

Czy aktywność hydrolityczna grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych od chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płucną (POChP) może zmieniać się z postępem choroby podstawowej?

Can hydrolytic activity of Candida strains isolated from COPD patients change with the basic disease progression?

HALINA BATURA-GABRYEL, BEATA BRAJER, BARBARA KUŹNAR,
WITOLD MŁYNARCZYK

Katedra i Klinika Ftyzjopneumonologii, Akademia Medyczna w Poznaniu,
kierownik Kliniki prof. AM dr hab. med. Witold Młynarczyk

Abstract

An increasing number of *Candida* infections has drawn attention to *Candida*'s pathogenic features. Fungi pathogenicity, including enzymatic activity, determines the course of infection. *Candida*'s hydrolytic exoenzymes play an important role in human mucosa membranes colonization by these fungi and also in their invasion. In Pulmonary Disease Clinics patients with COPD are especially susceptible to contracting *Candida* infection. In this group of patients (analogous to the assumed effect of bacteria which colonize bronchial tree), *Candida* existence may probably influence the basic disease progression for example through stimulation and supporting the chronic inflammatory process in COPD.

Aims: 1. Estimation and comparison of hydrolytic activity of *Candida* strains isolated from COPD patients and a healthy control group. 2. Looking for correlations between hydrolytic activity of *Candida* and the stage of COPD (FEV1).

Methods and materials: 53 patients with COPD and 14 healthy subjects from the control group took part in our study. We used their sputum induced by 4% NaCl solution. *Candida* strains were grown on Sabouraud's ground and identified using ID C 32 test (bioMérieux). The hydrolytic activity of 19

Streszczenie

Wprowadzenie. Coraz częstsze występowanie *Candida* w organizmie człowieka spowodowało większe zainteresowanie cechami ich patogenności. Patogenność grzyba, w tym aktywność enzymatyczna współdecyduje o przebiegu zakażenia. Egzozymy hydrolityczne *Candida* odgrywają istotną rolę w osiedlaniu się tych grzybów na błonach śluzowych człowieka, a także w dalszej ich inwazji. W Klinice Chorób Płuc do grupy ryzyka zakażenia *Candida* należą m.in. chorzy na POChP. W grupie tej (analogicznie do hipotetycznego wpływu bakterii znajdujących się w drogach oddechowych), występowanie *Candida* może prawdopodobnie mieć wpływ na przebieg choroby podstawowej, np. przez stymulowanie i podtrzymywanie przewlekłego procesu zapalnego charakterystycznego dla POChP.

Cel pracy: 1. Ocena i porównanie aktywności hydrolitycznej grzybów z rodzaju *Candida*, wyizolowanych z płwociny chorych na POChP oraz od grupy kontrolnej osób zdrowych; 2. Próba oceny aktywności hydrolitycznej *Candida* w zależności od stopnia zaawansowania POChP.

Materiał i metody. Badano płwocinę indukowaną 4% NaCl, pobraną od 53 chorych na POChP oraz od 14 osób

Adres do korespondencji: dr hab. med. Halina Batura-Gabryel, Klinika i Katedra Ftyzjopneumonologii, Akademia Medyczna, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań, tel. 0 (prefiks) 61 854 93 88, e-mail: margab@sol.put.poznan.pl

enzymes was estimated in nanomoles of hydrolyzed substrate using API ZYM semiquantitative test (bioMérieux). The stage of COPD was estimated according to the PTF criteria on the basis of spirometry (ABC Pneumo RS system).

Results: 1. *Candida* strains isolated from COPD patients showed the activity of 19 enzymes and those isolated from the control group of 18 from 19 hydrolytic enzymes (no α -fucosidase activity). 2. *Candida* strains isolated from COPD patients showed the highest activity of secretion enzymes such as leucine arylamidase (median 3.16) and esterase lipase (median 2.96); activity of α -fucosidase (median 0.15) and α -chymotrypsin (median 0.13) was the lowest. For *Candida* strains isolated from the control group, the activity of leucine arylamidase (median 3.64) and α -glucosidase (median 2.83) was the highest; the activity of trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase and α -mannosidase (median 0.7) - the lowest. A difference that is close to significant was observed in the activity for esterase lipase - $p=0.07$, α -mannosidase - $p=0.07$, α -galactosidase - $p=0.06$. These hydrolytic enzymes revealed a higher activity in COPD patients. 3. We noticed positive significant correlation between FEV1 and N-acetyl- β -glucosaminidase secretion ($p=0.04$; $r=+0.41$) in mild and moderate stages of COPD. In a group of patients with semi severe and severe COPD positive significant correlation between FEV1 and leucine arylamidase activity ($p=0.02$; $r=+0.49$) was observed; there was statistically negative significant correlation between FEV1 and β -glucuronidase ($p=0.02$; $r=-0.47$) and β -glucosidase ($p=0.03$; $r=-0.47$) activities.

Conclusion: 1) The strong hydrolytic activity of *Candida* strains isolated from COPD patients proves their considerable pathogenicity. 2) The activity of several enzymes of *Candida* is correlated with the stage of the basic disease. 3) The above facts start a discussion about a potential influence of *Candida* present in human airways on the pathogenesis and on the course of COPD progression.

Key words: COPD, *Candida*, hydrolases.

zdrowych. Szczepy *Candida* hodowano na podłożu Sabourauda i identyfikowano za pomocą testu ID C 32 (bioMérieux). Aktywność hydrolityczną określano w nanomolach hydroлизованego substratu, przy użyciu półilościowego testu API ZYM (firmy bioMérieux) zawierającego substraty do oceny 19 hydrolaz. Stopień zaawansowania POChP określano wg zaleceń PTF, na podstawie spirometrii wykonywanej aparatem ABC Pneumo RS.

Wyniki. 1) Szczepy *Candida* izolowane od chorych na POChP wykazywały aktywność wszystkich 19 ocenianych enzymów hydrolitycznych, natomiast izolowane od grupy kontrolnej wykazywały aktywność 18 enzymów (nie stwierdzono aktywności α -fukozydazy). 2) Dla szczepów izolowanych od chorych na POChP najsilniejsza była aktywność arylamidazy leucylowej (średnia 3,16) i lipazy esterazowej (średnia 2,96); najniższa α -fukozydazy (średnia 0,15) i α -chymotrypsyny (średnia 0,13). Dla szczepów izolowanych od osób zdrowych najsilniejsza była aktywność arylamidazy leucynowej (średnia 3,64) i α -glukozydazy (średnia 2,83); najniższa dla trypsyny, α -chymotrypsyny, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy i α -mannozydazy (średnia 0,7). Zbliżoną do znamiennej różnicę aktywności stwierdzono w przypadku lipazy esterazowej - $p=0,07$, α -mannozydazy - $p=0,07$, α -galaktozydazy - $p=0,06$. Enzymy te były silniej wydzielane u chorych na POChP. 3) Podczas analizy korelacji między wydzielaniem enzymów hydrolitycznych a stopniem zaawansowania POChP stwierdzono, że w grupie chorych z łagodną i umiarkowaną postacią POChP, ($FEV_1 \geq 50\%$ normy) istnieje znamienna statystycznie korelacja dodatnia między FEV_1 a wydzielaniem N-acetyl- β -glukozaminidazy ($p=0,04$; $r=+0,41$). W grupie chorych z postacią średnio ciężką i ciężką POChP ($FEV_1 < 50\%$ normy) zaobserwowano statystycznie istotną korelację dodatnią między FEV_1 a aktywnością arylamidazy leucynowej ($p=0,02$; $r=+0,49$); oraz istotną statystycznie korelację ujemną między FEV_1 a wydzielaniem β -glukuronidazy ($p=0,02$; $r=-0,47$) i β -glukozydazy ($p=0,03$; $r=-0,47$).

Wnioski. 1) Silna aktywność hydrolityczna szczepów *Candida* izolowanych od chorych na POChP świadczy o ich znacznej patogenności. 2) Aktywność kilku enzymów hydrolitycznych *Candida* koreluje ze stopniem zaawansowania choroby podstawowej (POChP). 3) Stwierdzenie powyższych zależności otwiera dyskusję nad potencjalnym wpływem grzybów rodzaju *Candida* obecnych w drogach oddechowych na patogenezę i przebieg POChP.

Słowa kluczowe: POChP, *Candida*, hydrolazy.

(PDiA 2003; XX, 3: 148–155)

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Candida* są szeroko rozpowszechnione w otaczającym człowieka środowisku. W ostatniej dekadzie obserwuje się znaczny wzrost liczby zakażeń, wywołanych przez patogeny grzybicze. Sytuacja ta, wg niektórych autorów związana ma być z wieloma czynnikami predysponującymi do zakażenia, z nie do końca jasną patogennością *Candida* oraz odpowiedzią organizmu gospodarza na zakażenie [1–3]. Większość autorów zwraca uwagę, że głównym czyn-

nikiem odpowiedzialnym za patogenność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* jest ich aktywność enzymatyczna [4–6]. Patogenne szczepy *Candida* produkują enzymy hydrolityczne, katalizujące hydrolizę wiązań C-O, C-N, C-C. Ułatwia ma to adherencję i inwazję grzyba w głąb tkanek gospodarza, a z drugiej strony może stymulować osłabienie odpowiedzi immunologicznej ograniczającej zakażenie [7, 8]. Do wydzielanych przez *Candida* hydrolaz zalicza się esterazy, wśród nich hydrolazy estrów grupy karboksylowej – lipa-

za triacyloglicerolowa i fosfolipaza A₂, hydrolazy monoestru fosforowego – fosfataza kwaśna i alkaliczna, hydrolazy estru siarkowego – sulfatazy; α-glukozydaza, glikozydazy – α-glukozydaza, β-glukozydaza, α-mannozydaza; proteiny (np. proteinaza asparaginowa), aminopeptydazy – np. aryamidazy, endopeptydazy – proteiny hydrolizujące wiązania C-N (np. ureaza) [9, 10].

Do czynników ryzyka zakażenia *Candida* należy m.in. przewlekła antybiotykoterapia i/lub steroidoterapia, przetrwałe zmiany płucne w postaci jam i zwłóknień, podawanie leków przez cewniki dożylny, zabiegi chirurgiczne, jak również niewielkie zaburzenia funkcji układu immunologicznego, np. po infekcjach wirusowych lub bakteryjnych [11, 12]. Rozwój i przebieg zakażenia zależny jest zatem od interakcji układu grzyb-gospodarz.

W Klinice Chorób Płuc chorzy na POChP należą do grupy ryzyka zakażenia *Candida*. Na podstawie badań własnych, prowadzonych wcześniej w Klinice Ftyzjopneumonologii stwierdzono, że grzyby te występują w płwocinie u około 70% hospitalizowanych z powodu POChP [13].

Cel pracy

- ▶ Porównanie aktywności hydrolitycznej grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych z płwociny chorych na POChP oraz od grupy kontrolnej osób zdrowych.
- ▶ Próba oceny aktywności hydrolitycznej *Candida* w zależności od stopnia zaawansowania POChP.

Grupy badane

- ▶ Chorzy na POChP: 53 osoby w wieku od 41 do 78 lat, średnia wieku 62,5±10 lat. Chorych badano w momencie przyjęcia do szpitala, w okresie zaostrenia choroby, po nieskutecznym leczeniu ambulatoryjnym.
- ▶ Grupa kontrolna: 14 osób zdrowych w wieku od 21 do 76 lat, średnia wieku 53,8±15 lat. Grupę tę stanowiły osoby w dobrym stanie klinicznym, nigdy nieleczone z powodu chorób przewlekłych oraz nieleczone antybiotykami i steroidami przez ostatnie 6 mies.

Metody i środki badawcze

Identyfikacja grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych z płwociny pobranej od chorych na POChP i od osób zdrowych

Do badania wykorzystano płwocinę indukowaną 4% NaCl. Z pobranego od danego pacjenta materiału badano preparat bezpośredni niebarwiony i barwiony metodą Grama. Oceniano postać grzybni – komórki drożdżopodobne i strzępki (forma Y i M). Wykonano posiewy *in vitro* na podłożu Sabourauda o składzie: 1% peptonu, 1,8% agar, pH podłoża wynosiło 5,6. Do podłoża dodany został chloramfenikol. Hodowla prowadzona była przez 24–48 godz. w temp. 37°C. Identyfikację gatunków szczepów przeprowadzono za pomocą testu ID C 32 (bioMérieux). Test jest biochemicznym szeregiem identyfika-

cyjnym grzybów drożdżopodobnych. Jest wystandaryzowany i zminiaturyzowany. Opiera się na ocenie zdolności grzybów z rodzaju *Candida* do przyswajania węgla. Do oceny wyników testu stosowana była baza danych firmy bioMérieux. Testy paskowe ID C 32 pozwalają na identyfikację 63 gatunków grzybów, zarówno z rodzaju *Candida*, jak i *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Sacharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*.

Określenie aktywności hydrolitycznej wyizolowanych szczepów *Candida*

Ocenę aktywności enzymatycznej przeprowadzono przy użyciu testu API ZYM firmy bioMérieux. API ZYM jest półilościową mikrometodą, pozwalającą na określenie aktywności hydrolitycznej, m.in. grzybów drożdżopodobnych. Zawiera substraty służące do identyfikacji 19 hydrolaz. Oceniane enzymy i ich substraty przedstawiono w tab. 1.

Do badania użyto szczepy *Candida* z 42-godzinnej hodowli. Z tych szczepów przy użyciu densytometru przygotowano zawiesinę w wodzie destylowanej, o gęstości 5° w skali McFarlanda. 65 mikrolitrów tej zawiesiny przenoszono do miseczek pasków testu API ZYM. Paski nakrywano pokrywką i inkubowano w temp. 37°C przez 4 godz. Po inkubacji dodano po 1 kropli ZYM A (o składzie: Tri-hydroksymetylamino-metan 15 g, kwas chlorowodorowy 21 ml, siarczan laurowy 10 g, woda destylowana do 100 ml) oraz ZYM B (o składzie: Fast Blue BB 0,33 g, 2-metoksytanol do 100 ml) do miseczek i pozostawiono na 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonywano odczytu wg intensywności skali barwnej. Zgodnie z zaleceniem producenta stosowano skalę 5-stopniową (od 0 do 5 stopni): 0 – 0 nanomoli, 1 – 5 nanomoli, 2 – 10 nanomoli, 3 – 20 nanomoli, 4 – 30 nanomoli, 5 – powyżej 40 nanomoli.

Stopień zaawansowania POChP określano na podstawie badania spirometrycznego

Spirometrię wykonywano aparatem ABC Pneumo RS. Mierzono natężoną objętość wydechową pierwszosekundową (FEV₁), pojemność życiową (VC) i obliczano wskaźnik Tiffeneau (FEV₁%/VC). Badanie wykonywano aż do uzyskania trzech poprawnych technicznie krzywych, opisujących próbę nasilonego wydechu [14]. Spirometrię wykonywały wykwalifikowane osoby, wykonujące stale to badanie. Normy spirometryczne przyjęto wg Europejskiej Wspólnoty Węgla i Stali [15]. Nasilenia obturacji oskrzeli kwalifikowano wg zaleceń Polskiego Towarzystwa Ftyzjopneumonologicznego (PTF) [16]. Obturację oskrzeli rozpoznawano jeśli FEV₁/VC < 70% należnej normy i klasyfikowano jako stopień I – postać łagodną (FEV₁ ≥ 80% N), stopień II – postać umiarkowaną (50 ≤ FEV₁ < 80% N), stopień III – postać średniociężką (30 ≤ FEV₁ < 50% N), postać IV – postać ciężką (FEV₁ < 30% N).

Badania spirometryczne wykonano u 46 osób. U 6 osób nie wykonano badania ze względów technicznych, jednak chorzy ci spełniali kryteria POChP. W związku z powyższym, w tej grupie również analizowano aktywność hydrolityczną *Candida*.

Tab. 1. Zestawienie enzymów hydrolitycznych i ich substratów

Numer enzymu	Nazwa enzymu	Hydrolizowany substrat
1.	fosfataza zasadowa	2-naftylofosforan
2.	esteraza (C4)	2-naftylomaślan
3.	lipaza esterazowa (C8)	2-naftylokapronian
4.	lipaza (C14)	2-naftylomirystylan
5.	arylamidaza leucylowa	L-leucylo-2-naftyloamid
6.	arylamidaza walinowa	L-walino-2-naftyloamid
7.	arylamidaza cystynowa	L-cystynylo-2-naftyloamid
8.	trypsyna	N-benzylo-DL-arginino-2-naftyloamid
9.	α -chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftyloamid
10.	fosfataza kwaśna	2-naftylofosforan
11.	fosfohydrolaza naftolowa-AS-B	naftylo-AS-BI-fosforan
12.	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α -D-galaktopiranoza
13.	β -galaktozydaza	2-naftylo- β -D-glukopiranoza
14.	β -glukuronidaza	naftolu-AS-BI- β -D-glukuronid
15.	α -glukozydaza	2-naftylo- α -D-glukopiranoza
16.	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β -D-glukopiranoza
17.	N-acetyl- β -glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetylo- β -glukozyloamid
18.	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α -mannopyranozydaza
19.	α -fukozydaza	2-naftylo- α -L-fukopiranoza

Analiza statystyczna

Porównywano intensywność wydzielania enzymów hydrolitycznych przez grzyby z rodzaju *Candida*, wyizolowane od chorych na POChP oraz od osób zdrowych stosując test Manna-Whitney'a, natomiast korelacje między aktywnością hydrolityczną a stopniem zaawansowania POChP za pomocą testu Spearmana. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 5.0.

Wyniki

Wszystkie szczepy *Candida* izolowane od chorych na POChP, jak i od osób zdrowych wykazywały aktywność enzymatyczną. Wyniki badania przedstawiono w tab. 2.

W grupie chorych na POChP grzyby z rodzaju *Candida* wydzielaly 19 enzymów hydrolitycznych. Najsilniej (średnia >3 w skali od 0–5) wydzielane były arylamidaza leucynowa (średnia aktywność 3,8) i lipaza esterazowa (średnia aktywność 3,16), oraz słabiej esteraza (2,96), α -glukozydaza (2,77) i arylamidaza walinowa (2,03). Średnią aktywność, mieszczącą się w skali 0–5 pomiędzy 1–2 wykazywały takie enzymy, jak fosfataza kwaśna (1,79), fosfataza zasadowa (1,5), fosfohydrolaza naftolowa AS-B (1,5), N-acetyl- β -glukozaminidaza (1,2), lipaza (1,15), arylamidaza cystynowa (1,03). Niską

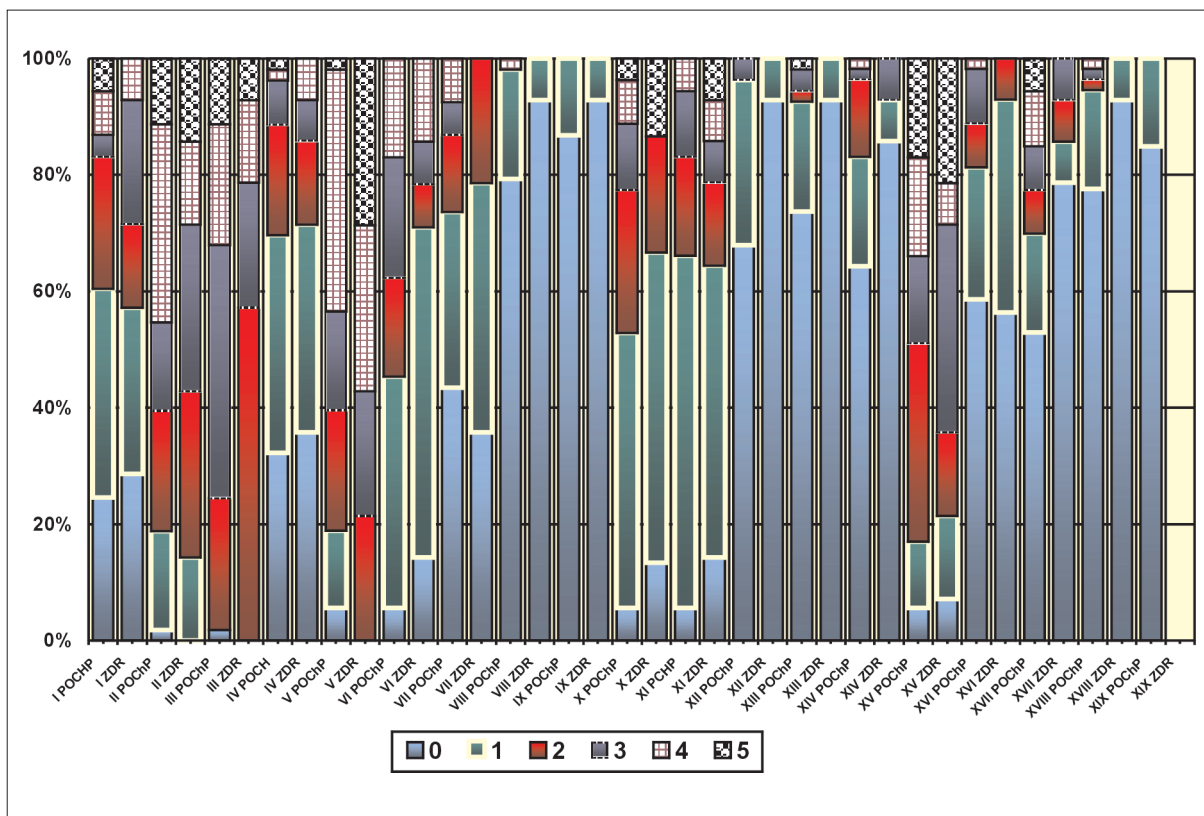
intensywność wydzielania, poniżej 1 w skali 1–5, zaobserwowano dla enzymów β -glukozydazy (0,73), β -glukuronidazy (0,58), β -galaktozydazy (0,43), α -galaktozydazy (0,39), α -mannozydazy (0,33), trypsyny (0,26), α -fukozydazy (0,15), α -chymotrypsyny (0,13). W badaniu kontrolnym (pierwszy dołek na pasku API ZYM) wszystkie wartości były ujemne.

Szczepy *Candida* wyizolowane od grupy kontrolnej osób zdrowych charakteryzowały się wydzielaniem 18 spośród 19 oznaczanych hydrolaz. Najsilniej (średnia >3 w skali od 0–5) wydzielana była arylamidaza leucylowa (średnia aktywność 3,64) oraz α -glukozydaza (2,83), słabiej esteraza (2,8) i lipaza esterazowa (2,7). Średnią aktywność mieszczącą się w skali 0–5 pomiędzy 1–2 wykazywały takie enzymy, jak fosfohydrolaza naftolowa AS-B (1,64), fosfataza zasadowa (1,5), fosfataza kwaśna (1,35), arylamidaza walinowa (1,15), lipaza (1,14). Obserwowano małą intensywność, poniżej 1 w skali 1–5, następujących enzymów arylamidazy cystynowej (0,85), β -glukozydazy (0,5), N-acetyl- β -glukozaminidazy (0,42). Bardzo niską aktywność enzymatyczną (średnia równa 0,07) wykazywały trypsyna, α -chymotrypsyna, α -galaktozydaza, β -galaktozydaza i α -mannozydaza. Nie stwierdzono aktywności α -fukozydazy. W badaniu kontrolnym (pierwszy dołek na pasku API ZYM) wszystkie wartości były ujemne.

Porównano wydzielanie enzymów hydrolitycznych przez szczepy *Candida*, wyizolowane od chorych na POChP oraz od osób zdrowych. Wyniki przedstawiono na rycinie 1.

Tab. 2. Aktywność hydrolityczna szczepów *Candida* wyizolowanych od chorych na POChP i od osób zdrowych

Aktywność hydrolityczna	Odsetek szczepów, które wykazały aktywność enzymów hydrolitycznych																		
	skala 0-5 [nanomole]	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Szczepy wyizolowane od chorych na POChP																			
0 – (0)	24,5	1,8	1,8	32	5,6	5,6	43,4	79,2	86,8	5,6	5,6	67,9	73,5	64,1	5,6	58,5	52,8	77,3	84,9
1 – (5)	35,8	16,9	0	37	13,2	39,6	30,1	18,8	13,2	47,1	60,4	28,3	18,8	18,8	11,3	22,6	16,9	16,9	15,1
2 – (10)	22,6	20,7	22,6	18,8	20,7	16,9	13,2	0	0	24,5	16,9	0	1,8	13,2	33,9	7,5	7,5	1,8	0
3 – (20)	3,8	15,1	43,4	7,5	16,9	20,7	5,6	0	0	11,3	11,3	3,7	3,7	1,8	15	9,4	7,5	1,8	0
4 – (30)	7,5	33,9	20,7	1,9	41,5	16,9	7,5	1,9	0	7,5	5,6	0	0	1,8	16,9	1,8	9,4	1,8	0
5 – (≥40)	5,6	11,3	11,3	1,9	1,9	0	0	0	0	3,7	0	0	1,88	0	16,9	0	5,6	0	0
średnia ±SD	1,50±	2,96±	3,16±	1,15±	3,80±	2,03±	1,03±	0,26±	0,13±	1,79±	1,50±	0,39±	0,43±	0,58±	2,77±	0,73±	1,20±	0,33±	0,15±
	±1,41	±1,37	±0,97	±1,13±	1,32	±1,24	±1,22	±0,65	±0,34	±1,20	±0,97	±0,69	±0,95	±0,93	±1,46	±1,08	±1,63	±0,78	±0,36
Szczepy wyizolowane od osób zdrowych																			
0 – (0)	28,6	0	0	35,7	0	14,3	35,7	92,9	92,9	14,3	14,3	92,9	92,9	85,7	7,1	57,1	78,5	92,9	0
1 – (5)	28,6	14,3	0	35,7	0	57,1	42,8	7,1	7,1	57,1	50	7,1	7,1	7,1	14,3	37,1	7,1	7,1	0
2 – (10)	14,3	28,6	57,1	14,3	21,4	7,4	21,4	0	0	21,4	14,3	0	0	0	14,3	7,1	7,1	0	0
3 – (20)	21,4	28,6	21,4	7,1	21,4	7,4	0	0	0	0	7,1	0	0	7,1	35,7	0	7,1	0	0
4 – (30)	7,1	14,3	14,2	7,1	28,6	14,3	0	0	0	0	7,1	0	0	0	7,1	0	0	0	0
5 – (≥40)	0	14,3	7,1	0	28,6	0	0	0	0	14,3	7,1	0	0	0	21,4	0	0	0	0
średnia ±SD	1,50±	2,80±	2,70±	1,14±	3,64±	1,15±	0,85±	0,07±	0,07±	1,35±	1,64±	0,07	±0,07±	0,28±	2,85±	0,5±	0,42±	0,07±	0±
	±1,34	±1,29	±0,99	±1,23	±1,15	±1,29	±0,77	±0,27	±0,27	±1,21	±1,45	±0,27	±0,27	±0,82	±1,56	±0,65	±0,93	±0,27	±0
Porównanie statystyczne (M-W)	ns	ns	p=0,07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	p=0,06	ns	ns	ns	ns	ns	p=0,07	ns



Ryc. 1. Porównanie aktywności hydrolitycznej *Candida* wyizolowanych od chorych na POChP i od osób zdrowych

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy w aktywności enzymatycznej *Candida* w badanych grupach. Zbliżoną do znamiennej różnicę stwierdzono w przypadku następujących enzymów: lipazy esterazowej – $p=0,07$, α -mannozydazy – $p=0,07$ i α -galaktozydazy – $p=0,06$. Enzymy te były silniej wydzielane przez szczepy *Candida* wyizolowane od chorych na POChP.

Na podstawie spirometrycznych stwierdzono, że u 46 chorych na POChP wskaźnik Tiffeneau ($FEV_1\%/VC$) był niższy od 70% wartości należytnej. Ze względu na stan kliniczny, chorych na POChP podzielono na 2 grupy. Jedną grupę stanowiły 24 osoby w stadium łagodnym i umiarkowanym ($FEV_1 \geq 50\% N$); drugą – 22 osoby w stadium średnio ciężkim i ciężkim ($FEV_1 < 50\% N$).

Przeprowadzono analizę korelacji między wydzielaniem enzymów hydrolitycznych przez szczepy *Candida* a stopniem zaawansowania POChP (test Spearmana). Stwierdzono, że w grupie chorych, u których występuje postać łagodna i umiarkowana ($FEV_1 \geq 50\% N$), istnieje znamienna statystycznie korelacja dodatnia między FEV_1 a wydzielaniem N-acetyl- β -glukozaminidazy ($p=0,04$; $r=+0,41$). Natomiast u chorych w stadium średnio ciężkim i ciężkim ($FEV_1 < 50\% N$) zaobserwowano statystycznie istotną korelację dodatnią między FEV_1 a wydzielaniem arylamidazy leucynowej ($p=0,02$ – $r=+0,49$); oraz istotną statystycznie korelację ujemną między FEV_1 a wydzielaniem β -glukuronidazy ($p=0,02$; $r=-0,47$) i β -glukozydazy ($p=0,03$; $r=-0,47$).

Omówienie

Grzyby drożdżopodobne, do których należą szczepy *Candida*, mogą występować w środowisku i organizmie człowieka nie wywołując objawów klinicznych [17]. Kolonizacja grzybami może być efektem czynników predysponujących do ich wzrostu i rozwoju, może towarzyszyć lub wyprzedzać chorobę podstawową, wreszcie poprzedzać lokalne zakażenie objawowe lub wysiew uogólniony. Trudne jest zatem rozstrzygnięcie, kiedy dochodzi do rozprzestrzeniania grzybów na powierzchni skóry, śluzówek i do inwazji w głąb organizmu, jak również określenie czynników mających na to wpływ [18, 19].

Chorobotwórczość *Candida* jest funkcją wielu współdziałających determinant. Obejmują one kolonizację błon śluzowych przez komensalne blastospory, namnażanie prowadzące do zwiększenia ich liczby na powierzchni nabłonek i śluzówek. Dochodzi do adherencji, aktywacji enzymów, uszkodzenia tkanek i odpowiedzi zapalnej [20, 21].

Spośród różnych determinant patogenności *Candida*, do najważniejszych należy aktywność enzymatyczna [22]. *Candida* wytwarza dużą liczbę enzymów, mających wpływ na przebieg infekcji grzybiczej. Wydzielane przez *Candida* lipazy (np. esteraza, lipaza esterazowa, lipaza) są uważane za szczególnie istotne w pierwszej fazie infekcji. Umożliwiają one, wraz z glukozydazami dostarczenie grzybom węgla, niezbędnego do dalszego ich wzrostu i rozwoju infekcji [4]. Pro-

teiny przyczyniają się do uszkodzenia komórek nabłonka i inwazji w głąb tkanek przez degradację keratyn i kolagenu [23]. Wydzielanie kwaśnych proteinaz ma chronić komórkę grzyba przed fagocytozą przez komórki gospodarza [24]. Fosfataza alkaliczna, N-acetyl- β -glukozaminidaza, α -mannozydaza hamują migrację neutrofilów do ognisk zapalnych [8]. Aktywność enzymatyczna może zatem decydować o zachwianiu równowagi układu grzyb-gospodarz na korzyść *Candida*.

Na rozwój infekcji *Candida* wpływają również czynniki do niej predysponujące. W przypadku chorych na POChP czynnikami tymi są, m.in. przewlekła steroidoterapia i/lub antybiotykoterapia, stare zmiany płucne (jamy i zwłóknienia), częste hospitalizacje w tym również podawanie leków przez cewniki dożylnie [25]. Na wzrost ryzyka zakażenia *Candida* wpływa również stan immunologiczny chorego na POChP. W przebiegu tej choroby dochodzi bowiem do nadprodukcji śluzu, zmian nabłonka oskrzeli i przebudowy ich ścian. Nadprodukcja śluzu spowodowana jest przez pobudzenie przerośniętych gruczołów śluzowych oraz przez wzrost liczby komórek kubkowych w wyniku działania mediatorów zapalnych [26, 27]. Dochodzi do metaplastyki płaskonabłonkowej urzęsionych komórek nabłonka oddechowego, która prowadzi do upośledzenia klinensu śluzowo-rzęskowego, a tym samym do upośledzenia usuwania grzybów z powierzchni błon śluzowych. Zaburzona jest również funkcja granulocytów obojętnochłonnych, komórek pełniących kluczową rolę w wewnątrzkomórkowej fagocytozie *Candida* [28].

Celem przedstawionej pracy było porównanie aktywności hydrolitycznej grzybów z rodzaju *Candida*, wyizolowanych z płwociny chorych na POChP oraz od osób zdrowych. Podjęto również próbę oceny aktywności hydrolitycznej *Candida* w zależności od stopnia zaawansowania POChP. Chorych na POChP zakwalifikowano do badania ze względu na częste występowanie *Candida*, stwierdzone w trakcie wcześniejszych badań. Grupę kontrolną stanowiły osoby w dobrym stanie klinicznym nieleczone z powodu chorób przewlekłych oraz nieleczone antybiotykami i steroidami przez ostatnie 6 mies.

Szczepy *Candida* wyizolowane od obu badanych grup wykazywały aktywność wielu enzymów. W grupie chorych na POChP szczepy te wydzielają 19 enzymów hydrolitycznych. Szczepy *Candida* wyizolowane od grupy kontrolnej osób zdrowych charakteryzowały się wydzielaniem 18 spośród 19 oznaczanych hydrolaz (α -fukozydaza była nieaktywna). Aktywność tych szczepów w obu grupach była znacznie bardziej nasiloną, aniżeli aktywność szczepu wzorcowego *Candida* L-45 opisanego przez Białasiewicz (wydzielanie 9 enzymów) [29].

W trakcie porównywania aktywności poszczególnych enzymów hydrolitycznych, zauważono różnice w nasileniu wytwarzania niektórych z nich. Zbliżoną do znamiennej statystycznie różnicę stwierdzono w przypadku lipazy esterazowej ($p=0,07$), α -mannozydazy ($p=0,07$) i α -galaktozydazy ($p=0,06$). Enzymy te były silniej wydzielane przez szczepy *Candida*, wyizolowane od chorych na POChP. Na dużą aktywność grzybów wyizolowanych od chorych na POChP wpływ mają opisane wyżej czynniki ryzyka, oraz stan immunologiczny gospodarza (w tym również upośledzona funkcja granulocytów obojętnochłonnych krwi, stwierdzona wcześniej w badaniach własnych jednego z autorów pracy) [30]. Aktywność dużej liczby enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez szczepy *Candida* izolowane od osób zdrowych, może być związana z przystosowaniem się grzybów do przetrwania w organizmie gospodarza [31].

Kolejnym etapem analizy była próba odpowiedzi na pytanie, czy aktywność enzymatyczna *Candida* zmienia się zależnie od stopnia zaawansowania choroby podstawowej (POChP). Stwierdzono, że u chorych na POChP w stadium łagodnym i umiarkowanym ($FEV_1 \geq 50\% N$) istnieje znamienna statystycznie korelacja dodatnia między FEV_1 a wydzielaniem N-acetyl- β -glukozaminidazy ($p=0,04$; $r=+0,41$). Aktywność tego enzymu, wydzielanego przez szczepy *Candida*, ma hamować migrację neutrofilów do ognisk zapalnych i osłabiać aktywność granulocytów obojętnochłonnych. Jest to przejawem walki *Candida* o przetrwanie w organizmie gospodarza [13]. Aktywność neutrofilów jest bowiem jednym z najważniejszych czynników ograniczających rozwój infekcji grzybiczej [28]. W grupie chorych, będących w stadium średniociężkim i ciężkim choroby podstawowej ($FEV_1 < 50\% N$) zaobserwowano statystycznie istotną korelację dodatnią między FEV_1 a wydzielaniem aryamidazy leucynowej ($p=0,02$; $r=+0,49$); oraz istotną statystycznie korelację ujemną między FEV_1 a wydzielaniem β -glukuronidazy ($p=0,02$; $r=-0,47$) i β -glukozydazy ($p=0,03$; $r=-0,47$). W grupie chorych korelacje dotyczą enzymów odpowiedzialnych za przygotowanie substancji odżywczych, niezbędnych do wzrostu i namnażania *Candida*, poprzedzających inwazję grzyba w głąb błony śluzowej [4].

Wyniki sugerują, że w zależności od stopnia zaawansowania POChP, dominuje aktywność różnych enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez szczepy *Candida* obecne w drogach oddechowych. Tłumaczyć to można różną ilością czynników ryzyka zakażenia, stanem klinicznym, różnym stopniem upośledzenia sprawności układu immunologicznego w zależności od stadium zaawansowania procesu chorobowego, jak również możliwościami przystosowawczymi *Candida*. Powyższe stwierdzenie to dość daleko idące wnioski. Interpretacja przedstawionych wyników jest trudna, ze względu na złożoność problemu oddziaływania poszczególnych elementów patogenności na przebieg infekcji *Candida*.

Wnioski

Wnioski

- Silna aktywność hydrolityczna szczepów *Candida* izolowanych od chorych na POChP świadczy o ich znacznej patogenności.
- Aktywność kilku enzymów hydrolitycznych *Candida* jest związana ze stopniem zaawansowania choroby podstawowej (POChP).
- Stwierdzenie powyższych zależności otwiera dyskusję nad potencjalnym wpływem *Candida*, obecnych w drogach oddechowych na patogenezę i przebieg POChP.

Piśmiennictwo

1. Krajewska-Kułał E, Niczyporuk W: Aktywność lipolityczna i proteolityczna *Candida* a ich wrażliwość na antymikotyki. *Mikol Lek*, 1997, 4 (4): 197-203.

2. Batura-Gabryel H: Inwazje wielogniskowe grzybami z rodzaju *Candida* u chorych na raka płuca i przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. *Mikol Lek*, 1999, 6 (4): 207-11.
3. Meunier F: Prevention of serious *Candida* infection. In: *Serious Candida Infection: risk factors, treatment and prevention*. Pfizer INC, Huston, 1995, 252.6
4. Batura-Gabryel H, Młynarczyk W: Aktywność hydrolityczna grzybów z rodzaju *Candida* i występowanie grzybicy jamy ustnej u chorych na raka płuca i przewlekłą obturacyjną chorobę płuc. *Mikol Lek*, 2000, 7 (2): 77-82.
5. Ray T, Payne C, Morrow B: *Candida albicans* acid proteinase characterisation and role in candidiasis. *Adv Exp Med Biol*, 1991, 306, 173-83.
6. Rauchel R: Pathogenitat von *Candida albicans*. *Immunol Infect*, 1991, 108.
7. Plomer-Niezgoda E, Baran E, Cisło M i wsp.: Badanie aktywności enzymów hydrolitycznych wybranych grzybów pleśniowych i drożdżaków przy użyciu testu API ZYM. *Mikol Lek*, 1998, 5 (3): 157-64.
8. Nowicki R, Korting HC: Różnice w aktywności hydrolitycznej dermatofitów. *Mikol Lek* 1995, 4, 209-13.
9. Kurnatowska A: *Biologia i ekologia grzybów chorobotwórczych*. W: *Zarys mikologii lekarskiej*. E. Baran. Volumes, Wrocław 1998, 25-281.
10. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: *Enzyme nomenclature*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, 1992.
11. Batura-Gabryel H, Młynarczyk W: Uwaga – grzybice narządowe atakują! *Mikol Lek* 1998, 5 (supl. 1): 21-4.
12. Beck-Sague CM, Jarvis WR: National nosocomial Infections Suirveillance System: Secular trends in the epidemiology of nosocomial infections in the United States, 1989-1990. In: *Serious Candida infections: risk factors, treatment and prevention*. Pfizer Inc, Houston, 1995, 9-15.
13. Brajer B, Batura-Gabryel H, Kuźnar B, Młynarczyk W: Aktywność lipolityczna i proteolityczna grzybów z rodzaju *Candida*, wyizolowanych z płwociny chorych na POChP. *Post Dermat i Alerg XIX*. 2002, 3: 184-8.
14. American Thoracic Standarization of spirometry: 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152: 1007-136.
15. Quarnier PH: Report working party – European Community for Coal and Steal. Standarization of lung infection test. *Bull Europ Physiopath Resp*, 1983, 19, Supl. 5.
16. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ftyzjopneumonologicznego rozpoznawania i leczenia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP). *Pneumonol Alergol Pol*, 2002, 70 (suppl. 2): 11-3.
17. Krajewska-Kułak E, Niczyporuk W, Karczewski J, Złotkowski W: Ocena aktywności wybranych enzymów hydrolitycznych u grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida* przy użyciu testu API ZYM. *Mikol Lek*, 1997, 4 (3): 147-52.
18. Tsuboi R, Ogawa H, Bramono K, et al.: Pathogenesis of superficial mycoses. *J Med Vet Mycol*, 1994, 32, supl: 91-103.
19. Mathews RC: Microbiology, Pathogenicity determinants of *Candida Albicans*: potential targets for immunotherapy? 1994, 140: 1505-11.
20. Macura A. B: Przyleganie grzybów z rodzaju *Candida* do komórek ssaków. *Post Mikrobiol*, 1993, 32: 321-6.
21. Odds FC: Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*, 1994, 31: 2-5.
22. Sysło J, Macura A: Badania nad niektórymi determinantami patogenności u grzybów z rodzaju *Candida*. *Mikol Lek*, 1998, 5 (3): 145-55.
23. Ray T, Payene C, Morrow B: *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidiasis. *Adv Exp Med Biol*, 1991, 306: 173-83.
24. Batura-Gabryel H, Młynarczyk W: Aktywność proteolityczna i lipolityczna grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych od chorych na przewlekłą chorobę układu oddechowego. *Mikol Lek*, 2000, 7 (3): 139-43.
25. Batura-Gabryel H: Niektóre aspekty patogenezy kandydozy. *Mikol Lek*, 1999, 6 (2): 113-8.
26. Zieliński J: Patogeneza. W: *Przewlekła obturacyjna choroba płuc*. Red. J. Zieliński, D. Górecka, P. Śliwiński. Warszawa 1998, 53-69.
27. Raport NHLBI/WHO; GOLD. *Med Praktyczna*, wydanie specjalne 2001, 1: 31-41.
28. Przondo-Mordarska A: Immunologia zakażeń grzybiczych. W: *Zarys mikologii lekarskiej*. Red. Baran E., Volumes, Wrocław, 1998, 497-504.
29. Białasiewicz D, Kurnatowska A: Aktywność wybranych enzymów hydrolitycznych *Candida albicans* – szczepów izolowanych z ontocenozy jamy ustnej. *Mikol Lek*, 1996, 3 (4): 249-52.
30. Batura-Gabryel H: Wygrane czynniki warunkujące występowanie grzybów rodzaju *Candida* u chorych z przewlekłymi chorobami układu oddechowego bez neutropenii. Praca habilitacyjna, Poznań 2001.
31. Macura A: Patomechanizm zakażeń grzybiczych. W: *Zarys mikologii lekarskiej*. Red. Baran E., Volumes, Wrocław, 1998, 297-309.