

DOKUDA KİTİN VARLIĞI İLE MANTAR İNFEKSİYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN HAYVAN MODELLERİNDE GÖSTERİLMESİ

THE DEMONSTRATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CHITIN LEVELS IN TISSUE SAMPLES AND FUNGAL INFECTIONS IN ANIMAL MODELS

Semra KUŞTİMUR, Sibel AYDOĞAN, Ayşe KALKANCI, Elife BERK, Burçe YALÇIN, Sezen BOLAT

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Anahtar Sözcükler: Kitin, hayvan modeli, kandidoz, aspergilloz

Keywords: Chitin, animal model, candidosis, aspergillosis

Geliş: 29 Ocak 2008

Kabul: 29 Şubat 2008

ÖZET

Hücre duvarının ana içeriklerinden biri olan kitin ($C_8H_{13}O_5N$)_n, mantar infeksiyonu gelişen dokularda dağılmaktadır. Kitinin sayısal olarak ölçümü mantar yükünü göstermektedir. Bu çalışmada, akciğer aspergillozu ve sistemik kandidoz oluşturulan iki ayrı hayvan modelinde, dokudaki kitin varlığının sayısal olarak gösterilmesi, diğer infeksiyon göstergeleri ile bu değerlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. İnfeksiyon varlığı; doku örneklerinin kültürü, dokuda histopatolojik olarak mantar elemanlarının gösterilmesi ve kan örneklerinde RealTime-PCR yapılması ile doğrulanmıştır. Kitin ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmıştır. *Aspergillus* ile infekte akciğer dokusunda ortalama optik dansite değeri 0.373 iken, *Candida* ile infekte hayvanın böbrek dokusunda ortalama 0.492 olarak ölçülmüştür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Bu çalışma sonucunda, kitinin aspergillozlu akciğerlerde kandidozlu böbreklerden daha az dağıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, kitin varlığı kandidozda kültür, patoloji ve PCR sonuçları ile uyumlu; aspergillozda ise kültür ve patoloji ile uyumlu, ancak PCR ile kısmen uyumlu bulunmuştur.

SUMMARY

An essential component of the fungal cell wall is chitin ($C_8H_{13}O_5N$)_n which is distributed in infected tissues. Quantitative determination of the chitin shows the fungal burden in the tissues. The purpose of this study was to determine the chitin levels in tissues of animal models with aspergillosis and candidosis, with the comparison of these levels with other infection signs. The presence of the infection was confirmed by using culture and pathology in tissue sections whereas RealTime – PCR in blood samples. The quantification of the chitin was done spectrophotometrically. Mean optical densities of the tissue extracts with aspergillosis was 0.373 while it was 0.492 with candidosis. The difference was statistically significant ($p<0.05$). As a result of our study, it was found that chitin is less distributed in the tissues with aspergillosis than those with candidosis. Otherwise, the presence of chitin was found to be well correlated with culture and pathology results in candidosis and aspergillosis. But the presence of chitin was found to be well correlated with PCR results in candidosis, but not in aspergillosis.

GİRİŞ

Mantarlarda hücre duvarının yapısal elemanlarından biri olan kitin, infeksiyon sırasında dokuda dağılmaktadır (1). Hücre duvarının diğer yapısal elemanları olan galaktomannan ve glukun da dokuda ve infekte konağın serumunda dağılmaktadır (2). Galaktomannan ve glukun dü-

zeyleri buldukları yerlerde ölçülebilmektedir. Bu iki polisakkaridin ölçülmesi için geliştirilmiş hazır ticari kitler bulunmaktadır. Bu kitler infeksiyonun varlığının gösterilmesinde kullanılmaktadır (3, 4). Kitinin dokuda ölçülmesi ise, yeni bir yöntem olmamakla birlikte, diğer polisakkaritler gibi infeksiyon tanısında kullanılmamaktadır. Bu

Tablo 1. *Aspergillus* ve *Candida* PCR için kullanılan primer ve prob dizileri (6).

Hedef	Primer veya prob dizisi
β-actin (F)	5'-TGG AGA AGA GCT ATG AGC TGC CTG-3
β-actin (R)	5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG TTG-3
Panfungal primer (18SrRNA geni)	5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG (F) 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG (R)
<i>Aspergillus</i> 640 florofor prob	5'-TGA GGT TCC CCA GAA GGA AAG GTC CAG C
<i>Aspergillus</i> floresan prob	5'-GTT CCC CCC ACA GCC AGT GAA GGC
<i>Candida</i> 640 florofor prob	5'-TGG CGA ACC AGG ACT TTT ACT TTG
<i>Candida</i> floresan prob	5'-AGC CTT TCC TTC TGG GTA GCC ATT

güne kadar yapılmış olan çalışmalarda, kitin düzeyi daha çok hayvan modellerindeki infeksiyonunun şiddetinin gösterilmesinde ve antifungal tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmıştır (5, 6).

Bu çalışmada, küf ve maya mantarları ile oluşturulan iki ayrı infeksiyon modelinde, infekte dokuda kitin varlığının sayısal olarak gösterilmesi, diğer infeksiyon göstergeleri ile bu değerlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan modelleri: Deney hayvanı olarak 200-250 gram ağırlığında, dişi, *Wistar albino* sıçanlar kullanılmıştır. Bütün hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile yapılmıştır. Her kafeste 4-5 tane sıçan olacak şekilde, 12/12-saat aydınlık/karanlık uygulanmış, oda ısısı 20- 25^o C'de tutulmuştur. Deneklerin gıda ve suya kolay ve eşit ulaşımı sağlanmıştır.

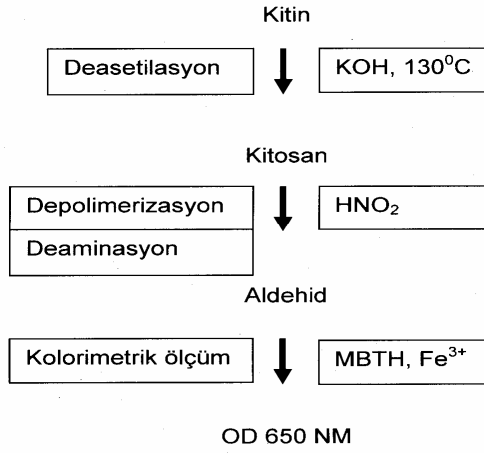
Grupların dağılımı: Sekiz denek sağlıklı kontrol grubu olarak, 35 denek akciğer aspergilloz grubu olarak, 22 denek kandidoz grubu olan ayrılmıştır. İnfeksiyon öncesi hayvanlarda 10 mg 5-florourasil ile nötropeni oluşturulmuştur. Nötropenin beşinci gününde, akciğer aspergillozu için 10⁶/ml konidyum içeren PBS-0.1% Tween 20 karışımı solunum yolundan uygulanmıştır. Sistemik kandidoz için, 10⁶/ml maya içeren %0.9 NaCl karışımı, kuyruk veninden uygulanmıştır. Bütün deneklere 30 mg/kg teikoplanin (5x1 IM) ve siprofloksazin 660 mg/L (içme suyundan) ile antibakteriyel profilaksi uygulanmıştır. Mikro-organizma inokülasyonunun beşinci günü, IM yoldan ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (8 mg/kg) anestezisi altında deney sonlandırılmıştır.

Dokuda infeksiyonun gösterilmesi: Deneklerde infeksiyonun gösterilmesi için, aspergilloz grubundaki hayvanlardan akciğer ve kan örnekleri, kandidoz grubundaki hayvanlardan böbrek ve kan örnekleri alınmıştır. Bütün

dokularda histopatolojik inceleme, kültür ve moleküler yöntemler ile infeksiyon tanısı doğrulanmıştır. Deney koşulları iki kez tekrar edilmiştir. Benzer sonuçlar alındığı için, bir deneyin sonuçları sunulmuştur.

Real Time PCR: *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* ile infekte edilmiş sıçanların kan örneklerinden nükleik asit eldesi için Heliosis DNA izolasyon sistemi (Metis Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Elde edilen DNA'lar *A. fumigatus* ve *C. albicans* için seçilen hedefleri çoğaltmak üzere gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [Real Time PCR (LightCycler-Roche, ABD)] kullanılarak değerlendirilmiştir. 'Primer' ve floresans rezonans enerji transferi (FRET) için kullanan 'prob' dizileri Tablo 1'de verilmiştir. Dokuda DNA varlığının kontrolü için beta aktin geni 'housekeeping' gen olarak kullanılmıştır (7).

Akciğer dokusu ve böbrek dokusunda kitin ölçümü: Kitin içerdiği düşünülen infekte dokular, yoğun alkali ortamda ısıtıldığında kitosan oluşmaktadır. Oluşan kitosanın aldehit grupları ve HNO₂ ile oluşturduğu reaksiyon kolorimetrik olarak değerlendirilmiştir. Akciğer dokusu ve böbrek dokusunda kitin ölçümü için, dokular parçalanmış ve santrifüj edilmiştir. Sodyum lauril sulfat (%3 [wt/vol]) ile 100^o C'de 15 dk kaynatılmış, santrifüj edilmiş ve çökelek yıkanmıştır. Üzerine, KOH (%120 [wt/vol]) eklenmiş ve 130^o C'de 60 dk bekletilmiştir. Soğutma için, buzluktan alınan etanol (%75 [vol/vol]) üzerinde 15 dk tutulmuştur. Karışımın üzerine, Celite545 eklenmiş, santrifüj edildikten sonra, çökelek üzerine NaNO₂ (%5 [wt/vol]) ve KHSO₄ (%5 [wt/vol]) eklenerek 15 dk çalkalanmıştır. Santrifüj sonrası, üst sıvı amonyum sulfat (%12.5 [wt/vol]) ve 3-metil-2-tiazolon hidrazon HCl monohidrat ile 100^o C'de 3 dk kaynatılmıştır. Son olarak, FeCl₃-6H₂O (%0.83 [wt/vol]) eklenmiş ve renklenen karışımın optik dansitesi 650 nm'de okunmuştur (6,8). Glukozamin (10µg/ml) pozitif standart olarak kullanılmıştır. Yöntem Şekil 1'de tekrar özetlenmektedir.



Şekil 1. Kitin ölçümü (5, 7)

İstatistik: Sonuçların değerlendirilmesi için hesaplamalarda SPSS 10.0 bilgisayar programı kullanılmıştır. İstatistiksel karşılaştırmada non-parametrik testler olan olan dört gözlü düzende (2x2) Yates düzeltilmiş ki-kare (χ^2) testi ile Fisher kesin ki-kare testi; korelasyon analizi için ise Pearson korelasyon analizi testi kullanılmıştır. Eğer $p < 0.05$ ise sonuç anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Akciğer aspergillozu oluşturulan bütün hayvanların akciğer doku kültürlerinde *A. fumigatus* kolonileri izole edilmiş, patolojik olarak mantar elemanları gösterilmiş ve kandan PCR ile araştırılan *Aspergillus* DNA'sı, örneklerin %58'inde pozitif bulunmuştur. Akciğer aspergillozu oluşturulan 35 hayvandan 13 tanesi, kandidozlu 22 hayvandan da 10 tanesi, deney sırasında kaybedilmiştir. İlk ölümler de birinci günden itibaren başlamıştır. Kitin varlığı ve diğer infeksiyon değerlendirmeleri, beşinci günde sağ kalan 22 aspergillozlu, 12 kandidozlu denek üzerinden yapılmıştır.

Kandidozlu gruptaki bütün hayvanların böbrek dokularından yapılan kültürde *C. albicans* kolonileri izole edilmiş, patolojik olarak bütün dokularda maya hücreleri gösterilmiş ve kandan PCR ile bütün örneklerde *Candida* DNA'sı pozitif bulunmuştur. Sağlıklı, aspergillozlu ve kandidozlu hayvanlardan alınan doku örneklerinin her birinde, kitin miktarı ölçülmüş ve değerlerin ortalaması alınmıştır. Sağlıklı hayvanların böbrek dokusundaki ortalama optik dansite (OD) değeri 0.232, akciğer dokusunda ortalama OD 0.138 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$).

Aspergillus ile infekte akciğer dokusunda ortalama OD değeri 0.373 iken, *Candida* ile infekte hayvanın böbrek dokusunda ortalama 0.492 olarak ölçülmüştür ($p < 0.05$).

Kandidemili hayvanların böbrek dokusundaki kitin miktarının (0.492), aspergillozlu hayvanların akciğer dokusundaki kitin miktarından (0.373) daha fazla olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Buna göre çalışmanın iki sonucu bulunmaktadır; birincisi infeksiyon modellerinde dokuda kitinin dağıldığı gösterilmiştir, ikincisi de bu dağılım aspergillozlu akciğerlerde kandidozlu böbreklerden daha azdır. Bu çalışmada, kitin varlığının ve düzeyinin, kandidozda kültür, patoloji ve PCR sonuçları ile uyumlu olduğu, aradaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0.05$), aspergillozda ise kültür ve patoloji ile istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0.05$), ancak PCR ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür.

TARTIŞMA

Çalışmamız, dokuda kitin varlığının sayısal olarak gösterilmesi, iki farklı infeksiyon modelinde bu düzeylerin karşılaştırılması ve aradaki farkın klinik tablonun geliştiği doku ile ilişkilendirilmesi açısından, hastalığın tanısına katkı sağlayabilecektir. *Aspergillus* konidyumlarının solunum yolundan alınması sonrası, yerleşecekleri ilk organın akciğerler olması doğaldır. Damar yolundan verilen *Candida* hücreleri de, süzme organı böbreklere yerleşmektedir. Bu çalışmada, ayrıca dokular arasında, kitin düzeyi ile gösterilen mantar yükü açısından da fark olduğu görülmüştür. Akciğerlerde daha az, böbreklerde ise daha fazla yük saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Hayvan modelleri infeksiyonların gelişiminin ve patogenezinin gösterilmesinde, tanı yöntemlerinin karşılaştırılmasında, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (9). İnfeksiyon modellerinde aslında değerlendirilen ölçüt, mantar yüküdür. Mantar yükü, dokudaki mantar varlığının sayısal olarak gösterilmesi olarak açıklanabilir. Bazı araştırmacılar bu yükü göstermek için, doku örneğinin birim miktarında koloni oluşturan ünite sayısından (CFU) faydalanmışlardır (10). Hastalık sırasında yoğun olarak miçel oluşumu gelişiminden ve akciğerde geminasyonunu tamamlamamış konidyumların uzunca bir süre kalabilmesinden dolayı, CFU ölçülerine göre mantarın kantitasyonu, hastalığın şiddetini belirlemede iyi bir belirteç kabul edilmemektedir. Bu ölçüm, mantar yükü çok az olan modeller için yalancı negatiflik ile sonuçlanabilmektedir. Yerleşmiş olan infeksiyon etkeni mantarın, üretilebilmiş olması koşulu gerekmektedir. Üreme koşullarını, etkileyen bütün faktörler, bu ölçümü de olumsuz etkileyebilir.

Moleküler yöntemlerin gelişmesi sonrasında, kantitatif olarak mantarlara ait nükleik asitlerin ölçülmesi söz konusu olmuştur (11,12). Bu yöntem, standardize edildiği takdirde, çok hassas bir yöntem olarak kullanılabilir. Dokuda çok az mantar bulunması halinde bile, sayısal bir değer verilebilmektedir. Özellikle antifungal tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Ancak, mantar yükünün moleküler yöntemler ile gösterilmesi, gelişmiş laboratuvarlar için mümkündür. Üstelik, sayısal değerler alınması için standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. Çalışmamızda, mantar yükünü göstermenin yanında, kandan PCR ile mantar DNA'sı araştırılmıştır. Kandidozlu olguların tamamında PCR pozitif bulunmuş ancak, aspergillozlu olgularda sadece %58 oranında pozitif bulunmuştur. Bu durum, aspergillozun solunum yolunda sınırlı bir infeksiyon oluşturması ve kanda DNA dağılımının yetersizliği ile açıklanabilir. Ayrıca, DNA eldesi *Aspergillus* için, *Candida* için olduğundan daha zordur. Bir neden de, bu olabilir.

Akciğer aspergillozu oluşturulan deneklerde infeksiyonun gösterilmesi için birden fazla yöntem kullanılmıştır. Bunlardan biri de kan örneklerinde *Aspergillus* DNA'sının gösterilmesidir. Kanın seçilme nedeni, rutin tanıda daha çok kullanılmasıdır. Kan dışında, solunum yolundan bir örnek seçilmiş olsa idi, %58'lik düşük pozitiflik oranının yükselmesi mümkün olabilir idi. Ancak, bu çalışmanın temel amacı, moleküler yöntemler ile infeksiyonun gösterilmesi olmadığı için, farklı klinik örneklerin değeri karşılaştırılmamıştır.

Çalışmamızın konusu olan kitin ölçümü yöntemi ise, ilk olarak 1975 yılında, Lehmann ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kitin miktarı, kortizonun *A. fumigatus*'un böbreklere yerleşmesi üzerine etkisini incelemek amacıyla ölçülmüştür (8). Kitin ($C_6H_{13}O_5N$)_n, mantar hücre duvarının ana içeriklerinden biridir. Kitin yanında, duvarda mannopteinler, 1,3 β-glukan ile türlele bağlı olarak 1,6 β-glukan polimerleri bulunmaktadır. Kitin, N-asetilglukozamin artıklarına β-1,4 zinciriyle bağlı bir

homopolimerdir (13). Genel olarak maya hücre duvarının kuru ağırlığının sadece %1-2'sini kitin oluştururken, küf mantarları, hücre duvar kuru ağırlıklarının %10-30'una kadar yüksek düzeyde kitin içeriğine sahip olabilirler. Mayalar ve küflerin her ikisinde de kitin içeriği ile hücre duvarının mekanik sağlamlığı arasında belirgin ilişki vardır (14). Kitin sentezi bozulduğu zaman büyümekte olan hif erimeye başlar, hücrenin yapısı bozulur ve üzerinde baloncuklar gelişir. Bunun için, mantarın kütlesi ile uyumlu olan kitinin gösterilmesinin *in vivo* üremeye daha uygun olarak yansıtılabileceği söylenmiştir (15).

Çalışmamızda küf mantarı ile oluşan infeksiyonları aspergilloz, maya mantarları ile oluşanları ise kandidoz temsil etmektedir. Küf mantarlarının hücre duvarında daha fazla kitin bulunmasına rağmen, infekte dokuda kandidoz ile karşılaştırıldığında daha az kitin ölçülmüş olması şaşırtıcı bulunmuştur. Bu durum, deneklerin, infeksiyonun erken döneminde incelenmesi ile ilişkili olabilir. Bu durumu açıklayabilecek bir başka olasılık, iki infeksiyonun deneysel olarak farklı yollardan oluşturulmaları olabilir. Aspergilloz solunum yolundan ve doğal infeksiyon gelişimini taklit ederek oluşturulmuş, öte yandan kandidoz ise damar yolundan oluşturulmuştur. Kan dolaşımı ile verilen mantar hücresi, solunum yolu ile verileden çok daha fazla miktarda dokuya ulaşmış olabilir. Bu nedenle kandidozlu dokuda mantar yükü daha fazla ölçülmüş olabilir.

İnfeksiyon bölgesinde kitinin gösterilebilmesi ancak dokudan örnek alınması ile mümkündür. Bu nedenle doku örneklerinde kitin ölçümü rutin tanıda çok yararlı değildir. Daha çok deneysel modellerde veya post-mortem doku örneklerinde mantar yükünün gösterilmesi için kullanılmaktadır. Kitin ölçümünde, spektrofotometrik olarak OD ölçümü, Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) ve Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemleri kullanılmıştır (16,17). Gelecek çalışmalar, kitinin bir hastalık belirteci olarak, infekte hastaların serumlarında gösterilmesi üzerine yoğunlaşmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ram FJA, Arentshorst M, Damveld RA, van Kuyk PA, Klis FM, Hondel van den AMJJC. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiol* **2004**; 150: 3315-26.
2. Pazos C, Ponton J, Palacio AD. Contribution of (1→3)-β-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 299-305.
3. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioassays* **2006**; 28: 799-808.
4. Richardson M. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 56 (Suppl S1) : i5-i11.
5. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **2005**; 73: 494-503.

6. **Hayashi R, Kitamoto Nilizawa Y, Ichikawa T, et al.** Efficacy of TAK-457, a novel intravenous triazole, against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 283-7.
7. **Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al.** Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light Cycler system. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 586-90.
8. **Lehmann PF, White L.** Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect Immun* **1975**; 12: 987-92.
9. **Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Trasi SA, et al.** Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med Mycol* **2004**; 42: 417-25.
10. **Clemons KV, Stevens DA.** Animal models of *Aspergillus* infection in preclinical trials, diagnostics and pharmacodynamics: What can we learn from them? *Med Mycol* **2006**; 44: 119-26.
11. **Mekha N, Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A, Poonwan N.** Real-time PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis. *Microbiol Immunol* **2007**; 51: 633-5.
12. **Hizel K, Kokturk N, Kalkanci A, Ozturk C, Kustimur S, Tufan M.** Polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* **2004**; 47: 338-42.
13. **Kim SY, Shon DH, Lee KH.** Enzyme linked immunosorbent assay for detection chitoooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**; 64: 696-701.
14. **Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK.** Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **2007**; 6: 855-67.
15. **Hata K, Kimura J, Miki H, Toyosawa T, Moriyama M, Katsu K.** Efficacy of ER-30346, a novel oral triazole antifungal agent, in experimental models of aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 40: 2243-7.
16. **Wischke C, Borchert HH.** Increased sensitivity of chitosan determination by a dye binding method. *Carbohydrate Research* **2006**; 341: 2978-9.

İLETİŞİM

Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06500 Beşevler, ANKARA
e-posta: kustimur@gazi.edu.tr