim kateterima. Diseminirani oblik kandidijaze može zahvatiti i srce, pluća, središnji živčani sustav, mišićno-skeletni sustav, peritoneum, jetru, slezenu i žučni mjehur (12).

Zbog značajnog povećanja mikoza uzrokovanih vrstama roda *Candida*, istraživanja su usmjerena prema utvrđivanju virulentnih čimbenika koji utječu na patogenost vrsta roda *Candida*. Naime, ta istraživanja pomogla bi pronalasku novih metoda liječenja, odnosno pronalaznju novih antimikotika. To je važno i zbog sve češće pojave rezistentnih sojeva vrsta roda *Candida* u populaciji imunokompromitiranih pacijenata.

Cilj ovog rada je prikazati glavne virulentne čimbenike vrste *C. albicans*, kao jednog od najčešćeg kliničkog izolata kandida.

**Tablica 1.** Rizični čimbenici za razvoj kandidijaze (11, 22)

Vrste	Najznačajniji rizični čimbenici
<i>Candida albicans</i> *	• Leukemije
<i>C. dubliniensis</i>	• Transplantacija organa
<i>C. tropicalis</i> *	• Tumori
<i>C. parapsilosis</i> *	• HIV+ (sida)
<i>C. glabrata</i> *	• Dijabetes
<i>C. krusei</i> *	• Vaskularni i drugi kateteri
<i>C. kefyr</i> * (prije <i>C. pseudotropicalis</i> )	• Kardiovaskularne bolesti
<i>C. lusitaniae</i>	• Kirurški zahvati u abdomenu
<i>C. guilliermondii</i>	• Renopatije
<i>C. lipolytica</i>	• Parenteralna ishrana
<i>C. fumata</i>	• Opekotine većih površina
<i>C. norvegensis</i>	• Dugotrajna profilaksa ili terapija antimikoticima, kortikosteroidima i širokospektralnim antibioticima
<i>C. utilis</i>	
<i>C. lambica</i>	
<i>C. ciferii</i>	
<i>C. norvegensis</i>	

\* najčešći izolati u više od 90% slučajeva

## Vrsta *Candida albicans*: kulturne osobine i raširenost

Gljivica *C. albicans* široko je rasprostranjena (ubikvitarna) vrsta i izolirana iz živog i neživog okoliša, kao što je površina biljaka, kukci, zemlja i dr. Izolirana je iz biljnih i životinjskih vrsta u vodi i na zemlji. Iako se vrsta *C. albicans* može izolirati iz zraka, zemlje i vode ti izvori povezani su kontaminacijom iz (najčešće) izmeta životinja i ljudi. U ljudskoj okolini, kandidate su česti kontaminanti bolničkih zidova, kreveta i drugog inventara, kao i hrane i pića. Na ljudskom tijelu kandidate su česti dio fiziološke flore, iako nalaz vrste *C. albicans* vrlo varira te ovisi o nizu čimbenika (dio tijela, način uzorkovanja, fiziološko stanje, spol, dob i dr.). Odds (13) je prikupio podatke o učestalosti kvasaca i vrste *C. albicans* s obzirom na mjesto izolacije te su skupni podaci prikazani u tablici 2.

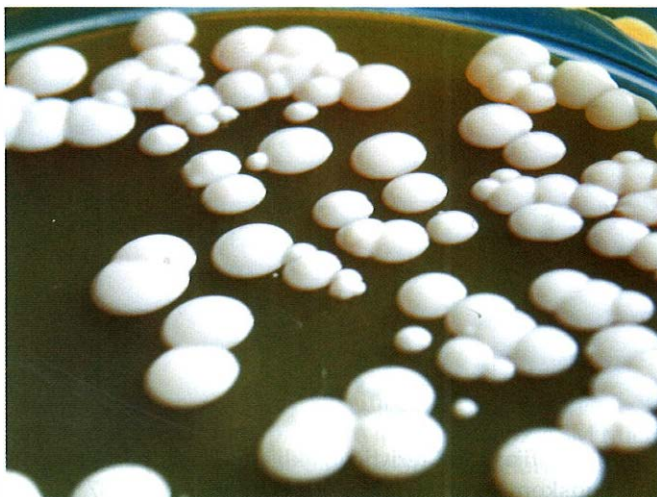
**Tablica 2.** Učestalost kvasaca i vrste *C. albicans* s obzirom na mjesto izolacije (preuzeto od Odds, 1988.)

Mjesto izolacije	Učestalost (%)	
	raspon	srednja vrijednost
<b>Bris sluznice usne šupljine, slina, bris grla</b>		
»zdrava« populacija – kvasci	2,0–71,3	31,5
hospitalizirani bolesnici – kvasci	12,7–76,2	50,2
»zdrava« populacija – <i>C. albicans</i>	1,9–62,3	19,4
hospitalizirani bolesnici – <i>C. albicans</i>	6,0–69,6	37,5
<b>Bris anorektalne regije</b>		
»zdrava« populacija – kvasci	8,0–60,0	27,2
hospitalizirani bolesnici – kvasci	5,7–83,1	43,3
»zdrava« populacija – <i>C. albicans</i>	8,0–20,0	16,3
hospitalizirani bolesnici – <i>C. albicans</i>	1,0–53,1	27,3
<b>Bris rodnice</b>		
»zdrava« populacija – kvasci	4,3–27,3	13,3
hospitalizirani bolesnici – kvasci	7,8–76,2	23,8
»zdrava« populacija – <i>C. albicans</i>	2,2–68,0	22,3
hospitalizirani bolesnici – <i>C. albicans</i>	4,5–60,0	18,9

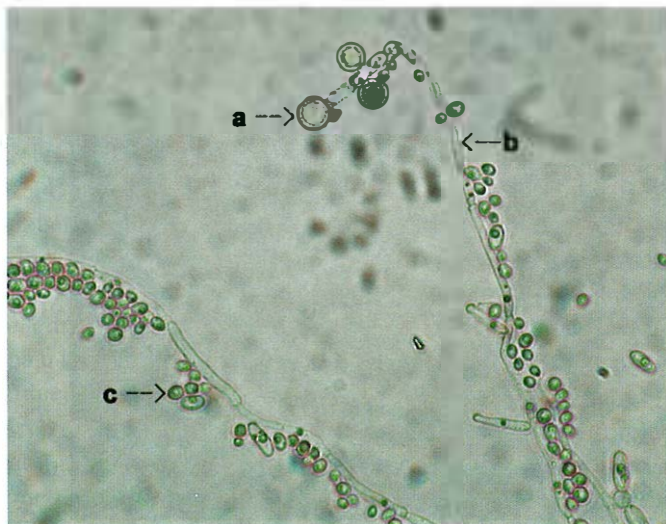
Identifikacija vrste *C. albicans* u rutinskom mikrobiološkom laboratoriju vezana je uz njezina fenotipska obilježja, odnosno kulturne osobine na selektivnim i/ili diferencijalnim podlogama kao što su: Sabouraud 2%-tni glukozni agar (slika 1) i rižin ili kukuruzni polisorbitni agar (slika 2) te polimorfizmom i »klijanjem« blastospora, odnosno prelaskom u (psedo)hifu (slika 3) te tvorbom pravih hifa, odnosno micelija (slika 4). *In vivo*, vrsta *C. albicans* prisutna je u obliku jednostanične blastospore, ali i u obliku (psedo)hifa (slika 5). Uz vrstu *C. albicans*, filogenetski je najuže povezana vrsta *C. dubliniensis* koja je otkrivena 1995. u timu Sullivana i suradnika (14). Zbog uske fi-



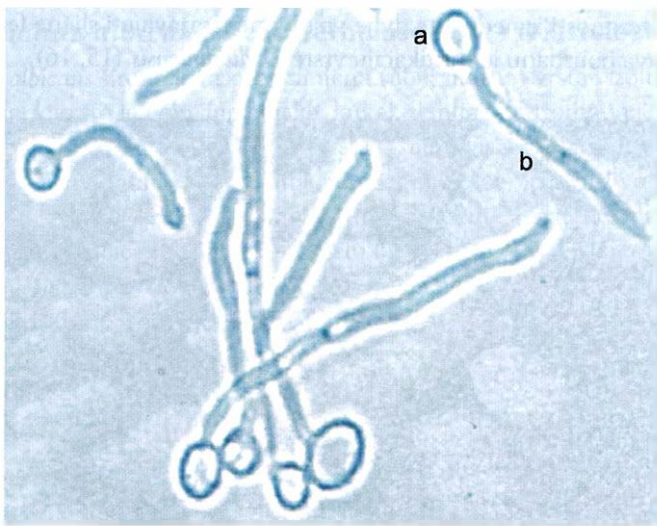
logenetske povezanosti između ove dvije vrste, one izražavaju i slične fenotipske osobine, što otežava pouzdanu identifikaciju vrste *C. dubliniensis* (15, 16).



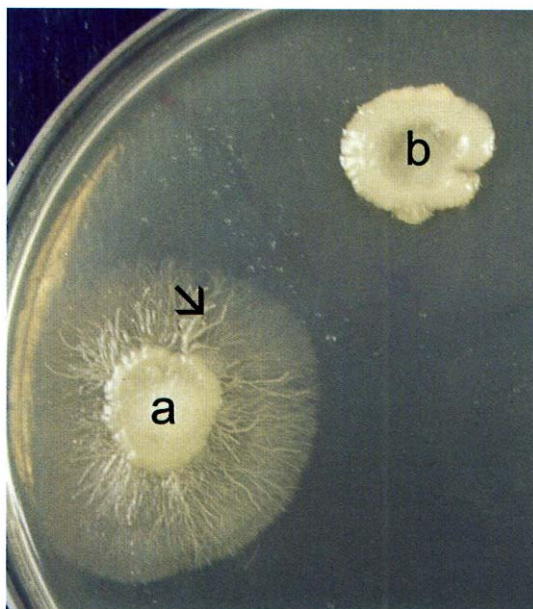
**Slika 1.** Kulturelne osobine vrste *Candida albicans* (i *C. dubliniensis*) na Sabouraud 2%-tnom glukoznom agaru nakon 24-satne inkubacije na 37°C – kolonije veličine 3-10 mm, okrugle, konveksne, bijele s karakterističnim mirisom na kvasac (snimio I. Kosalec)



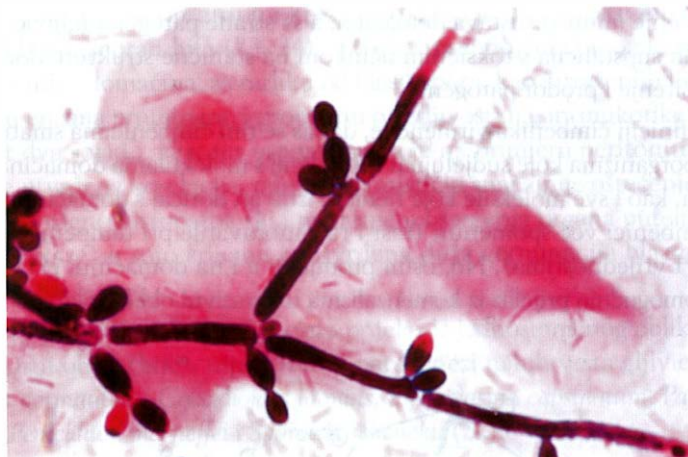
**Slika 2.** Mikrofotografija: karakteristična tvorba klamidospora (a) iz (pseudo)micelija vrsta *C. albicans* i *C. dubliniensis* uz tvorbu postraničnih blastospora na kukuruznom-polisorbatnom agaru nakon 24-satne inkubacije na 30°C (snimio I. Kosalec)



**Slika 3.** Mikrofotografija: karakteristično »klijanje blastospora« vrsta *C. albicans* i *C. dubliniensis* u ljudskom serumu nakon 3 sata inkubacije na 37°C – ovim testom iz blastospore (a) »klijanjem« nastaju pseudohife (b) što je osobina samo ove dvije vrste (preuzeto ljubaznošću Subhash K. Mohan)



**Slika 4.** Kulturelne osobine vrste *C. albicans* (a) i *C. glabrata* (b) na hranjivoj podlozi s dodatkom 1%-tnog govedeg seruma gdje je vidljiv micelarni oblik rasta vrste *C. albicans* (strjelica označava stvaranje micelija) (snimio I. Kosalec)



**Slika 5.** Mikrofotografija: bris rodnice pacijentice s klinički manifestnom kandidijazom – preparat obojen po Gramu, preuzeto ljubaznošću iz ASM MicrobeLibrary gdje je vidljiv prelazak jednostanične blastospore u micelarni oblik postraničnim stvaranjem blastospora

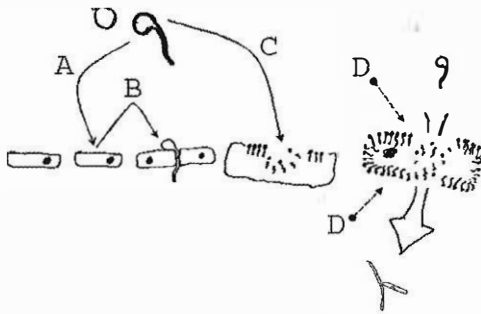
### Kako endogena komenzalna gljivica *Candida albicans* postaje patogena?

Velika većina mikoza uzrokovanih vrstama roda *Candida* potječe od endogene kolonizacije sluznice usne šupljine, gastro-intestinalnog sustava, kože ili rodnice. Kolonizacije sluznice i kože kandidama dolazi ubrzo nakon rođenja kada je novorođenče izolirano brojnim mikroorganizmima iz okoliša (17–19). U i na čovjeku gljivice su komenzali, odnosno rastu i razmnožavaju se u i na sluznicama usne šupljine, crijeva i rodnice, upotrebljavajući sekrete i druge tvari kao hranu, no bez klinički manifestnog razvitka mikoze. U imunokompetentnoj osobi, vrste roda *Candida* i drugi kvasci da bi preživjeli obrambene uvjete domaćina i lokalne flore (odnosno prisutnosti drugih mikroorganizama koji se natječu za supstrat i mikrobicidne supstancije) razvili su fizičke i kemijske čimbenike adaptacije koji uvjetuju ravnotežu između domaćina i gljivice. I doista, gljivice, odnosno vrste roda *Candida*, mogu živjeti i razmnožavati se u vrlo različitim uvjetima u i na čovjeku kao domaćinu, odnosno pri različitim pH vrijednostima (rodnica, sluznice, krv); pri različitim koncentracijama i odnosima  $O_2/CO_2$  (koža – krv); uz mnoštvo drugih mikroorganizama (gastro-intestinalni sustav), pri različitim temperaturama (gastro-intestinalni sustav, sluznice) (4, 20). Kao i za sve patogene mikroorganizme, bitan je odnos s domaćinom. Prelasku gljivica iz komenzalizma/kolonizacije u invazivan oblik pogoduju disfunkcija i oštećenje zaštitnih barijera domaćina. Na primjer, opekline oštećuju slojeve kože te uklanjanjem kože kao fizičke zapreke mogu se stvoriti uvjeti za razvitak mikoze. Primjer je i dugotrajna upotreba katetera, gdje postoji kontakt s tkivima i organima. No, najznačajniji je uzrok razvitka



mikoza oštećenje imunog sustava domaćina, a sa strane patogena (gljivice) to je tvorba specifičnih supstancija s toksičnim učinkom na stanične strukture domaćina, koje omogućuju širenje i prodor patogena.

Prema definiciji čimbenika virulencije, danas se tim čimbenicima smatraju sve molekule mikroorganizma koje sudjeluju u interakciji s molekulama domaćina ili strukturama stanica, kao i sve molekule koje nemaju izravan doticaj s domaćinom (24). Neki su fizički čimbenici već spomenuti (rast i razmnožavanje pri temperaturi domaćina, različitim pH vrijednostima). No, osim promjena u i na domaćinu, glavni čimbenici koji gljivici omogućuju prijelaz iz komenzalizma u invazivni oblik prikazani su na slici 6.



**Slika 6.** Shematski prikaz utjecaja virulentnih čimbenika vrste *C. albicans* koji pridonose oštećenju stanica domaćina. Adherencija (A) na stanice tkiva domaćina prvi je stupanj prelaska komenzala u invazivni oblik, prijelaz jednostanične blastospore vrste *C. albicans* u micelarni oblik (B) povećava virulentnost i penetraciju gljivice u tkiva domaćina. Vrsta *C. albicans* tvori hidrolitičke enzime iz skupine proteinaza, fosfolipaza, lipaza i hemolizine, ali vjerovatno i sekundarni lipofilni metabolit niske molekularne mase gliotoksin koji oštećuju stanične strukture domaćina i stanice imunog sustava (C). Nakon oštećenja stanica domaćina, blastospore i hife vrste *C. albicans* slobodno penetriraju kroz stanice domaćina, a invazivnosti vrste *C. albicans* pridonose i različita rizična fiziološka stanja pacijenta, kao i ostali rizični čimbenici (D).

### a) Polimorfizam – prijelaz iz jednostaničnog oblika blastospore u micelarni oblik stvaranjem pseudohifa i pravih hifa

Vrsta *C. albicans* pripada kvascima sličnim gljivicama koji posjeduju sposobnost reverzibilnog mijenjanja oblika, odnosno, pod određenim uvjetima okoliša (čimbenici u serumu, temperatura, pH, povišena koncentracija CO<sub>2</sub> i hrane) prelaze iz jednostanične blastospore u pseudomicelarni oblik rasta te u oblik rasta s pravim, septiranim hifama i razvitkom micelija (15). Ova se pojava, karakteristična za vrste *C. albicans* ali i *C. dubliniensis* naziva polimorfizam. Smatra se da su vrste *C. albicans* i *C. dubliniensis* u obliku jednostanične blastospore vezane za komenzalni način života, odnosno za kolonizaciju, a micelarni je oblik vezan za invazivni oblik kada vrste *C.*

*albicans* i *C. dubliniensis* prodiru u i kroz tkivo, iako je i na mjestu mikroza utvrđena prisutnost i blastospora i hifa (23, 24). Tvorba (pseudo)hifa omogućuje jaču adheziju na stanice domaćina, za razliku od blastospora, kao i izraženiju lizu makrofaga (25), tvorbu enzima proteinaza, i promjenu osjetljivosti na antimikotike (24, 26, 27). Invazivnost dva soja *C. albicans* uspoređivana je na primjeru peritonitisa u BALB/c miševa te je utvrđena korelacija, odnosno statistički značajnije oštećenje tkiva jetre i gušterače (utvrđeno histopatološki i mjerenjem oštećenja organa putem alkalne fosfataze i  $\alpha$ -amilaze) u soju kojemu je utvrđena duža germinacija blastospore i duža pseudohifa (28).

Zanimljivo je da dimorfizam, odnosno prijelaz iz jednostaničnog oblika (blastospore) u micelarni oblik (hife), nije nužan u patogenezi nekih vrsta gljivica kao što su: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei* i *Sporotrix schenckii* (22).

### **b) Tvorba hemolizina i hidrolitičkih enzima proteinaza, fosfolipaza i lipaza**

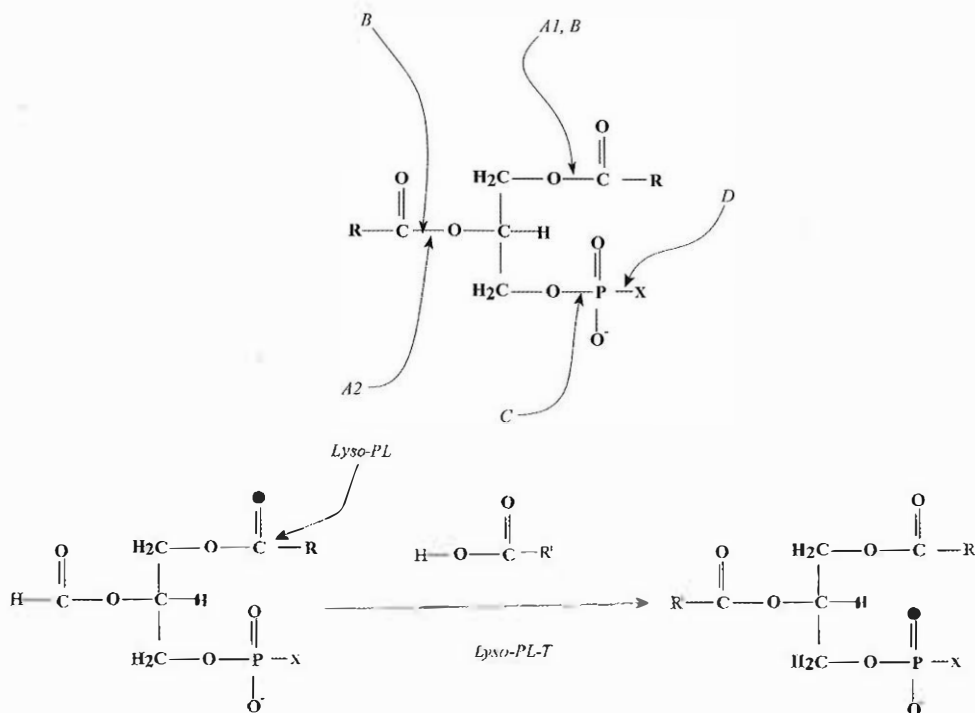
Patogene gljivice su prilagodile biokemijsku aktivnost tijekom infekcije da bi mogle upotrebljavati supstrat za rast i razvoj. Prodor u tkiva domaćina nužno uključuje penetraciju gljivice *C. albicans* s oštećenjem staničnih membrana ili stanica i tvari imunog sustava domaćina kako bi izbjegle njihov antimikrobni učinak. Vanjska membrana stanica čovjeka građena je od fluidnog fosfolipidnog dvosloja u koji su uključeni proteini. Lučeći proteolitičke enzime koji hidroliziraju peptidne veze i fosfolipaze, enzime koji hidroliziraju fosfolipide, dolazi do prodiranja vrste *C. albicans* kroz tako oštećenu membranu, odnosno stanicu. Najznačajnije su tri skupine izvanstaničnih hidrolitičkih enzima u *Candida* vrsta: aspartil-proteinaze (Sap), fosfolipaze B i lipaze.

Tvorba aspartil-proteinaza (Sap) odnosno prisutnost Sap-obitelji gena, dokazana je u vrstama *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* i *C. parapsilosis*. Opisane su aspartil-proteinaze vrsta *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, a njihovi inhibitori ispitivani su kao potencijalni lijekovi (30). Aspartil-proteinaze jedina su skupina proteinaza koje su identificirane u *Candida* vrsta, dok tvorba serin-proteinaza, cistein-proteinaza i metaloproteinaze nije utvrđena.

U *in vitro* uvjetima, tvorba aspartil-proteinaza može se kvalitativno i kvantitativno izmjeriti u hranjivim podlogama, koje se sastoje od proteina kao što su albumin, hemoglobin, keratin i kolagen, kao jedini izvor(i) dušika. Povezanost između tvorbe proteinaza, ekspresije aspartil-proteinaza (Sap-ova) i invazivnosti kandida, utvrđena je biokemijskim, genetičkim i imunokemijskim metodama. Utvrđeno je da (najmanje) devet Sap gena (Sap 1–9) sudjeluju u ekspresiji ovih enzima (31). Sap-ovi imaju specifičnost prema velikom broju supstrata te hidroliziraju konjugirane i nekonjugirane proteine. Sap-ovi koje luče kandidate hidroliziraju *in vivo* kolagen, keratin, mucin, anti-tijela i citokine te na taj način sudjeluju kao čimbenici virulencije vrsta roda *Candida*.

(32). Osim proteinaza kao čimbenika virulencije u nekih vrsta roda *Candida*, ovi enzimi imaju ulogu u biotipizaciji vrste *C. albicans*, gdje se na desetak testova ispituje tvorba enzima s obzirom na supstrat (33).

Pod fosfolipazama smatramo heterogenu skupinu enzima kojima je zajednička osobina hidroliziranje jedne ili više esterskih veza u glicerofosfolipidima. Prema mjestima djelovanja na molekuli fosfolipida kao supstrata, razlikujemo enzime koje označavamo slovim A, B, C i D. Tako fosfolipaza A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>, EC 3.1.1.32) hidrolizira estersku vezu na položaju *sn*-1 u glicerolnoj strukturi, a fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4) omogućava hidrolizu masne kiseline u položaju *sn*-2. Fosfolipaze B (PLB, sinonimi lizofosfolipaze, lizofosfolipaze-transacilaze) označavaju enzime koji hidroliziraju masne kiseline u položaju i *sn*-1 i *sn*-2. Pod nazivom lizofosfolipaze (lizo-PL, EC 3.1.1.5) smatraju se enzimi koji hidroliziraju masne kiseline s fosfolipida i lizofosfolipida, a enzym lizofosfolipaza-transacilaza ima sposobnost pretvorbe lizofosfolipida i slobodne masne kiseline u fosfolipid. Fosfolipaza C (PLC, EC 3.1.1.5) hidrolizira fosfodietersku vezu u fosfolipidnoj strukturi do 1,2-diacilglicerola i, ovisno o vrsti fosfolipida, do fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina. Drugu fosfodietersku vezu razgrađuje fosfolipaza D (PLD, EC 3.1.4.4). Slika 7. prikazuje mjesta djelovanja enzima fosfolipaza.

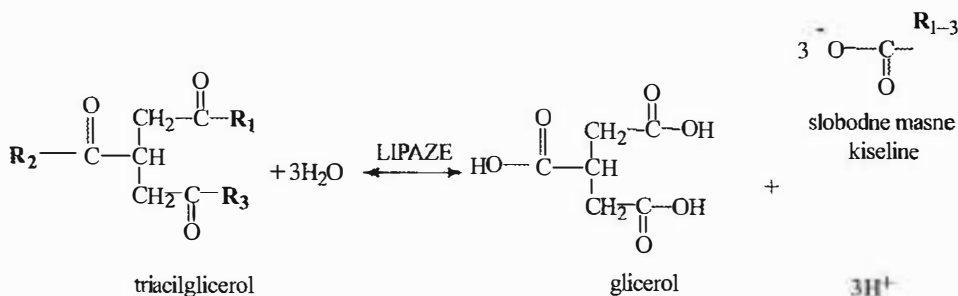


**Slika 7.** Mjesta hidrolitičkog djelovanja enzima fosfolipaza na molekulama fosfolipida stanične membrane

Tvorba fosfolipaza je također čimbenik virulencije u bakterijskih vrsta *Clostridium perfringens* (PLC ili  $\alpha$ -toksin), *Listeria monocytogenes* (PLC-a, PLC-b), *Pseudomonas aeruginosa* (PLC-n, PLC-h), *Bacillus cereus* (PLC), *Rickettsia rickettsii* i *R. prowazekii* (PLA), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (PLD), gljivice *Cryptococcus neoformans* (PLB), ali i protozoama *Toxoplasma gondii* i *Entamoeba histolytica* (PLA) (34–37).

Da su enzimi fosfolipaze jedan od čimbenika virulencije u *Candida* vrsta utvrđeno je izolacijom vrste *C. albicans* iz krvi pacijenata s fungemijom i usporedbom tvorbe fosfolipaza sa sojevima izoliranim iz rana i urina. Utvrđena je značajno viša tvorba fosfolipaza u sojeva izoliranih iz krvi, za razliku od sojeva iz rana i urina (38). Iste rezultate utvrdili su Ibrahim i suradnici (39), uspoređujući komenzalne izolate *C. albicans* i izolate iz krvi. Non-*albicans* *Candida* vrste (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*) tvore fosfolipaze u manjoj koncentraciji (ali ipak detektibilnoj) i ovisno o ispitivanom soju (40). Međutim, osim izravnog citolitičkog učinka fosfolipaza, utvrđen je posredan citolitički učinak preko PLC-a aktivacijom arahidonske kiseline i proteinaza-C kaskadnih reakcija (41). Fosfolipaze su i antigeni. Naime, u serumu pacijenta s fungemijom uzrokovanom vrstom *C. albicans* dokazana su antitijela protiv PLB, a čiji titar korelira s progresijom bolesti (42).

Enzimi koji kataliziraju i hidrolizu esterske veze u triacilglicerolima nazivaju se lipaze (EC 3.1.1.3) (slika 8). Lipaze su skupine enzima za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u patogenezi infekcija uzrokovanih oportunističkim bakterijama vrsta *Staphylococcus epidermidis* i *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes* i gljivičnih vrsta iz roda *Candida* i *Malassezia* i vrste *Hortaea werneckii* (43). Uloga je lipaza pretpostavljeni virulentni čimbenik vrste *C. albicans* zbog velike uloge lipida (kao supstrata za djelovanje lipaza) u ljudskom metabolizmu. Osim pohrane energije u lipidima, oni su strukturni čimbenici staničnih membrana i važni su biološki efektorji. Međutim, razgradni su produkti lipida diacilgliceroli i slobodne masne kiseline, biološki aktivni spojevi, odnosno reguliraju svingomijelinski ciklus, transdukciju hormonalnih signala i mogu regulirati transkripciju gena. Neki razgradni produkti lipida imaju učinak na imuni sustav inhibirajući proliferaciju T-limfocita. Utvrđeno je i da lipaze smanjuju fagocitozu granulocita i smanjuju kemotaksiju neutrofila i granulocita (43).

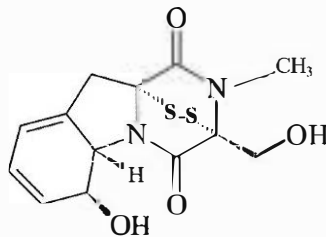


Slika 8. Hidroliza triacilglicerola katalizirane enzimima lipazama

No, kada se vrste roda *Candida* diseminiraju s primarnog mjesta infekcije te dospiju u krvotok, da bi preživjele moraju upotrijebiti željezo kao nužan čimbenik rasta i razmnožavanja. U tijelu ne postoji slobodno željezo, već se nalazi u vezanom unutrastaničnom obliku kao feritin ili je vezano na hemoglobin. Vrlo malo izvanstaničnog željeza vezano je na željezo-vezujuće transportne proteine transferin i laktoferin. Međutim, da bi dospjele do željeza, vrste roda *Candida* trebaju tvorbe hemolizine, koji oslobađaju željezo iz hemoglobina. *In vitro* je dokazana tvorba hemolizina, odnosno posljedične  $\beta$ -hemolize u podlozi s ovčjom krvi, u mikroaerofilnim uvjetima i pri prelasku blastospora vrste *C. albicans* u micelarni oblik. Također je utvrđeno da se hemolizini oslobađaju u tekućoj hranjivoj podlozi s kulturom vrste *C. albicans* te da supernatant 24-satne kulture (bez blastospora) uzrokuje  $\beta$ -hemolizu na hranjivoj podlozi s ovčjom krvi (44, 45). Luo i suradnici (45) utvrdili su da svi ispitivani sojevi vrste *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. zeylanoides* tvore hemolizine koji potpuno razgrađuju hemoglobin i uzrokuju tzv.  $\beta$ -hemolizu različitog inteziteta. Vrste *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* i *C. utilis* nepotpuno su razgrađivale hemoglobin, uzrokujući tzv.  $\alpha$ -hemolizu na hranjivoj podlozi s ovčjom krvi. U vrsta *C. parapsilosis* i *C. pelliculosa* nije utvrđena aktivnost hemolizina.

### c) Tvorba toksičnih metabolita niske molekularne mase

Tvorba sekundarnog i lipofilnog, gliotoksinu -sličnog metabolita dokazana je 1991., u vrsti *C. albicans*. Naime, još 1936. dokazana je tvorba gliotoksina u plijesni vrsta roda *Gliocladium* i kasnije *Aspergillus* i *Penicillium* (46), ali i prije dokaza tvorbe gliotoksina pretpostavljalo se da vrsta *C. albicans* tvori metabolit s baktericidnim učinkom na uzročnika gonoreje – *Neisseria gonorrhoeae*, ali tada se nije utvrdila kemijska struktura. Radovima Shah i Larsena (47, 48) pretpostavljeno je da u *in vitro* uvjetima klinički izolati tvore metabolit niske molekularne mase, koji je pretpostavljen kao gliotoksin, međutim bez potvrde strukture izolirane supstancije masenom spektrometrijom. Nadalje, ispitan je i vaginalni sekret žena sa simptomatskom kandidijazom te je utvrđeno da *C. albicans* tvori gliotoksinu sličnu susptanciju u koncentracijama od 7 do 11,5  $\mu\text{g/mL}$ , za razliku od asimptomatskih žena u kojih nije dokazana tvorba tog toksina *in situ* (48).



slika 9. Kemijska formula gliotoksina



Također je tvorba gliotoksina (slika 9) dokazana *in situ* na mjestu aspergiloze pluća purana uzrokovanog vrstom *Aspergillus fumigatus* (49, 50), te u peritoneumu miša inficiranog istom plijesni (51). Najnoviji podaci govore u prilog utjecaju ovog toksina na patogenezu mikoza, jer je dokazana tvorba gliotoksina *in vivo*, u serumu pacijenta oboljelog od invazivne aspergiloze (52).

Zašto je *in situ* tvorba gliotoksina ili drugih toksičnih metabolita niske molekularne mase pretpostavljeni virulentni čimbenik vrste *C. albicans*, odnosno kako ti toksini pridonose patogenezi kandidijaze? Prije svega, gliotoksin ima dokazan baktericidni i fungicidni učinak, te će sprječavati rast zaštitne flore, npr. djelovat će baktericidno na vrste roda *Lactobacillus* u rodnici ili aerobnoj i anaerobnoj floricirijeva. Gliotoksin usporava i pokretljivost cilija epitela bronha (53). Nadalje, gliotoksin pokazuje citotoksična svojstva najjače izražena na stanice imunog sustava. Osim toga, ovaj toksin sprječava adherenciju makrofaga na plastično dno posude i fagocitozu *in vitro* u koncentracijama od 20 do 50 ng/mL (54). Gliotoksin inhibira proliferaciju T-limfocita i B-limfocita nakon stimulacije antigenom i inhibira učinkovitost citotoksičnih T-limfocita. Nadalje, gliotoksin inhibira fagocitozu peritonealnih makrofaga (55) te smanjuje kemotaksiju polimorfonuklearnih neutrofila. U koncentraciji od 0,3 do 3  $\mu$ M gliotoksin izaziva apoptozu timocita i makrofaga, a u koncentracijama većim od 10  $\mu$ M njihovu nekrozu (55). Zanimljiva je selektivna toksičnost gliotoksina i kemijski sintetiziranih analoga na stanice imunog sustava, što se danas nastoji primijeniti protiv odbacivanja presađenih organa (55–57). Smatra se da će tvorba metabolita niske molekularne mase na mjestu mikoze uvjetovati veću invazivnost gljivica te pridonijeti patogenezi mikoze (58–60).

## ZAKLJUČAK

Vrste roda *Candida* komenzalna su mikroflora čovjeka i životinja. Kolonizacija ovim gljivicama dolazi ubrzo nakon rođenja, kada uz druge mikroorganizme sudjeluju u stvaranju stalne ili povremene mikrobne flore usne šupljine, gastro-intestinalnog sustava, kože i rodnice u žena. No, uslijed određenih čimbenika domaćina, kao što je primjena širokospektralnih antibiotika i kortikosteroida, stresova (fizičkih, kemijskih i emotivnih), trauma i opekotina komenzalne gljivice prelaze u patogeni (invazivni) oblik, uzrokujući mikoze, koje se manifestiraju od infekcija sluznica i kože do fungemije. Epidemiološki podaci govore o povećanju kandidijaza u imunokompromitiranih hospitaliziranih pacijenata, prvenstveno uslijed hematoloških i malignih bolesti drugih organa, side, kod presađaka i imunosupresivne terapije. Osim čimbenika domaćina, postoje i drugi nedovoljno objašnjeni činitelji koji uvjetuju prelazak kandida u invazivni oblik. Najčešći je izolat kandidemija gljivična vrsta *Candida albicans*. Vjeruje se da su polimorfizam, kao i tvorba fosfolipaza, lipaza, hemolizina, proteinaza i metabolita niske molekularne mase u okolno tkivo, čimbenici koji pridonose invazivnosti vrste *C. albicans*, odnosno razvoju kandidijaze. Utvrđivanje *in vivo* tvorbe, kao i bioloških učinaka navedenih metabolita, pomogao bi u razjašnjenju nastanka kandidijaze. Osim antimikotika, pronalazak lijekova koji inhibiraju tvorbu virulentnih čimbenika vrsta roda *Candida*, također bi pridonijeli smanjenju incidencije ovih mikoza.

## Virulence factors of yeast *Candida albicans*

by I. Kosalec, S. Pepeljnjak, B. Matica, N. Jarža-Davila

### S u m m a r y

Infections caused by yeasts of *Candida* species, ranging from mucocutaneous diseases to fatal systemic episodes, mainly observed in immunocompromised patients, have increased in prevalence world-wide. The yeasts of *Candida* species are example of a highly successful opportunistic fungal pathogen. Following local or systematic changes in immune function and other protective factors of the host, *Candida* yeasts becomes a pathogen. Most of candidal mycoses are caused by the dimorphic yeast *C. albicans*, but other non-*albicans* species are emerging. Some of them are resistant to antifungals. Because of recognised clinical importance researches has to find mechanism of *Candida* pathogenicity and its virulence factors. In this review we show virulence factors of *C. albicans* and some non-*albicans* *Candida* spp. The role of virulence factors in the pathogenesis include secreted hydrolytic enzymes proteinases, phospholipases, lipases and hemolysins. The influence of polymorphism, phenotypic switching and production of cytotoxic low-molecular-weight metabolites (such as gliotoxin-like metabolite) are also showed. Some of this virulence factors represent good targets for novel antifungal substances.

### Literatura – References

1. S. Diezmann, C.J. Cox, G.Schönian, R.J. Vilgalys, T.G. Mitchell, J. Clin. Microbiol. **42** (2004) 5624-5635.
2. K. Yokoyama, S.K. Biswas, M. Miyaji, K. Nishimura, J. Clin. Microbiol. **38** (2000) 4503-4510.
3. P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Staplers (Ed.), Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 9th Ed, CABI Publishing, 2001.
4. G.S. deHoog, J. Guarro (Ed.), Atlas of clinical fungi, Baard-Delft:Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
5. T.L. Highley, H.S.A. Padmanabha, C.R. Howell, Mat. Org. **31** (1997) 157-166.
6. L.E. Hanson, C.R. Howell, Phytopathol. **90** (2000) S34.
7. B.J.B. Wood, Oriental food uses of *Aspergillus*. U.: The British Mycological symposium series No. 1 Genetics and physiology of *Aspergillus*. J.E. Smith, J.A. Pateman (Ed.) London, Academic Press, 1977.
8. K.C. Hazen, Clin. Microbiol. Reviews **8** (1995) 462-478.
9. S.K. Mishra, E. Segal, E. Gunter, V.P. Kurup, J. Mishra, P.S. Murali, D.L. Pierson, H. Sandovsky-Losica, D.A. Stevens, J. Med. Vet. Mycol. **32** (Suppl. 1) (1994) 379-406.
10. S.K. Fridkin, W.R. Jarvis, Clin. Microbiol. Reviews **9** (1996) 499-511.
11. V. Krcmery, A.J. Barnes, J. Hospit. Infect. **50** (2002) 243-260.
12. C.E. Musial, F.R. Cockerill, G.D. Roberts, Clin. Microbiol. Rev. **1** (1988) 349-364.

13. F.C. Odds, *Candida* and candidosis, 2nd Ed., Bailliére-Tindall, London, 1988.
14. D.J. Sullivan, T.J. Westenberg, K.A. Haynes, D.E. Bennet, D.C. Coleman, *Microbiology* **141** (1995) 1507–1521.
15. B. Matica, I. Kosalec, A. Mlinarić-Džepina, N. Jarža-Davila, J. Granić, T. Marijan, T. Maretić, S. Pepeljnjak, *Clinical Microbiol. Infect.* **11** (Suppl. 2) (2005) 712.
16. B. Matica, I. Kosalec, A. Mlinarić-Džepina, N. Jarža-Davila, T. Marijan, J. Granić, T. Maretić, S. Pepeljnjak, P. Senji, Brzo razlučivanje *Candida dubliniensis* od ostalih *Candida* spp., 7. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 18–20. 05. 2005, 48.
17. A. Casadevall, L. Pirofski, *Trends Microbiol.* **11** (2000) 157–158.
18. L. Pirofski, A. Casadevall, *Lancet* **2** (2002) 628–635.
19. P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover, R.C. Tenover (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Ed., ASM Press, Washington D.C.
20. R.A. Calderone, W.A. Fonzi, *Trends Microbiol.* **9** (2001) 327–335.
21. L.H. Hogan, B.S. Klein, S.M. Levitz, *Clin. Microbiol. Reviews* **9** (1996) 469–488.
22. N.A. Gow, *Curr. Top. Med. Mycol.* **8** (1997) 43–55.
23. K.C. Hazen, S.A. Howell, *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance, P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover, R.C. Tenover (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC, ASM Press, 2003, 1693–1711.
24. D.R. Soll, *Acta Trop.* **81** (2002) 101–110.
25. A.P. Mitchell, *Curr. Opin. Microbiol.* **1** (1998) 687–692.
26. D.R. Soll, R. Galask, S. Isley, T.V. Rao, D. Stone, J. Hicks, J. Schmid, K. Mac, C. Hanna, *J. Clin. Microbiol.* **27** (1989) 681–690.
27. V. Kaaren, S.A. Messer, M. Pfaller, S.R. Lockhart, J.T. Stapleton, J. Hellstein, D.R. Soll, *J. Clin. Microbiol.* **38** (2000) 3595–3607.
28. M. Kretschmar, B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schröder, H. Hof, A. Nichterlein, *Infect Immun.* **67** (1999) 6637–6642.
29. F.C. Odds, R.A. Calderone, B. Hube, C. Nombela, *ASM News* **69** (2003) 54–55.
30. J. Dostál, P. Hamal, L. Pavličková, M. Souček, T. Ruml, I. Pichová, O. Hrušková-Heidingsfeldová, *J. Clin. Microbiol.* **41** (2003) 712–716.
31. A. Koelsch, J. Tang, J.A. Loy, M. Monod, K. Jackson, S.I. Foundling, X. Lin, *Biochim. Biophys. Acta* **1480** (2000) 117–131.
32. F. De Bernardis, P. Sullivan, A. Cassone, *Medical Mycol.* **39** (2001) 303–313.
33. F.C. Odds, A.B. Abbott, *Sabouraudia* **18** (1980) 301–317.
34. M.F. Price, R.A. Cawson, *Sabouraudia* **15** (1977) 179–185.
35. M.I. Williamson, L.P. Samaranyake, T.W. MacFarlane, *J. Med. Vet. Mycol.* **24** (1986) 415–417.
36. M.A. Ghannoum, *Clin. Microbiol. Reviews* **13** (2000) 122–143.
37. N. Ivanovska, *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **22** (2003) 357–361.
38. M.F. Price, I.D. Wilkinson, L.O. Gentry, *Sabouraudia* **20** (1982) 7–14.
39. A.S. Ibrahim, F. Mirbod, S.G. Filler, Y. Banno, G.T. Cole, Y. Kitajima, J.E. Edwards, Y. Nozawa, M.A. Ghannoum, *Infect Immun.* **63** (1995) 1993–1998.

40. S. Cheng, M.H. Nguyen, Z. Zhang, H. Jia, M. Handfield, J. D. Hillman, A. Progul-ske-Fox, C.J. Clancy, *Infect. Immun.* **71** (2003) 6101–6003.
41. J.G. Songer, *Trends Microbiol.* **5** (1997) 156–161.
42. J.P. Martinez, M.L. Gil, J.L. Lopez-Ribot, W.L. Chaffin, *Clin. Microbiol. Rev.* **11** (1998) 121–141.
43. F. Stehr, A. Felk, A. Gácsér, M. Krestchmar, B. Mähns, K. Neuber, B. Hube, W. Schäfer, *FEMS Yeast Res.* **4** (2004) 401–408.
44. J.M. Manns, D.M. Mosser, H.R. Buckley, *Infect. Immun.* **62** (1994) 5154–5 156.
45. G. Luo, L.P. Samaranyake, J.Y.Y. Yau, *J. Clin. Microbiol.* **39** (2001) 2971–2974.
46. P. Waring, J. Beaver, *Gen. Pharmac.* **27** (1996) 1311–1316.
47. D.T. Shah, B. Larsen, *Mycopathologia* **116** (1991) 203–208.
48. D.T. Shah, D.D. Glover, B. Laresn, *Gynecol. Obstet. Invest.* **39** (1995) 67–69.
49. J.L. Richard, M.C. DeBey, *Mycopathologia* **129** (1995) 111–115.
50. J.L. Richard, T.J. Dvorak, P.F. Ross, *Mycopathologia* **134** (1996) 167–170.
51. R.D. Eichner, P. Waring, A.M. Geue, A.W. Braithwaite, A. Müllbacher, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 3772–3777.
52. R.E. Lewis, J. Chi, N.P. Wiederhold, D.P. Kontoyiannis, X. Han, R.A. Prince, De-tection of gliotoxin, an immunologically-active metabolite secreted by *Aspergillus fumigatus*, in animals and humans with invasive aspergillosis (IA), *Book of Abstracts 43rd ICAAC*, Chicago, 14–17. 09. 2003.
53. R. Amitani, G. Taylor, E.N. Elezis, C. Llewellyn-Jones, J. Mitchell, F. Kuze, P.J. Cole, R. Wilson, *Infect. Immun.* **63** (1995) 3266–3271.
54. A. Müllbacher, P. Waring, R.D. Eichner, *J. Gen. Microbiol.* **131** (1985) 1251–1258.
55. P. Sutton, N.R. Newcombe, P. Waring, A. Müllbacher, *Infect. Immun.* **62** (1994) 1192–1198.
56. P. Waring, R.D. Eichner, A. Müllbacher, *Med. Res. Reviews* **8** (1988) 499–524.
57. P. Waring, A. Müllbacher, *Endeavour* **16** (1992) 14–16.
58. I. Kosalec, S. Pepeljnjak, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **55** (2004) 313–320.
59. I. Kosalec, S. Pepeljnjak, Toksinogenost kliničkih izolata *Aspergillus* i *Candida* vr-sta, Prvi hrvatski znanstveni simpozij »Mikotoksini-klinički aspekti i prevenci-ja«, Zagreb, 10.12.2004.
60. I. Kosalec, S. Pepeljnjak, M. Delaforge, O. Puel, P. Galtier, Possible toxicity of clini-cal isolates of *Candida albicans*, Treći hrvatski mikrobiološki kongres s međuna-rodnom sudjelovanjem, Poreč, 4–7. 10. 2005.

Primljeno 8.06.2005.