

ASPERGILLUS CİNSİ MANTARLARIN OLASI VİRÜLANS FAKTÖRLERİPUTATIVE VIRULENCE FACTORS OF *ASPERGILLUS* SPECIES**Şehnaz ALP***

ÖZET: *Aspergillus* cinsi mantarlar, doğada yaygın olarak bulunan saprofitik filamentöz mantarlardır. Bu cinsin üyeleri, insanlarda fırsatçı enfeksiyonlar, alerjik hastalıklar ve toksikozlar gibi klinik tablolara neden olabilmektedir. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu fırsatçı mikozların gelişiminde konağa özgü risk faktörlerinin yanı sıra, etkenin konak dokusuna tutunmasını, dokuya penetrasyonunu ve özellikle fagositik hücreler gibi konak savunma elemanlarını etkisiz hale getirmesini sağlayabilecek özelliklerinin de önemli olduğu düşünülmektedir. *Aspergillus* türlerinin sorumlu olduğu klinik tabloların patogenezi aydınlatabilmek amacıyla yapılan çalışmalarda; konakta dolaşımda veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanmadan sorumlu adezinler, mukosiliyer hareketi bozan ve makrofajların fagositozunu inhibe eden toksik moleküller, konak savunmasına direnci ve konak dokusunda daha uzun süre kalmayı sağlayan pigmentler, protein ve fosfolipidlerden oluşan hücre membranlarının yıkımına, bütünlük ve işlevlerinin bozulmasına neden olan ekstraselüler enzimler, *Aspergillus* türlerinin olası virülans faktörleri olarak tanımlanmıştır. Bu derlemede, *Aspergillus* cinsi mantarların olası virülans faktörleri ve aspergilloz patogeneziindeki rolleri tartışılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus*, virülans faktörü, aspergilloz.

ABSTRACT: Members of the genus *Aspergillus* are filamentous, ubiquitous fungi found in nature. *Aspergillus* species can cause clinical settings in man, such as opportunistic infections, allergic states and toxicoses. Immunosuppression is the major factor predisposing to development of opportunistic mycoses. To invade the host, *Aspergillus* species must be able to adhere to and penetrate the host tissues. Much work has focused on the search for virulence determinants that allow the establishment of the fungus within the host. Adhesins, pigment production, toxic metabolites and extracellular enzymes are thought to be the putative virulence factors of *Aspergillus* species. Adhesion systems provide binding of conidia to various circulating or basement membrane-associated host proteins; toxic molecules inhibit macrophage phagocytosis and mucociliary action; pigment production aids in longer survival in tissues and also overwhelms the

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

host defence systems; extracellular enzymes degrade the structural barriers in the host. In this review, putative virulence factors of *Aspergillus* species and their potential role in aspergillosis have been discussed.

Key words: Aspergillus, virulence factors, aspergillosis.

GİRİŞ

Aspergillus cinsi mantarlar toprakta, çürümüş organik maddelerde ve nemli ortamlarda yerleşip gelişebilen, çevresel karbon ve nitrojen döngüsünde önemli roller oynayan, tüm dünyada yaygın olarak bulunan saprofitik filamentöz mantarlardır. *Aspergillus* türleri insanlarda fırsatçı enfeksiyonlar, alerjik hastalıklar ve toksikozlar gibi klinik tablolara neden olabilmektedir. Konağın bağışıklık sisteminin baskılanmış olması fırsatçı enfeksiyonların gelişiminde en önemli risk faktörüdür. *Aspergillus* türlerinin neden olduğu lokal ve yaygın enfeksiyonlara aspergilloz adı verilir. Fırsatçı mikoz etkenleri arasında *Candida*'dan sonra ikinci sırada yer almakta olan bu cinsin üyeleri, hematolojik malignansi tedavi merkezlerinde ve kemik iliği nakil ünitelerinde izlenen hastalarda önemli morbidite ve mortalite nedenleridir. Ayrıca, akciğerde kaviter lezyon varlığında, kistik fibrozis olgularında ve bronşiektazi varlığında *Aspergillus* türleri ile kolonizasyon ve/veya enfeksiyon izlenebilmektedir^{1,2}.

Aspergillus cinsinin insanlarda oluşturduğu enfeksiyonların yaklaşık olarak %90'ından *A.fumigatus* sorumludur. *A.flavus* rinosinüzit, deri enfeksiyonları ve invaziv enfeksiyonlardan sorumlu olabilen ve izole edilme sıklığına göre *A.fumigatus*'u izleyen diğer bir patojen *Aspergillus* türüdür. *A.fumigatus* ve *A.flavus*'un konidyumlarından daha büyük çapta konidyumlara sahip olan *A.niger*'in akciğer dokusunun derinliklerine ulaşamaması nedeniyle, invaziv hastalık tablolarından sorumlu olmadıkları düşünülmektedir. Bununla birlikte, sıklıkla kolonizasyon yapan bir izolattır ve otitis eksterna gibi yüzeysel enfeksiyonlara neden olabilir. *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.glaucus*, *A.ustus*, *A.clavatus*, *A.oryzae* ve *A.versicolor* fırsatçı mikoz etkenleri olarak daha az sıklıkla izole edilen diğer patojen *Aspergillus* türleridir^{1,2}.

HÜCRE DUVAR YAPISI

Aspergillus türlerinde çevresel etmenlere karşı korunmadan, konakta ve laboratuvar koşullarında büyüme ve gelişmeden, konakta enfeksiyon ve alerjik tabloların oluşumundan sorumlu yapı hücre duvarıdır. Mantar hücre duvarı mantarlara ait en tipik yapıdır. Sert bir katman olarak, mantar hücresinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı şekil ve bütünlüğünü korumasında önemli bir rol oynamaktadır. Ortamdaki ozmotik basınç değişimlerine, toksik metaller gibi hücre membranını zedeleyici ajanlara ve yabancı enzimlere karşı korunmayı sağlar. Mantar hücre duvarı, mantarın çevresiyle olan tüm etkileşimlerinden sorumludur. Hücre yüzeyindeki adezinler, lektinler ve hidrofobinler gibi biyomoleküller mantarın çeşitli yüzeylere bağlanmasını sağlar. Konak hücresine tutunma patojen bir mantarın invazyonunda ilk basamaktır. Bazı hücre duvar bileşenlerinin antijenik veya immün modülatör etkileri vardır. Hücre duvarında bulunan enzimler tarafından proteinler, polisakkaritler ve lipidler gibi büyük moleküllerin parçalanmasıyla, mantar hücresinin büyüme ve gelişmesi için besin sağlanır. Mantar hücre duvarındaki bu enzimlerin

bir kısmı, konak hücre ve doku yapılarını parçalayıcı etki göstererek, mantarın invazyonunda rol oynar. Mantar hücre duvarı büyük oranda polisakkaritlerden oluşmaktadır. Daha az oranda bulunan proteinleri, miktar olarak lipidler, pigmentler ve inorganik tuzlar gibi diğer minör bileşenler izlemektedir. Hücre duvar bileşenleri, en başta hidrofobik bağlar olmak üzere, hidrojen bağları, kovalent ve non-kovalent bağlarla ayrılmaz bir bütün olarak birarada bulunurlar. Böylece, pek çok işlevi yerine getiren üç boyutlu bir hücre duvar yapısı oluşur. Yapısal olarak, mantar hücre duvarı iki farklı bileşenden oluşan bifazik bir sistem gibi gözükmemektedir. Kitin ve glukoz gibi yapısal polisakkaritlerin oluşturduğu mikrofibril yumağı hücrenin sertliğini sağlarken, glukoproteinler ve diğer polisakkaritlerin oluşturduğu amorf bileşen, mikrofibriller katmanının iç kısmını oluşturur. Amorf katman, aderansta rol oynayan glukoproteinleri ve çevreye karşı korunmayı sağlayan biyomolekülleri içerir³.

ASPERGİLLOZ PATOGENEZİ

Aspergillus türlerinin enfeksiyöz partikülü konidyumdur. *Aspergillus* konidyumları akciğerlere inhalasyon yolu ile ulaşmaktadır. Bunun yanı sıra, *Aspergillus* konidyumlarıyla kontamine olmuş sulardan aerosollerin inhalasyonu yolu ile de akciğerlere konidyumların ulaşabildiği öne sürülmektedir^{1,4}. Daha az sıklıkla cerrahi yaralar, kontamine intravenöz kateterler veya kontamine bandaj uygulamaları gibi yollarla ciltten giriş sonrasında kütanöz enfeksiyon gelişebilmektedir^{5,6}. *Aspergillus* enfeksiyonlarının gelişebilmesi için gereken inokulum miktarı bilinmemektedir. Bağışıklık sisteminin baskılanmış olması durumunda inhale edilmiş olan konidyum şişerek genişler, germinasyon sonrası hif haline dönüşür. Hifin belirmeye başlamasıyla logaritmik büyüme fazı başlar. İn vitro hifal büyüme ve mantar kütleindeki logaritmik artış 24 saat kadar devam ettikten sonra büyüme hızı plato yapar. Pulmoner dokudaki konidyal germinasyonun inkübasyon süresi, iki gün ile aylar arasında değişebilir. Bu süre türlere göre de değişkenlik gösterir. Organizmanın 37°C'de üreyebilme yeteneği ve üreme hızı, etkenin patojenitesini ve oluşan enfeksiyonun ilerleme hızını belirleyici özellikleri arasındadır. En hızlı gelişen tür *A.fumigatus* olup, kullanılan besiyerine bağlı olarak, germinasyon 37°C'de 5-12 saat içinde başlar. Hifal gelişim ve doku invazyonu, invaziv aspergillozun belirgin bulguları olan vasküler invazyon ve pulmoner infarkt ile sonuçlanır. İnvaziv aspergilloz immün kompetan konaklarda nadiren görülür. Normal pulmoner savunma mekanizmaları sonucunda enfeksiyon önlenir. *Aspergillus*'a karşı ilk savunma siliyer hareketle organizmanın hava yollarından temizlenmesidir. Konidyal boyut alveole ulaşmada önemli rol oynar. Konidyum boyutu ne kadar küçükse alveollere ilerleme olasılığı o kadar fazladır. *A.fumigatus*'un diğer türlere göre daha patojen olmasının nedenlerinden birisi de konidyum boyutunun küçük olmasıdır. *A.fumigatus*'un konidyumları 2-3.5 µm çapında iken, *A.flavus*'un konidyumları 3-6 µm, *A.niger*'in konidyumları ise 4-5 µm çapındadır. Konidyum, alveollere ulaştıktan sonra pulmoner makrofajlar *Aspergillus* konidyumlarını fagosite eder ve öldürür. Hifal germinasyondan sonra ise polimorfonükleer lökositler hem şişmiş konidyumların hem de hiflerin yok edilmesinde rol oynar^{1,7}. Trombositlerin *A.fumigatus* hiflerinin hücre duvarına tutunduğu, tutunmayla birlikte aktive olduğu ve duvarı harap ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, trombositlerin aktivasyonu

polimorfonükleer lökositlerin *A.fumigatus*'a karşı etkinliklerinin arttığı da bildirilmiştir⁸. *Aspergillus* türlerine karşı konak savunmasının yetersiz kaldığı durumlarda *Aspergillus* türleri ile kolonizasyon ve/veya enfeksiyon gelişebilmektedir. Hematolojik malignansi, kemik iliği nakli, aplastik anemi, AIDS, kronik granülomatöz hastalık, graft-versus-host hastalığı, organ nakli ve romatolojik hastalıklar gibi uzun süre kortikosteroid kullanımı gerektiren durumlar, yanık, kistik fibrozis ve diabetes mellitus *Aspergillus* türleri ile kolonizasyon ve enfeksiyon gelişimi için en önemli risk faktörleridir.

ASPERGILLUS TÜRLERİNİN OLASI VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Aspergillus türlerinin hastalık oluşturabilmesi için, konak dokusuna tutunmasını, dokuya penetrasyonunu ve özellikle fagositik hücreler gibi savunma elemanlarını etkisiz hale getirmesini sağlayan bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. *Aspergillus* cinsi mantarların virülans faktörlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların büyük bir bölümünün *A.fumigatus* üzerinde yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Bir virülans faktörünü tanımlamanın en uygun yöntemi, faktörün varlığında ve yokluğunda etkenin hastalık oluşturma yeteneğinin karşılaştırılmasıdır. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmaların sonucunda; adezinler, pigment oluşturma özelliği, toksik moleküller ve ekstraselüler enzimler *Aspergillus* türlerinde olası virülans faktörleri olarak tanımlanmıştır⁹.

Adezinler:

Aspergillus konidyumları fibrinojen, laminin, kompleman, fibronektin, albümin, immüno globülinler, kollajen ve surfaktan gibi konakta dolaşımda veya bazal membrana bağlı halde bulunan çeşitli proteinlere bağlanırlar¹⁰. Bu bağlanma, özgül olmayan fizikokimyasal etkileşimlerle ve/veya özgül reseptör-ligand tanıma aracılığıyla olabilir. Konidyumların yüzeyindeki karbonhidrat ve protein moleküllerinin konak proteinlerine özgül olarak bağlandığı gösterilmiş; konidyal hücre duvarında fukoz ve sialik aside özgül lektinler tanımlanmıştır¹¹. Konidyumların komplemanla veya mannoz bağlayan protein ve surfaktan gibi diğer proteinlerle opsonizasyonu, konak savunmasının mikroorganizmaya karşı etkinliğini artırabilir. Ancak *A.fumigatus*, patojenitesinin artmasını sağlayan bir kompleman inhibitörü salgılar^{1,12}.

A.fumigatus konidyumu hidrofobik proteinlerden (hidrofobinler) oluşan ve konidyuma hidrofobik özellik kazandıran bir katmanla çevrelenmiştir. Hidrofobik proteinleri içermeyen mutantların hidrofilik olduğu, albumin ve kollajene daha az oranda bağlandığı, bununla birlikte laminin ve fibrinojene bağlanma yeteneğinde azalma olmadığı saptanmıştır. İnvaziv aspergilloz hayvan modellerinde, mutantların virülans ve mortalite oranlarının mutant olmayan suşlarla aynı olduğu; sadece, oluşturduğu akciğer lezyonlarının ve inflamatuvar yanıtın daha sınırlı olduğu gösterilmiştir¹³. Bugüne kadar *Aspergillus*'a özgül adezinlerin hiçbirisi saflaştırılarak elde edilememiştir. Bu nedenle, hastalık gelişiminde oynadıkları roller konusundaki şüpheler, adezyon özelliğinden yoksun bir mutant elde edilip, hastalık oluşturma yetenekleri karşılaştırılıncaya dek devam edecektir⁹.

Toksik Moleküller:

Aspergillus türleri aflatoksin, okratoksin A, fumagilin ve gliotoksin gibi toksik ikincil metabolitler üretmektedir. Bu metabolitlerden üzerinde en fazla çalışılan gliotoksindir. Gliotoksin, akut toksisiteye neden olur ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etki gösterir. Makrofaj fagositozunu inhibe edici, makrofaj DNA'sını parçalayıcı ve makrofajların apoptozunu indükleyici etkileri bulunmaktadır. Ayrıca, T ve B hücrelerinin aktivasyonunu bloke eder. *A.fumigatus* ile enfekte hayvan ve insanlarda saptanan en düşük gliotoksin konsantrasyonu bile in vitro etkinlik gösterecek kadar yüksek düzeydedir^{9,14}. *A.fumigatus* tarafından salınan, mukosiliyer hareketi bozan ve mantarın epitel yüzeyinde daha uzun süre kalmasını sağlayan farklı ikincil metabolitlerin varlığı da gösterilmiştir¹⁵. *A.fumigatus*'ta sekonder metabolitlerin üretilmesinden sorumlu metabolik yollardaki enzimler henüz tanımlanamadığı için, toksin üretmeyen mutantların elde edilerek, toksin üreten suşlarla virülansının karşılaştırılabileceği çalışmalar yapılamamıştır. Ayrıca, bu metabolitleri üretmeyen *Aspergillus* türlerinin de patojen olabilmesi nedeniyle toksik ikincil metabolitlerin aspergilloz patogeneziindeki rolleri tartışılmaya devam etmektedir⁹.

Toksik ikincil metabolitlerin dışında, *A.fumigatus* tarafından ökaryot hücre ribozomunda 28S rRNA yapısındaki fosfodiester bağları yıkabilen bir sitotoksin salgılanmaktadır. Restriktosin veya Asp1 olarak isimlendirilen, konidyal hücre duvarında bulunan bu RNA nükleazın, invaziv aspergilloz olgularının idrarlarında ve dokularındaki nekroz alanlarında saptanması in vivo salınımının olduğuna dair bir kanıt oluşturmaktadır¹⁶. *A.fumigatus* dışında, patojen olmayan *Aspergillus* türlerinde restriktosinin varlığı gösterilebilirken, *A.flavus* gibi diğer patojen *Aspergillus* türlerinde gösterilememiş olması ve restriktosini kodlayan gende hasar oluşturularak elde edilen mutantın, sıçanların akciğer dokusundaki gelişme ve patojenitesinin mutant olmayan suşlarla aynı olması nedeniyle invaziv aspergilloz patogeneziindeki rolleri tartışmalıdır¹⁷. Bununla birlikte, restriktosinin immünojenik özelliği, *A.fumigatus*'a karşı gelişen immün yanıtta ve dolayısıyla alerjik aspergilloz patogeneziinde etkin olabileceğini düşündürmektedir¹⁸.

A.fumigatus tarafından salınan Asp-hemolizin olarak adlandırılan, koyun ve tavşan eritrositeri üzerine in vitro hemolitik aktiviteleri ve makrofaj ve endotelial hücreler üzerine sitotoksik etkileri olduğu saptanan hemolizinler de olası virülans faktörleri arasında sayılmaktadır. İn vivo deneysel enfeksiyon sırasında, bu toksinin saptanabildiği ve dolayısıyla patogeneziyle ilişkili olduğu yorumları yapılsa da, toksinin söz edilen sitotoksik etkilerinin in vivo saptanabildiğine ilişkin sonuçlar henüz elde edilememiştir⁹.

A.flavus ve *A.parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksin olan aflatoksin tarım ürünlerinde önemli bir kontaminanttır. Hayvan modellerinde aflatoksinin karsinojenik etkileri olduğu, aflatoksinle kontamine gıdaların ağız yoluyla kronik olarak alınmasının hepatoselüler kanser gelişiminde rolü olabileceğine ilişkin bildirimler bulunmakla birlikte, insan aspergilloz olgularında virülans faktörü olarak henüz kabul görmemiştir¹⁹.

Pigmentler:

A.fumigatus'un pigmentsiz sokak suşlarının patojenitesi, yeşil renkte konidyumları olan suşlara göre daha azdır. Dihidroksinaftalen melanin biyosentezinde işlev gören poliketid sentaz ve sitalon dehidrataz enzimlerini kodlayan *alb1* ve *arp1* genleri yakın zamanda klonlanmıştır. Genlerin hasara uğratılmasıyla elde edilen beyaz renkli *A.fumigatus* konidyumlarının, komplemana daha kuvvetli bağlandığı ve duvarının daha geçirgen olduğu gösterilmiştir^{20,21}. Bu veriler, melanin üreten *Cryptococcus neoformans* suşlarında, melaninin mantar hücresini konak savunma mekanizmalarından koruduğu ve mantarın in vivo sağkalımını artırdığı yönündeki bulguları hatırlatmaktadır²². Bununla birlikte, steroid uygulanmış farelere pigment oluşturmeyen *Aspergillus* konidyumlarının verilmesiyle invaziv aspergilloz gelişebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, pigment oluşturma özelliğinin virülans faktörü olarak kabul edilmesi konusu tartışmalıdır⁹.

Enzimler:

Aspergillus türlerinin kendi besin gereksinimini karşılayabilmek için organik maddeleri degrade edebilen bazı enzimleri salgılayabildikleri gösterilmiştir. Bu ekstraselüler enzimlerin, konaktaki yapısal bariyerlerin yıkımında rol oynayabileceği düşüncesi pek çok çalışmaya konu olmuştur. Konak hücre membranları protein ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Bu nedenle, aspergilloz patogenezinde *Aspergillus* türlerinin proteinaz ve fosfolipaz aktivitesine sahip enzimleri üzerinde önemle durulmaktadır^{23,24}.

Proteinazlar, proteinlerin peptid bağlarını (CO-NH) kıran ve peptid veya serbest aminoasitlerin oluşmasına neden olan reaksiyonları kataliz eden enzimlerdir. İnsan pulmoner hücre dizisinde, *A.fumigatus* tarafından üretilen proteinazların proinflatuvar sitokinlerin salınımını indüklediği ve solunum yolu epitel hücrelerinin ayrılmasına neden olduğu gösterilmiştir²⁵. Virülanstaki rolleri konusundaki çalışmalar *A.fumigatus*'un ekstraselüler proteinazlarından elastinolitik alkalen proteinaz, aspartik (asit) proteinaz ve metalloproteinaz üzerinde yoğunlaşmıştır.

Elastin, çeşitli doku ve organlarda bulunan, hidrofobik, çözünür olmayan bir bağ dokusu proteindir. Kan damarlarının medial tabakasını oluşturmasının yanı sıra, akciğer, bağ dokusu, tendon, kıkırdak, meme dokusu ve derinin esnekliğini sağlayan bileşenidir. Elastin, akciğer dokusunun %28'ini oluşturan majör yapısal bileşenlerinden biri olduğu için, *Aspergillus* türlerinin elastinolitik aktiviteye sahip proteinazlarının (elastaz) akciğer dokusuna invazyonunda önem taşıdığı kabul edilmektedir^{23,26}.

Aspergilloz patogenezinde elastaz aktivitesinin olası rolü ile ilgili ilk çalışma 1984 yılında yayınlanmıştır. Elastaz aktivitesine sahip olan ve olmayan çevresel *A.fumigatus* izolatları immün kompromize fare modellerinde invaziv pulmoner aspergilloz gelişimi açısından karşılaştırılmıştır. Elastaz aktivitesine sahip olmayan suşların avirulan olduğu saptanırken, elastaz üreten suşların farelerde 48-96 saat içinde ölüme neden olduğu ve akciğer dokusunda hifal yapıların ve alveoler nekrozun saptandığı bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlarla, elastaz üretiminin

A.fumigatus tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörü olabileceği yorumu yapılmıştır²³. Başka bir çalışmada elastaz aktivitesi, klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* türlerinde araştırılmış, invaziv hastalıktan sorumlu olan tüm suşların elastaz aktivitesine sahip olduğu gösterilirken, elastaz üreten her suşun invaziv hastalık tablosundan sorumlu olmadığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, elastaz aktivitesinin varlığı tür düzeyinde de incelenmiş ve *A.fumigatus* ve *A.flavus* izolatlarının %90'ından fazlasında elastaz aktivitesinin pozitif olduğu saptanmıştır²⁷. Klinik ve çevresel *A.fumigatus* izolatlarında elastaz aktivitelerinin araştırıldığı ve suşların elastaz aktivite indekslerinin (EAI) belirlendiği bir çalışmada, EAI için belirlenen sınır değerin üzerinde EAI'ye sahip olan suşların invaziv hastalık tabloları ile ilişkili olduğu, belirlenen sınır değerin altında EAI'ye sahip suşların ise invaziv hastalıktan sorumlu olma olasılıklarının çok düşük olduğu sonucuna varılmıştır²⁸. Klinik örneklerden izole edilen *A.fumigatus*, *A.flavus* ve *A.niger* suşlarında elastaz aktivitesinin araştırıldığı ve EAI'nin belirlendiği başka bir çalışmada ise, elastaz aktivitesi *A.fumigatus* ve *A.flavus* izolatlarında sırasıyla %95.6 ve %82.6 oranında saptanırken, *A.niger* izolatlarında elastaz aktivitesi saptanmamıştır. Aynı çalışmada, invaziv hastalıktan sorumlu suşlarda EAI'nin yüksek olduğu, ancak yüksek EAI'ye sahip her suşun invaziv hastalıktan sorumlu olmadığı sonucuna varılmıştır²⁹.

Aspergillus türlerinde enzimatik aktivite varlığının ve düzeyinin patojenitedeki rollerinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmalarda, enzim üretebilen suşların virülansı ile enzimatik aktiviteye sahip olmayan suşların veya farklı düzeylerde enzimatik aktiviteye sahip suşların virülansı karşılaştırılmıştır. Ancak bu çalışmalarda, enzimatik aktiviteleri belirlenen suşların, hastalık patogenezinde rol oynayabilecek diğer olası virülans faktörleri açısından sahip oldukları özellikler bilinmemektedir. Virülans, birden fazla faktörün birarada etkimesiyle ortaya çıkan bir sonuç olabilir. Moleküler biyolojik tekniklerin gelişmesiyle *A.fumigatus*'ta elastinolitik alkalin proteinazların, asit proteinazların ve metalloproteinazların üretiminden sorumlu bazı genler tanımlanmış ve klonlanmıştır³⁰⁻³². Elastinolitik alkalin proteinazı kodlayan gende (*AFA/p*) hasar oluşturularak elde edilen, ekstraselüler elastinolitik alkalin proteinaz salgılamayan *A.fumigatus* suşlarının steroid uygulanan farelerde invaziv pulmoner aspergilloz gelişimine neden olduğu ve fungal invazyonun gözlemlendiği dokuda elastin yıkımının varlığı gösterilmiştir³³. Bu sonuç, elastinolitik alkalin proteinazın aspergilloz patogenezindeki olası rolüne gölge düşürmektedir. Ancak, *AFA/p* geninde hasar oluşturulan suştan elastinolitik asit proteinazlar salınmış ve dokuda elastin yıkımı ortaya çıkmış olabilir. Asit proteinazın *A.fumigatus*'tan pürifiye edildiği ve invaziv pulmoner aspergilloz nedeniyle kaybedilmiş olan bir hastanın akciğerinde in vivo salınımının immüno floresans yöntemiyle gösterildiği bildirilmiştir³⁴.

A.fumigatus'un ekstraselüler proteinazlarına homolog enzimlerin salınımının *A.oryzae*, *A.sojae* ve *A.niger* gibi nadiren invaziv aspergilloza neden olan suşlarda da saptanması; *A.fumigatus*'tan salınan elastazın monoklonal antikorlarla inhibe edilmesi durumunda, immün kompromize farelerde virülans azalma saptanmamış olması ve asit proteinaz aktivitesinden yoksun mutantların da hayvan modellerinde virülans olduğunun gösterilmesi, ekstraselüler elastinolitik proteinazların aspergilloz patogenezindeki rollerinin tartışılmaya devam etmesine neden olan diğer deneysel bulgulardır^{9,35,36}.

Fosfolipaz terimi, gliserofosfolipidlerdeki bir veya birden fazla ester bağına yıkabilen farklı enzimlerin oluşturduğu bir grup için kullanılmaktadır. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipidleri hedef almaktadır. Bununla birlikte, her enzim farklı bir ester bağına yıkmaktadır. Fosfolipazlar, fosfolipid molekülünde hedefledikleri özgül bağa göre A, B, C ve D olarak sınıflandırılırlar^{37,38}.

A.fumigatus'un ekstraselüler fosfolipaz aktivitesinin saptandığı ilk çalışma, 1996 yılında yayınlanmış ve *A.fumigatus*'un fosfolipaz A, B, C ve D aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir³⁸. Çevresel ve klinik *A.fumigatus* izolatlarının ekstraselüler fosfolipaz aktiviteleri karşılaştırıldığında, çevresel ve klinik izolatların tümünde fosfolipaz aktivitesinin gözlemlendiği, ancak klinik izolatların çevresel izolatlara göre fosfolipaz C aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir²⁴. Klinik örneklerden izole edilen *A.fumigatus*, *A.flavus* ve *A.niger* suşlarında ekstraselüler fosfolipaz aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, çalışmaya dahil edilen *A.flavus* izolatlarında fosfolipaz aktivitesi saptanmazken, *A.fumigatus* ve *A.niger* izolatlarının tümünde fosfolipaz aktivitesinin varlığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olan suşlar invaziv hastalık tabloları ile ilişkili bulunurken, invaziv hastalık tablosundaki hastaların tümünden izole edilen suşlarda yüksek fosfolipaz aktivitesinin izlenemediği saptanmıştır²⁹. Ekstraselüler fosfolipaz üretiminin, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan bakteriyel enfeksiyonların patogenezinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir³⁹. Aspergilloz patogenezinde fosfolipazın rolü ile ilgili net bir açıklamaya rastlanmamıştır. Ancak, *Clostridium* türleri tarafından oluşturulan nekrotizan fasiit ve gazlı gangrenin ve *Pseudomonas* türlerinin neden olduğu ektima gangrenosumun oluşum mekanizmalarıyla, invaziv aspergillozda izlenen kan damarlarının oklüzyonu, doku infarktı ve nekroz gelişimiyle giden tablonun oluşum mekanizmaları arasında büyük benzerlikler bulunduğu belirtilmektedir^{24,38}. İnvaziv aspergillozda, etkenin alveoler hücreler ile temasa geçebilmesi için surfaktanı aşabilmesi gerekmektedir. Akciğerde alveoler boşlukları çevreleyen surfaktanın %80'inin fosfolipidlerden oluştuğu ve surfaktanın fosfolipazlar tarafından yıkılmasıyla *Aspergillus* türlerinin kolonizasyonuna uygun bir ortam sağlanabildiğinden söz edilmektedir²⁴. Yakın zamanda, *A.fumigatus*'ta fosfolipaz B üretiminden sorumlu üç farklı gen tanımlanmış ve klonlanmıştır. Bu genlerin hasara uğratılmasıyla fosfolipaz B üretmeyen *A.fumigatus* suşlarının elde edilmesi ve fosfolipaz B üreten suşlarla virülanslarının karşılaştırılabileceği çalışmalar planlanması mümkün olabilecektir⁴⁰.

S O N U Ç

Bağışıklık sistemi baskılanmış konakta yüksek mortaliteyle seyreden enfeksiyonlara neden olabilen *Aspergillus* türlerinin virülans faktörlerinin bilinmesi, neden olduğu enfeksiyonlardan korunmaya ve enfeksiyonun tedavisinde virülans faktörlerini hedef alan yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir. *Aspergillus* türlerinin virülans faktörlerinin saptanabilmesi amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, virülansın multifaktöriyel olduğunu düşündürmektedir. Eğer bu hipotez geçerli ise, patogenezele ilişkili olası virülans faktörünün sentezini kodlayan gen topluluğunu kontrol eden düzenleyici

genler tanımlanıp, mutasyona uğratılmadıkça, tek gen delesyonu deneylerine dayalı bir strateji etkenin virölans çalışmaları için uygun bir yöntem olarak kabul edilemeyecektir. *Aspergillus* türlerinin virölans faktörlerinin belirlenmesi için yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. İn vivo gen ekspresyon teknolojisi gibi, bakteriyel patogeneze çalışmaları için geliştirilen yöntemlerin *Aspergillus* enfeksiyonlarına uyarlanması bir seçenek olabilir. Henüz çalışmaların devam ettiği *A.fumigatus* genom projesi tamamlandığında, "microarray" teknolojilerinin kullanılmasıyla, virölansla ilişkili genler ve etkenin hastalık oluşturma mekanizmaları konusunda daha net bilgilerin elde edilebilmesi mümkün olacaktır. Ancak, *Aspergillus* türlerinde virölansın, hastalıkla ilişkili özgül proteinlerin ekspresyonundan çok, konağın immün durumuna ve etkenin konağın savunma mekanizmalarına karşı koyabilme gücüne bağlı olabileceği de unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Patterson TF. *Aspergillus* species, pp: 2958-73. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. www.doctorfungus.org
3. Sentandreu, R, Elorza MV, Valentin E, Ruiz-Herrera J. The structure and composition of the fungal cell wall, pp: 3-39. San-Blas G, Calderone RA (eds), Pathogenic Fungi, Structural Biology and Taxonomy. 2004. Caister Academic Press, Norfolk.
4. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, et al. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. Blood 2003; 101: 2542-6.
5. Allo MD, Miller J, Townsend T, Tan C. Primary cutaneous aspergillosis associated with Hickman intravenous catheters. N Engl J Med 1987; 317: 1105-8.
6. Arikan S, Uzun O, Cetinkaya Y, Kocagoz S, Akova M, Unal S. Primary cutaneous aspergillosis in human immunodeficiency virus-infected patients: two cases and review. Clin Infect Dis 1998; 27: 641-3.
7. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 781-805.
8. Christin L, Wysong DR, Meshulam T, Hastey R, Simons ER, Diamond RD. Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils. Infect Immun 1998; 66: 1181-9.
9. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-50.
10. Wasylnka JA, Moore MM. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. Infect Immun 2000; 68: 3377-84.
11. Bouchara JP, Sanchez M, Chevailler A, et al. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. Infect Immun 1997; 65: 2717-24.
12. Washburn RG, Hammer CH, Bennett JE. Inhibition of complement by culture supernatants of *Aspergillus fumigatus*. J Infect Dis 1986; 154: 944-51.
13. Thau N, Monod M, Crestani B, et al. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun 1994; 62: 4380-88.
14. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 497-516.
15. Amitani R, Taylor G, Elezis EN, et al. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. Infect Immun 1995; 63: 3266-71.

16. Lamy B, Moutaouakil M, Latge JP, Davies J. Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. *Mol Microbiol* 1991; 5: 1811-5.
17. Smith JM, Davies JE, Holden DW. Construction and pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants that do not produce the ribotoxin restrictocin. *Mol Microbiol* 1993; 9: 1071-77.
18. Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp1, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol* 1992; 149: 3354-9.
19. Robens JF, Richard JL. Aflatoxins in animal and human health. *Rev Environ Contam Toxicol* 1992; 127: 69-94.
20. Tsai HF, Chang YC, Washburn RG, Wheeler MH, Kwon-Vhung KJ. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* 1998; 180: 3031-8.
21. Tsai HF, Washburn RG, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol Microbiol* 1997; 26: 175-83.
22. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-488.
23. Kothary MH, Chase T Jr, Macmillan JD. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* 1984; 43: 320-5.
24. Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2004; 42: 81-6.
25. Tomee JF, Wierenga ATJ, Hiemstra PS, Kaufmann HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis* 1997; 176: 300-3.
26. Starcher BC. Elastin and the lung. *Thorax* 1986; 41: 577-85.
27. Rhodes JC, Bode RB, McCuan-Kirsch CM. Elastase production in clinical isolates of *Aspergillus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 10: 165-70.
28. Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, et al. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1811-3.
29. Özyavuz Alp Ş. Klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* suşlarında ekstraselüler elastaz, asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitelerinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, 2005.
30. Jatón-Ogay K, Suter M, Crameri R, Falchetto R, Fatih A, Monod M. Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 71: 163-8.
31. Lee JD, Kolattukudy PE. Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus* and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung. *Infect Immun* 1995; 63: 3796-803.
32. Jatón-Ogay K, Paris S, Huerre M, et al. Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 1994; 14: 917-28.
33. Tang CM, Cohen J, Krausz T, Van Noorden S, Holden DW. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993; 61: 1650-6.
34. Reichard U, Eiffert H, Ruchel R. Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 427-36.

35. Frosco M, Chase T, McMillan JD. The effect of elastase-specific monoclonal and polyclonal antibodies on the virulence of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised mice. *Mycopathologia* 1994; 125: 65-76.
36. Reichard U, Monod M, Odds F, Ruchel R. Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 189-96.
37. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-43.
38. Birch M, Robson G, Law D, Denning DW. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1996; 64: 751-5.
39. Schmiel DH, Miller VL. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microb Infect* 1999; 1: 1103-12.
40. Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, Grillot R, Robson G, Brugere JF. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 239: 87-93.