

Adherencia vizsgálatok dermatophyton konídiummal lábköröm keratinocitákon

Adherence investigations on dermatophyten conidia in toe nail keratinocytes

HALMY KLÁRA DR.

Laboratórium Kft Hajdú-Bihar megyei Mikrobiológiai Laboratórium, Debrecen

ÖSSZEFOGLALÁS

A gombafajoknak a köröm keratinocitákhoz való adherenciája szerepet játszik az onychomycosis kialakulásában. A szerzők 48 onychomycosis pedisben megbetegedett egyén köröm kaparékából, valamint 74 mikroszkóposan és tenyésztéssel is negatív esetben *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* konídiumaival adherencia vizsgálatokat végeztek. Megállapították, hogy a pozitív esetekben az adheráló képesség nagyobb mértékű, mint a kontrollokban. A vizsgált gombafajok közül a *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* kapcsolódása volt a legkifejezettebb. A köröm keratinociták nagyobb affinitással kötik meg a felületükön a konídiumokat, mint a bőr keratinociták. A dermatophyton konídiumok jobban kapcsolódnak a köröm keratinocitákhoz, mint a *Candida albicans* blasztospórák.

Kulcsszavak:
adherencia - *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* konídium - köröm keratinocita - onychomycosis pedis

SUMMARY

Adherence of different species of fungi to nail keratinocytes plays a role in the development of onychomycoses. The author investigated scrapings from nails of 48 patients with onychomycosis pedis and of 74 patients whose samples were found negative both microscopically and by culturing. Tests involved adherence investigations on conidia of *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum*. Greater adherence capacity was observed in positive samples than in the control group. The adherence of *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* was the most expressed of all the species included in the test. Nail keratinocytes exhibit greater surface affinity to bind conidia than skin keratinocytes. Dermatophyton conidia adhere to nail keratinocytes more readily than the blastospores of *Candida albicans*.

Key words:
adherence - conidia of *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* - nail keratinocyte - onychomycosis pedis

A mikroorganizmusok – közöttük a gombák – a gazdaszervezet szöveteihez kapcsolódva befolyásolják a patogenezist, a kolonizációt, továbbá inváziós és disszeminációs folyamatokat indítanak el. Ezek előfeltétele a kórokozó és a gazda szövet közötti kapcsolat létrejötte, amelyben a gombák sejtfalában lévő mannoproteinek, a kitin valamint lipid molekulák, illetve a bőr és a köröm keratinocitáinak receptorai vesznek részt.

Korábbi vizsgálatainkban mycosis superficialis kórképben sarjadzógomba blasztospórák és *Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum* (TMVG) konídiumok adheráló képességét tanulmányoztuk. Ennek a vizsgálati sorozatnak újabb állomásaként a TMVG konídiumok adhe-

renciáját onychomycosis pedis kórképben a köröm keratinocitákon vizsgáltuk meg.

Betegek és módszerek

2009 és 2010 években 122 beteg (köztük 76 nő és 46 férfi) lábköröm megbetegedéseiből adherencia vizsgálatokat végeztünk. A betegek átlagos életkora 55 év volt. A vizsgálat 48 esetben mind mikroszkóposan, mind tenyésztéssel pozitív, 74 esetben pedig negatív eredményt adott. A gombatenyésztéseket 4%-os Sabouraud és Mycosel (chloramphenicol és actidion tartalmú) agar táptalajon végeztük.

Köröm keratinociták preparálása

A köröm kaparékat steril dörzsmozsárban homogenizáltuk, majd PBS-ben 3x mostuk. A sejt szuszpenziót 12 µm pórusú Schleicher-Schuell membrán filteren szűrtük át. A keratinocitákat Neubauer hemocitóméterben számoltuk meg, majd 1×10^5 sejt.ml⁻¹-re állítottuk be.

TMVG konídium szuszpenzió készítése (1)

A gombát 4 héig SGA-n tenyésztettük. A tenyészetet steril fiziológias NaCl és 0,1%-os Tween 80-at tartalmazó oldattal öblítettük le, amelyet steril gézen átszűrünk. Centrifugálást követően a konídiumokat steril NaCl-ba szuszpendáltuk, majd folyékony SGA-ba vittük. A szuszpenzió konídium számát 1×10^7 konídium.ml⁻¹-re állítottuk be.

Adherencia vizsgálat (2)

A keratinocita és konídium elegyét 1:1 arányban készítettük el. Az elegyet centrifugálás után 3x PBS-ben mostuk és 37 °C-on rázó-fürdőben 90 percig inkubáltuk. A nem adheráló konídiumok eltávolítására az elegyet 12 µm pórusú polikarbonát filteren szűrtük és PBS-el 3x átmostuk. A filteren tapadó sejteket tárgylemezre téve szobahőmérsékleten szárítottuk és Gram kristályibolyával festettük. Mikroszkópos vizsgálattal 400 x-i nagyítás mellett 50 keratinocitára eső konídiumot számoltunk és átlagoltunk.

Statisztikai analízisre Mann-Whitney „U” próbát alkalmaztunk. Szignifikánsnak a $p \leq 0,05$ értéket tekintettük.

Eredmények és megbeszélés

A gombák adheráló készségét (AK) in vivo és in vitro számos tényező befolyásolja. Ezek: a gomba faja, csíraszama, növekedési fázisa, morfológiai tulajdonságai, hidrofóbicitása, továbbá a sejtfal mannoproteinjei, kitin és a lipid tartalom, valamint az enzim termelő képesség. Mindezeket modulálja a közeg hőmérséklete, pH-ja és szénhidrát tartalma (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Kísérletes körülmények között az optimális miliő 37 °C-os hőmérséklet, 7,2 pH és 90-120 perces inkubációs idő biztosítja (11, 12, 13). A gomba AK-ja azonban a target sejtek (keratinociták) mennyisége, származási helye és az AK-ért felelős SAP₉₋₁₀ gének aktivitásától függően is változhat (14).

Az onychomycosisok kialakulásánál a gombák (dermatophytonok konídiumai) és a keratinociták kapcsolódása döntő fontosságúnak tűnik. Sarjadzógombákkal kapcsolatos korábbi vizsgálataink azt igazolták, hogy a beteg körmök keratinocitáinak AK-ja a kontrollokhoz képest nagyobb mértékű. Ilyen szignifikáns különbség jelenlegi vizsgálatunkban az AK-ban nem mutatkozott (1. táblázat).

Az egyes gomba fajok AK-inak összehasonlító vizsgálatai alapján a legnagyobb AK-val a dermatophytonok közül a TMVG rendelkezik (2. táblázat). Ezt meghaladó értékek az *Epidermophyton floccosum*-nál, a penészek közül a *Scopulariopsis brevicaulis*-nél és a *Fusarium oxysporum*-nál mutatkoztak. Ezek azonban csak jelzés értékű adatok, mivel egy-egy esethez kapcsolódnak. Korábbi megfigyelések is arról tanúskodnak, hogy a TMVG AK-ja a legnagyobb (16, 17). A sarjadzógombák körében a *Candida albicans* rendelkezik magasabb AK értékkel (7, 15, 18). A körmökből és a bőr epidermisből származó keratinociták TMVG konídiummal végzett adherencia vizsgálatainak összehasonlításai azt mutatják, hogy az AK érték a köröm keratinocitáknál nagyobb (3. táblázat). A konídiumok és a köröm keratinociták kapcsolódását az 1. ábra szemlélteti (1. ábra). Amikor

onychomycosis pedis n=48	kontroll n=74
átlagos adherenciaszám	
7,0 + 0,50	6,0 + 0,30
szignifikancia: $p \geq 0,05$	

1. táblázat

Adherencia vizsgálatok onychomycosis pedisben és kontrolloknál

Fajok	n	konídium adherencia átlag	SD
Trichophyton rubrum	13	7,0	0,7
Trich. ment. v. interdig.	8	7,5	1,3
Trich. ment. v. granul.	5	8,6	2,0
Epiderm. flocc.	1	12,0	1,2
Candida sp.	12	5,0	0,4
Scopulariopsis brev.	1	9,0	1,1
Aspergillus niger	2	4,5	0,5
Cladosporium sp.	1	6,0	1,1
Acremonium sp.	4	4,0	1,1
Fusarium sp.	1	10,0	1,1

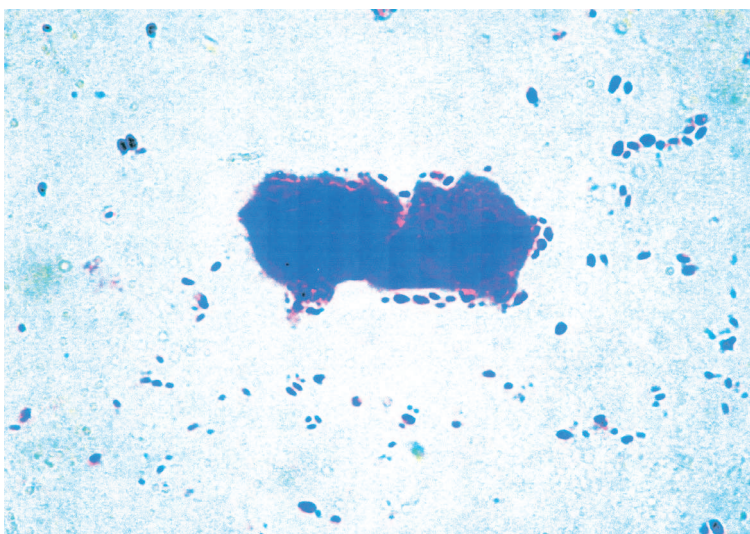
2. táblázat

Gombafajok onychomycosis pedisben és adherencia kapacitásuk
n = 48

onychomycosis pedis n=48	mycosis superficialis n=117
átlagos adherenciaszám	
7,0 + 0,50	5,0 + 1,1
szignifikancia: $p \leq 0,01$	

3. táblázat

Adherencia vizsgálatok onychomycosis pedisben és mycosis superficialisban Trichophyton mentagrophytes var. granulosum konídiummal



1. ábra

Adheráló Trichophyton mentagrophytes varietas granulosum konídiumok köröm keratinocitákon

Candida albicans blasztospóra n=93	Trich. ment. v granulosum konídium n=48
átlagos adherenciaszám 5,57 + 0,12	7,0 + 0,50
szignifikancia: $p \leq 0,05$	

4. táblázat

Adherencia vizsgálatok lábkörömben *Candida albicans*
hlesztospórával és *Trichophyton mentagrophytes*
var. *granulosum* konídiummal

a TMVG konídiumok és a *Candida albicans* blasztospórák köröm keratinocitákkal való kapcsolódását hasonlítjuk össze, a konídiumok fokozottabb AK-ját figyelhetjük meg (4. táblázat).

Az AK-val kapcsolatos eddigi megfigyeléseink valószínűsítik, hogy az onychomycosis kialakulásában a dermatophyton konídiumok köröm keratinocitákhoz való adherenciájának lényeges szerepe van. A kórfolyamatban a gombák szerepének jobb megközelítéséhez nagyobb számú vizsgálat elvégzése lenne kívánatos.

IRODALOM

1. Nishiyama, Y. et al.: Morphological changes associated with growth inhibition of *Trichophyton mentagrophytes* by amorolfine. Clin. Exp. Dermatol. (1992) 17 (Suppl. 1) 13-17.
2. Kimura, L. H. and Pearsall, N. N.: Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. (1978) 21, 64-68.
3. Ghannoum, M. A. and Elteen, K. A.: Correlative relationship between cell surface composition, adherence, proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. Sabouraudia (1986) 24, 407-413.
4. Hazen, K. C.: Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect. Immun. (1989) 57, 1894-1900.
5. Kennedy, M. J. and Sandin, R. L.: Influence of growth conditions on *Candida albicans* adhesion hydrophobicity and cell wall ultrastructure. J. Med. and Vet. Mycol. (1988) 26, 70-92.
6. Klotz, S. A.: Plasma and extracellular matrix proteins mediate the fate of *Candida albicans* in the human host. Med. Hypoth. (1994) 42, 328-334.
7. Ollert, M. W. et al.: Mechanism of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. Infect. Immun. (1993) 61, 4560-4568.
8. Pendrak, M. L. and Klotz, S. A.: Adherence of *Candida albicans* to host cells. FEMS Microbiol. Letters (1995) 129, 103-114.
9. Segal, E., Lehrer, N. and Ofek, I.: Adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells: inhibition by amine sugars. Exp. Cell. Biol. (1982) 50, 13-17.
10. Tronchin, G. et al.: Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. Eur. J. Epidemiol. (1991) 7, 23-33.
11. Cotter, G. and Kowanogh, K.: Adherence mechanisms of *Candida albicans*. Br. J. Biomed. Science (2000) 57, 241-249.
12. Faergemann, J., Aly, R. and Maibach, H. L.: Adherence of *Pityrosporum orbiculare* to human stratum corneum cells. Arch. Dermat. Res. (1983) 275, 246-250.
13. Falkensammer, B. et al.: Absent reduction by HIV protease inhibition of *Candida albicans* adhesion to endothelial cells. Mycoses (2007) 50, 172-177.
14. Schild, L., Albrecht, A. and Hube, B.: Characterisation of the *Candida albicans* cell surface-associated proteases Sap9 and Sap10 Mycoses (2008) 51, 416.
15. Halmy, K.: Sarjadzógombák adherencia kapacitásának vizsgálata köröm keratinocitákon. Bőrgyógy. Vener. Szle. (2010) 86, 108-110.
16. Difonzo, E. M. et al.: Die Adhärenz der Konidien von *Trichophyton mentagrophytes* an humane Keratinozyten. Vortrag der 31. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft. 18-20. September in Aachen (1997).
17. Halmy, K. és Serfőző, J.: Adherencia vizsgálatok *Trichophyton mentagrophytes* varietas *granulosum* konídiummal dermatomycosisos betegek korneocitáin. Bőrgyógy. Vener. Szle. (2005) 81, 51-53.
18. Bendel, C. M. and Hostetter, M. K.: Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J. Clin. Invest. (1993) 92, 1840-1849.

Érkezett: 2012. III. 01.

Közlésre elfogadva: 2012. V. 17.

A Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle Szerkesztősége fenntartja magának a jogot
a hirdetések elfogadására,
de a hirdetések tartalmáért nem vállal felelősséget.