

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS'IN VİRÜLENS FAKTÖRLERİ *

A. Serda KANTARCIOĞLU, Ayhan YÜCEL

Background.- *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated fungus and is a significant human pathogen. In this review the current knowledge of host-fungus interactions is discussed and the characteristics it must possess to enter the host and establish progressive disease; such as the polysaccharide capsule, melanin production, mannitol secretion, superoxide dismutase, proteases and phospholipases and it is emphasized the relationship between a study of experimental cryptococcosis done by authors to obtain large encapsulated yeast cells.

Kantarcioğlu AS, Yücel A. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Cerrahpaşa J Med 2003; 34: 42-50.

C*ryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) Vuillemin 1901; heterobasidiomisetlerden anamorf, hem dokuda hem de kültürde kapsüllü maya hücreleri üretebilen bir mantardır; bu hücreler solunum yoluyla alındığında alveollerde birikip kan yoluyla yayılarak kriptokokkoza yol açmaktadır. Genetik, ekoloji ve bazı biyokimya özellikleri farklı olan *C.neoformans* var.*neoformans* ve *C.neoformans* var.*gattii* olmak üzere iki varyetesi ve bunların da kapsül antijenlerine, aglütinasyon ve immunofluoresans deneylerine göre farklılıklar gösteren var.*neoformans*'da serotip A, D ve AD; var.*gattii*'de serotip B ve C olmak üzere serotipleri bulunmaktadır.¹⁻⁵ Son zamanlarda ortaya çıkarılan iki genotip farklılığı ve daha önce bildirilen fenotip ayrılıkları dikkate alınarak *C.neoformans* var.*grubii* olarak yeni bir varyete önerilmiş^{6,7}, serotip A ve D izolatlarının *grubii* ve *neoformans* olarak bilinen iki varyeteye ayrılması yapılmıştır.⁶

C.neoformans var.*neoformans* dünyanın her yerinde, kuş, güvercin ve tavuk pislikleri ile zenginleşmiş topraklardan sıklıkla ayrılabilir. *C.neoformans* var.*gattii*'nin kuş gübresi bulunan topraklardan ayrıldığı henüz hiç bildirilmemiştir; bu varyetenin doğal yaşam ortamı *Eucalyptus camadulensis* ve *E.tereticornis* türü sakız ağaçlarıdır ve bu ağaçların bulunduğu bölgelerde bu varyete ile gelişen kriptokokkoz olguları yazılmıştır.^{2,4,5,8,9}

Maya şeklinde var.*gattii* hücreleri daha oval olsa da bu iki varyeteyi morfolojik olarak ayırmak olası değildir. Varyeteler arasındaki güvenilir morfoloji farkı teleomorf aşamalarıdadır. Kwon Chung *C.neoformans*'ın - α ve a olarak ayrılan iki çaprazlama tipi olduğunu; bu iki tipin belirli fakir besiyerlerinde çaprazlanmasıyla teleomorf bir basidiomisetin geliştiğini bulmuş; bu tam şekil *Filobasidiella* cinsinde sınıflandırılmıştır. Mantarın yaşam çevriminde eşeysiz ve eşeyli iki farklı şekil vardır. Eşeysiz şekil maya hücrelerinden oluşur ve tomurculanarak ürer. Bu haploid bir hücreli maya şekli *C.neoformans*'ın doğadan ve insan infeksiyonlarından elde edilen biricik şeklidir. - α ve a çaprazlama tipleri arasındaki konjugasyon sonucunda kanca bağlantılar yapabilen dikaryotik hiflerden oluşan teleomorf şekil gelişir; bazı hifler basidyum denen özelliştirmiş yapılar geliştirirler ve eşeyli cins Basidiomycota'da yer almaktadır. Serotip A ve D kökenleri çaprazlandığında gelişen teleomorf şekil *Filobasidiella neoformans* var.*neoformans* ve B ve C kökenleri çaprazlandığında *Filobasidiella neoformans* var.*bacillispora* olarak adlandırılmaktadır. Doğadan ve hastalardan ayrılan kökenler içinde α çaprazlama tipinin a'dan fazla olduğu görülmektedir.^{2,4,5,10}

Bu mantarın doğada eşeyli üreyip üremediği bilinmemektedir; teleomorf aşama doğrudan doğada hiç gözlemlenmemiştir. Bir kısım araştırmacılar mantarın tam şeklinde üretilen basi-

* **Anahtar Kelimeler:** *Cryptococcus neoformans*, virürens faktörleri, kapsül, melanin, mannitol, proteazlar, fosfolipazlar; **Key words:** *Cryptococcus neoformans*, virulence factors, capsule, melanin, mannitol, proteases, phospholipases; **Alındığı Tarih:** 10 Ocak 2001; A. Serda Kantarcioğlu, Prof. Dr. Ayhan Yücel: İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul; **Yazışma Adresi (Address):** Prof. Dr. Ayhan Yücel, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

diosporların insan infeksiyonlarına sebep olan infeksiyöz parçacıklar olduğu hipotezini savunmaktadırlar. Bunlar maya hücrelerinden daha küçük (1-2 µm) ve çok ince kapsüllüdürler ve solunum ile alveollere kadar varabilirler.⁴

Konağın Bağışıklık Durumu

C.neoformans doğa kaynaklı bir mantardır; insanın normal florasına ait bir üye değildir, genelde solunum yoluyla vücuda girer. Maya hücreleri solunum epiteli tarafından atılmazsa alveollere ulaşır. Akciğerde bir süre oturduktan sonra kan yoluyla dokulara ve beyine doğru yayılır ve konağın T hücrelerine bağımlı bağışıklık yanıtı yetersizse ve tedavi edilmezse yaşamı tehdit edebilen meningoensefalitlere sebep olur. *C.neoformans* bağışıklığı bozuk olanlarda ve bağışıklığı tam kimselerde hastalığa sebep olabilmektedir.^{2,11,12}

Kriptokokkozun patogenezi henüz tam açıklanamamıştır. Maya hücreleri alveollere vardığında ilk bağışıklık yanıtı alveoler makrofajlardandır; hastalık gelişip gelişmeyeceği bu aşamada belli olur. Bunu makrofajlar ve lenfositlerden aktive olan polimorf nüveli lökositler izler. Hayvan deneyleri ve hastalardan edinilen deneyimler; bağışıklık sisteminin koruyucu bileşiklerinin başlıca aktive edilmiş alveoler makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler ile hem CD4+ hem de CDS+ limfositlerden oluşan hücre aracılığıyla olduğunu göstermektedir. In vitro deneylerde de alveoler makrofajlardan başka, insan nötrofil ve monositlerinin, mikrogial hücrelerinin, NK hücrelerinin ve T lenfositlerinin de hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarla kriptokokları öldürebildiği veya üremesini önleyebildiği gözlemlenmiştir. Konağın hücrel bağışıklık yanıtı iyi işliyorsa makrofajlar aktive olur ve mikroorganizmayı çevreleyip öldürür, sonuç olarak hastalık gelişmez.^{4,13-15}

Bağışıklık sistemi kriptokokkoza karşı etkili ve iyi düzenlenmiş yanıt veren bireylerde infeksiyon granümatöz tip lezyonlarla sonuçlanabilmektedir. Bu sebeple bağışıklığı tam bireylerde semptomatik primer akciğer infeksiyo-

nu enderdir. Bu mantarın yeryüzünde her yerde bol bulunabilmesine karşın kriptokokkozun seyrek olmasından da subklinik primer infeksiyonların toplumda olağan olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Bağışıklığı tam kimselerde primer infeksiyon sırasında inokulum miktarı ile semptomatik oluş arasındaki ilişki üzerinde de durulmaktadır. Postmortem çalışmalarda önceden solunum yolu yakınması olmayan kişilerde akciğer odaklarının varlığı gözlemlenmiştir.⁴

Hücrel bağışıklık yanıtı bozukluğuna bağlı olarak makrofaj aktivasyonu olmazsa infeksiyon ortaya çıkabilir; mantar akciğerlerden kana geçebilir ve başta merkez sinir sistemi olmak üzere deri kemik, prostat ve göz gibi organlara yayılabilir. *C.neoformans* insanda nörotropizm de göstermekte ve meningoensefalite sebep olabilmektedir. Kriptokokkozun yaygın ve akut şekli hücre aracılığıyla bağışık yanıtı etkili olmayan AIDS'lilerde görülmektedir. Bağışıklığı bozulmuş kimselerde dissemine kriptokokkoz ya latent infeksiyon şeklinde veya primer infeksiyondur.^{4,14,16}

Kriptokokkozda bağışıklık sisteminin en önemli kolu hücre aracılığı ile bağışıklık ise de *C.neoformans*'a karşı oluşan antikorlar da koruyucu olabilir. Fare deneylerinde kapsüle karşı monoklonal antikorlarla pasif bağışıklamanın koruyucu olduğu gözlemlenmiştir.⁴ *C.neoformans* ile konak arasındaki ilişkinin dinamikleri henüz tam olarak çözülememiştir. Herhangi bir hazırlayıcı faktör saptanamadığı durumlarda bile bazı hücrel bağışıklık parametrelerinin bozuk olabileceği öne sürülmüş; hücrel bağışıklığın çok önemli olduğu bilinmesine karşın, özellikle AIDS'li çocuklarda kriptokokkoz görülmemesine dayanılarak başka faktörlerin de rol oynadığı düşünülmüş; infeksiyonun ortaya çıkışında, konak savunmasının yanı sıra, mantarın virülensinin ve inokulum miktarının da önemli olduğu yazılmıştır.^{11, 17}

C.neoformans bağışıklığı tam konaklarda derin mikozlara sebep olabilirken¹⁸⁻²¹; bağışıklığı baskılanmış kimselerde yaşamı tehdit eden infeksiyonlar oluşturabilir.^{2,5} Bağışıklığı yetersiz kimseler kriptokokkoza bağışıklığı tam olanlardan daha duyarlı olduklarından *C.neoformans* ekseri fırsatçı patojen olarak nitelen-

dirilmiştir. Bir organizmanın patojen olarak sınıflandırılması için belirli koşullarda infeksiyona sebep olabilmesi gerekmektedir. Bu tanıma göre *C.neoformans*'ı kesinlikle patojen mantarlar sınıfına yerleştirecek faktörler başlıca iki grupta toplanmaktadır. Birinci grupta bir infeksiyonu başlatmak için gerekli temel karakteristikler ve ikincide patojenlik derecesini etkileyen virülens faktörleri yer almaktadır.^{16,22}

Temel Patojenlik Özellikleri

İnfeksiyöz Parçacıklar

Bir mikroorganizmanın akciğerin alveol boşluklarında girebilmesi ve akciğer infeksiyonu oluşturabilmesi için çapı 4 µm'den daha küçük olan canlı parçacıklar üretebilmesi gerekir. *C.neoformans*'ın tipik vejetatif şekli hücre çapı 2.5-10 µm olan maya hücreleridir. Eşey sporları olan basidiosporlar yaklaşık 1.8-3 µm çapındadırlar ve hem kuru maya hücreleri hem de basidiosporlar akciğerlere girmeye uygun boyuttadırlar. Doğada yüksek glukoz veya yüksek tuzlu koşullarda *C.neoformans* kapsülsüz veya ince kapsüllü olarak gelişebilir ve akciğere girmeyi kolaylaştırır. Kuru maya hücreleri akciğerlerde bünyesine su alarak karakteristik geniş polisakkarit kapsül geliştirirler; basidiosporlar ise kapsülsüz blastokonidilere dönüşürler.²²

Anabilim Dalımız Derin Mikoz Laboratuvarı'nda yapılan bir çalışmada; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Özel Servisinde yatmakta olan Trombotic Trombocytopenia Purpura'lı 27 yaşındaki bir erkek hastada gelişen kutanöz kriptokokkozdan elde edilen *C.neoformans* kökeni ile standartlaştırılmış süspansiyon² hazırlanarak peritondan ve kuyruk veninden intravenöz verilen maya hücreleri ile deney farelerinde infeksiyon geliştirilmiş ve daha sonra otopsi yapılarak doku ve organlarından köken karakteristik geniş kapsüllü şekilde elde edilmiştir (Şekil 1 ve 2).

Çaprazlama Tipleri

C.neoformans heterotalliktir ve bu özellik ilk önce serptip D kökenlerinde ortaya çıkarılmıştır. Serotip D'nin karşıt çaprazlama köken-

leri çaprazlandığında genetik analizlerle α ve a kökenlerin oranının 1:1 olduğu gösterilmişse de, ortamdaki veya klinik kaynaklardan a çaprazlama tipinin elde edilmesi nadirdir. Yeryüzünde hem ortamdaki hem de klinik kaynaklardan en sıklıkla elde edilen *C.neoformans var. neoformans*'ın serotip A kökenleridir dolayısıyla serotip A'nın a çaprazlama tipinin izolasyonu ile ilgili bir bildirim bulunmamaktadır. Bu durum α çaprazlama tipinin doğada ve konak dokusunda canlılığını sürdürmek için daha uygun olduğunu göstermektedir.³ Kwon-Chung ve Bennett,²³ ortamdaki ve klinik kaynaklardan elde edilmiş *C.neoformans* kökenlerinin çaprazlama tipleri araştırmışlar ve α çaprazlama tipinin frekansını a tipinden 30-40 kat daha yüksek bulmuşlardır. Kwon-Chung ve ark.¹ farelere injekte ederek yaptıkları bir çalışmada α çaprazlama tipinin virülensinin a tipininkinden daha yüksek olduğunu saptamışlardır. 10⁶ α çaprazlama tipi ile infekte edilen farelerin %80'i 36 günde ölmüş; aynı miktar a çaprazlama tipi ile infekte edilenlerin %80'inin ölmesi 93 gün sürmüştür.¹

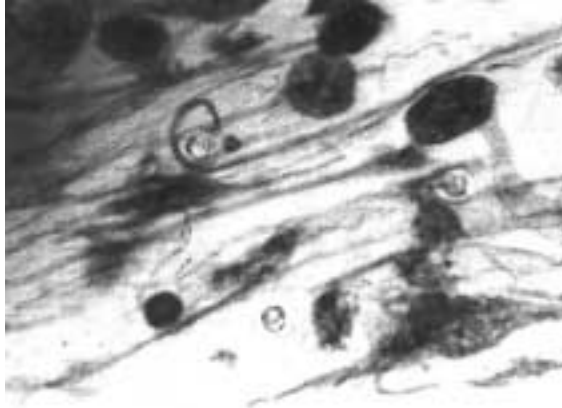


Şekil 1. *C.neoformans*, bir kutanöz kriptokokkoz olgusundan elde edilmiş klinik kökenden hazırlanan preparatta ince kapsüllü maya hücreleri (Giemsa preparatı) (x1900) (Mikrofotografi Yücel ve Kantarcıoğlu)

In Vivo Gelişme

Bir *C.neoformans* kökeni insanda infeksiyona yol açmak için 37°C'de yaklaşık %5 CO₂'li atmosferde ve pH 7.3-7.4'de gelişebilir. 37°C'de canlı kalabilmek için *C.neoformans*, bir katalitik altbirim olan kalsineürin

A'yı kodlayan bir gene sahip olmalıdır. *C.neoformans*'ın kalsineürin A mutant kökeni 24°C'de gelişebilse de *in vitro* 37°C'de %5 CO₂'de veya alkali pH'da canlı kalmazlar. Bunlar konak dokusundaki koşullara benzer olduğundan kalsineürin A mutantın insan vücudunda canlı kalamayacağını belirtir. Kaynağında belirtildiğine göre Odom ve ark. bu saptamadan hareketle yaptıkları deneylerinde böyle mutantların bağışıklığı baskılanmış farelerde patojen olmadığını göstermişlerdir. Kalsineürin A *C.neoformans*'ın konak dokusunda canlı kalabilmesi için temel gereksinim ve mantarın patojenliği için gerekli faktör olarak görülmektedir.^{22, 24}



Şekil 2. *C.neoformans*, kutanöz kriptokokkoz olgusundan elde edilen köken kullanılarak deney farelerinde geliştirilen infeksiyon: fare karaciğer dokusunda gelişen geniş polisakkarit kapsüle sahip hücreler (Giemsa preparatı) (x4800) (Mikrofotografi Yücel ve Kantarcioğlu)

Virülens Faktörleri

Virülens faktörleri bir mikrobun patojenlik derecesini artırır. *C.neoformans*'ın bir çok virülens faktörü vardır ve bir kökenin virülensi tek bir faktöre bağlanamamakta fakat hepsinin birleşerek hastalığın ilerlemesine sebep oldukları düşünülmektedir. Bu yazıda her virülens faktörü ayrı olarak incelenmekle beraber, konaktaki hastalığın ciddiyeti birkaç virülens faktörünün kombinasyonunun ve bağışık direnç durumunun sonucudur.²²

C.neoformans'ın virülens faktörleri; kapsül, kriptokoklara özgü ürünler, melanin üretimi, mannitol üretimi ile henüz spekülative sayılan potansiyel faktörler (süperoksit dismutaz, proteazlar, fosfolipaz B ve lizofosfolipaz)'dir. Polisakkarit kapsül ve *C.neoformans*'ın çözülebilir hücre dışı bileşikler olan "kriptokoklara özgü ürünler" olasılıkla dominant virülens faktörleridir.^{22,24}

Kapsül

C.neoformans'ın kapsülü başlıca yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkarit glukuronoksilomannan (GKM) adını alır ve dört serotipi bulunmaktadır; *C.neoformans* var.*neoformans*'ın ürettiği A ve D ile *C.neoformans* var.*gattii*'nin ürettiği B ve C. Bu kapsülün *C.neoformans* için anahtar virülens faktörü olduğu gösterilmiştir; kapsüllü kökenler değişen derecelerde virülense sahip olup kapsülsüz mutantlar tipik olarak avirülanlardır.^{3,15,22,24} CAP64 geni üzerinde yapılan çalışmaların da benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir.^{3,22} Henüz biyokimya işlevleri tam olarak belirlenememişse de; kapsül oluşumu ve virülens için esas olan iki gen saptanmıştır.²²

Lökositlere Kemotaktik Etki

C.neoformans'ın kapsülünün bir kısım özelliklerinin konağın bu mikroorganizmayı daha etkili şekilde tanımasını sağladığı; buna karşın başka özelliklerinin de onu konak savunmasından koruduğu yazılmıştır. Serotip A ve D kökenlerin kapsülü nötrofiller için kemotaktiktir. Ayrıca, kriptokokların kapsülü alternatif yoldan komplement bağlamaktadır ve bu işlem sırasında C5a gibi kemotaktik peptidler üretilir. Bu mekanizmaların biri ile lökositlerin kemotaksisi konağın yararına olur.^{22,25}

Komplement Etkileşimlerinin Rolü

C.neoformans'ın dokuda komplement bağlaması; kemotaktik faktör üretimi ve lökositlerin infeksiyon bölgesine çekilmesi ile sonuçlanır. İnfekte dokuda lökositler bu mantar ile etkileşir ve onu öldürürler. Komplement bağlandığı için, C3b ve C3bi kriptokokun yüzeyinde birikir; bunları kapsül örter fakat tamamen örtülmezlerse biriken komplement komponent-

leri, kriptokokların lökositler üzerindeki CR3 reseptörlerine bağlanmasını kolaylaştırır. Bu bağlanma etkileşimleri konağın yararınadır, lökositlerin kriptokokları hücre dışında veya fagositozdan sonra öldürmesini artırır. Mantar GKM'a karşı gelişen antikorlar tarafından da opsonize edilebilir fakat kapsül antikorun Fc parçasını bloke edebilir ve onun fagositoz yapıcı konak hücrelerinin Fc reseptörlerine bağlanmasını önleyebilir. Bu işlevlerin bir kısmı konağın yararına ise de, eğer kapsül çok genişse organizma korunur. Mantar kendi lehine bir ortam yaratarak konağın komplementlerini tüketebilir.²²

Fagositlere Etki

Tüm ilişkiler dikkate alındığında kapsül konaktan çok mantarın yararınadır. Kapsüllü *C. neoformans* hücreleri nötrofiller, monositler veya makrofajlar tarafından kapsülsüz mutantlar kadar fagosite edilmez ve öldürülmez.²²

Antijen Sunumunda Değişiklik

Makrofajların kapsüllü hücreleri sindirememesinin T hücrelerine antijen sunumunu ve bağışıklık yanıtını da azalttığı deneylerle gösterilmiştir.²⁶ İnsan alveoler makrofajlarıyla yapılan başka çalışmalarda da kapsüllü kriptokokların antijen sunumunun kapsülsüz kökenlerinki kadar etkili olmadığı gösterilmiştir.²²

Sitokin Üretiminin Etkisi

C. neoformans'ın geniş kapsüllü kökenlerinin hücreleri; antifagositik, öldürülmeye daha dirençli ve T hücrelerini daha az uyarır olmalarına ek olarak serumdaki termo-labil bir bileşikle opsonize olur ve monositlerin ve makrofajların TNF α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinler üretmesini kapsülsüz veya zayıf kapsüllü kökenler gibi etkili biçimde uyarmazlar.^{13, 22}

Kriptokoklara Özgü Ürünler

Dissemine kriptokokkozda hastaların vücut sıvılarında ölçülebilir miktarlarda kriptokoklara özgü ürünler bulunur. Vücut sıvılarından başlıca bileşik GKM olsa da bu mantar olasılıkla *in vivo* galaktoksilomannan (GaKM) ve mannoproteinler (MP) de salgılamaktadır. Bu sirkülasyon doğrudan *in vivo* çalışmalarda ve

organizma kültür besiyerinde *in vitro* geliştirildiğinde elde edilen delillere dayandırılmaktadır. Serum veya BOS'da kriptokok antijenleri kriptokokkoz tanımı koydurucudur. Tedavinin başında yüksek kriptokok antijen titresi veren dissemine kriptokokozlu hastaların tedaviye yanıt verme olasılıkları azdır veya düşük antijen titresi verenlere göre daha yüksek bir olasılıkla tedavi tamamlanmadan ölürlür. Vücut sıvılarındaki kriptokok antijeni düzeyi ile hastalığın ciddiyeti arasındaki doğrudan ilişki; konağın sirkülasyon sisteminde veya omurilik sıvısında konak savunmasına aksi etki yapabilir.²²

Lökosit Migrasyonunun Etkisi

Fare modellerinde intravasküler kriptokok antijeninin; lökositlerin kan dolaşımından yangı bölgesine gelmesini engellediği gösterilmiştir. Kriptokoklara özgü ürünler olarak tanımlanmış olan GKM, GaKM ve MP'nin her biri farelere damar içine verildiğinde lökosit migrasyonunun önleyebildikleri gözlemlenmiştir.²² Konağın sirkülasyonunda GKM'nin başlıca kriptokok bileşiği olduğu göz önüne alındığında lökositlerin yangı bölgesine migrasyonunun önlenmesinden de esasen bu maddenin sorumlu olduğu düşünülmektedir.²⁷ Bu bilgiler doğrultusunda; serumunda antijen konsantrasyonu düşük olan veya hiç bulunmayan akciğer kriptokokkozlu hastalarda lökositlerin akciğerin infeksiyon bölgelerine normal olarak ulaştıkları düşünülmektedir.²²

İmmunomodülatör Hücrelerin Birikmesi

Klinik veriler dissemine kriptokokkozda görülen antijeneminin bağışık yanıtı aşağı çektiğini göstermiş bu düşünce kan dolaşımına kriptokok antijeni injekte edilmiş deney hayvanlarıyla da desteklenmiştir.²²

Melanin Sentezi

C. neoformans'ın patojen kökenlerini apatojen olanlardan ve bu cinsin diğer türlerinden ayırt edici bir karakteristik bunların (*Guizotia abyssinica* tohumu özütü veya kafeik asit içeren gibi) difenollü belirli besiyerlerinde siyaha yakın kahverengi bir pigment geliştirebilmelelidir.^{2,22,28,29} Bu pigment ilk kez Staib (1962) tarafından tanımlanmış olup *C. neoformans* kö-

kenlerinin fenol oksidaz aktivitesi ile ürettiği melanine benzer bir bileşiktir. Melaninin mantar ve memelilerin çeşitli proteinlerini bağlayabildiği belirlenmiştir. Melanin protein ilişkisi, çözeltinin pH'sına, proteinin ve melaninin miktarına bağlıdır. Melanin üretiminin *C. neoformans*'ın virülensindeki önemi 1980'lerin başında gösterilmiş; fakat infeksiyonun patogenezindeki rolü tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Doğal olarak oluşan melaninin eksik (Mel⁻) *C. neoformans* mutantların farelerde melanin üretenlerden daha az virulan oldukları gösterilmiştir.^{2,15,22,28}

Biyokimya analizleri *C. neoformans*'da melanogenez; 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) gibi dihidroksifenollerin dopakinona çevrilmesi ile gerçekleşir. Bu dönüşümü fenoloksidaz katalize eder. *C. neoformans*'ın dihidroksifenollerin endojen olarak üretimi için gerekli olan tirozinaz enziminin bulunmadığı gösterilmiştir.²; dolayısıyla *C. neoformans* kökenleri melanin üretmek için difenol bileşiklerini gelişme ortamından almak ve bu bileşiklerin melanine dönüşümünü katalizlemek için fenoloksidaz enzimine sahip olmak zorundadırlar. Beyin; DOPA gibi katekolaminlerden zengin bir dokudur ve *C. neoformans* infeksiyonu için hedef oluşturur. Ancak bu mantar, katekolaminleri tek karbon kaynağı olarak kullanamadığından gelişmek için yeğlediği bir besin nişi de değildir,³⁰ canlı kalabilmesine yarayan bir ortamdır.²²

Melaninin *C. neoformans*'ı hipoklorit ve permanganat tahribinden koruduğu, hidrojen peroksitten korumadığı gösterilmiştir.³⁰ Bu deneylerde hipoklorit, hidrojen peroksitten 100 kat daha fazla fungusit etki göstermiş ve *C. neoformans*'ın makrofajların ürettiği oksitleyici bileşiklerden kendisini etkili biçimde korumaya yetecek düzeyde melanin üretebildiği anlaşılmıştır.³¹ *C. neoformans* hücrelerinin; melaninli maya hücreleri elde etmek üzere L-DOPA ile kültürü yapılmış; aynı kökene ait melaninli kriptokoklar nitrojen ve oksijen türevi oksitleyicilerin tahribine karşı canlılıklarını melaninli olmayanlardan daha iyi sürdürmüşlerdir.³ Bu sonuçlar; *C. neoformans*'ın melanin yapımında beyindeki katekolaminleri kullandığı ve böylece kendisini serbest radikallerin oksitleyici tah-

ribinden koruduğu hipotezini desteklemektedir.^{30,32}

Kriptokokların fenoloksidazı saflaştırılmış ve bu enzimi kodlayan *CNLAC1* geni klonlanmış^{2,3}; enzimin özgül substratının lakkaz olduğu belirlenmiştir.^{25,27-29} *CNLAC1* geninin tahribi *C. neoformans*'da virülens kaybı ile sonuçlanmaktadır. Buna göre *CNLAC1* geninin kodladığı lakkaz (fenoloksidaz) *C. neoformans*'ın potansiyel bir virülens faktörüdür.^{32,33} Melanin üretimi; antioksidan etkisinin yanısıra, *C. neoformans*'ın konak vücudunda canlılığını sürdürmesine başka yollarla da yardımcı olabilir. Melaninli maya hücreleri amfoterisin B'ye melaninli olmayanlardan daha az duyarlıdır ve bu durum bağışıklığı baskılanmış konaklarda tedavinin etkisiz kalmasına yol açabilir.³⁰ Ayrıca anti GKM antikolar bulunması halinde, melaninli hücrelerin makrofajlar tarafından fagozozunun azalması; hücre duvarında melanin birikmesinin özgül antikoların opsoninlenmesini önleyebildiğini göstermektedir.^{22,34,35} Melanin üretiminin bu mantarın virülensindeki önemine karşın *in vivo* melanin mevcudiyetini gösteren çok az delil bulunmaktadır. Kaynağında belirtildiğine göre, *C. neoformans*'ın fenoloksidaz aktivitesinin 25°C'ye göre 37°C'de büyük ölçüde azaldığı bildirilmiş olup bu da *in vivo* melanin üretiminin sınırlı olduğuna işaret etmektedir. Histolojik beyin kesitlerinde *C. neoformans* hücre duvarlarındaki kahverengi pigmenti belirlemek için modifiye bir Fontana-Masson boyası kullanılmış; fakat boyanın özgül olmadığı, Mel⁻ olan *C. laurentii*'nin de boyandığı anlaşılmıştır. Kısaca; birikmekte olan veriler, melanin üretiminin etkili bir canlı kalma (virülens) faktörü olduğunu ve melaninin bu mayayı konak savunmasına karşı korumada birçok işlev gördüğünü göstermektedir.²²

Mannitol Üretimi

Hekzitol D-mannitol üretiminin de *C. neoformans*'ın konak dokusunda canlılığını sürdürmesine yardım ettiği yönünde veriler biriktirmektedir. Kaynağında belirtildiğine göre, Wong ve ark. insan kaynaklı 12 *C. neoformans* kökeni incelemişler, bunların tümünün gelişme sırasında besiyerinde D-mannitol üreterek salgıladığını bildirmişler; ayrıca bir tavşan kriptoko-

kok meninjitisi modelinde de *C.neoformans*'ın *in vivo* D-mannitol üretebildiğini göstermişlerdir. Kortizon uygulanmış ve intrasisternal olarak *C.neoformans* ile infekte edilmiş tavşanlardan alınan BOS'ların kontrollerden, kortizon verilip mantarla infekte edilmemiş olanlardan ve kortizon uygulanmamış fakat infekte edilmiş olanlardan alınanlardan daha fazla D-mannitol içerdiği saptanmıştır. Araştırmacılar; BOS'da yüksek yoğunluktaki D-mannitol'ün beyinde ödeme yol açabileceği ve mannitolün hidrojen radikallerini bağlayarak mantarın oksitleyici etkiden korunmasına yardım ettiği gibi iki önemli sonuca varmışlardır.^{12,22,36}

Diğer potansiyel virülens faktörleri ***Süperoksit dismutaz***

Kaynağında belirtildiği üzere; *C.neoformans*'ın süperoksit dismutaz (SOD) düzeyinin 37°C'de olasılıkla azalan melanin üretimini kapatmak üzere bu sıcaklıkta artıp artmadığını belirlemek için bu mantarın SOD üretimi araştırılmış ve arttığı gözlemlenmiştir; böylece bunun da virülense katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür.²²

Proteazlar

Bu mantarın kültürde üretildiğinde bir proteaz üretebildiği ve insan plazma proteinlerini sindirebileceği; kazeini sindirebilen bir proteaz da ürettiği bildirilmiş ancak proteazların *in vivo* üretilip üretilmediği belirlenmemiştir. *C.neoformans* proteazlarının olasılıkla, konak dokusuna invazyonu başlatarak virülens mekanizmasına katıldığı üzerinde durulmaktadır.^{22,37} Proteazların virülensle ilişkisinin aranması için AIDS'lilerden²⁷ ve güvercin dışkısından 24 elde edilen *C.neoformans* kökenlerinin farklı sıcaklıklarda gelişme, kapsül boyutu ve proteolitik aktivitelerinin incelendiği bir araştırmada proteaz üretimi ile kapsül boyutu arasında korelasyon bulunduğu; bunun proteazların virülensdeki rolüne işaret edeceği bildirilmiştir.³⁸

Fosfolipazlar

C.neoformans'ın yumurta sarılı agarda üretildiğinde fosfolipaz,³⁹ lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz-transaçılaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir; bu çalışmaya alınan 50 kökenin

49'unun fosfolipaz pozitif olduğu bildirilmiş; araştırmacılar bu mantarın hücre dışı fosfolipaz aktivitesinin memelilerin hücre zarlarını bozabileceğini ve maya hücresinin konak dokusuna girmesini sağlayabileceğini öne sürmüşlerdir.^{40,41} AIDS'lilerden ve güvercin dışkısından ayrılan kökenlerde bu enzimin üretiminin karşılaştırıldığı bir çalışmada da fosfolipazın *C.neoformans*'ın konak dokusuna girmesinde rol oynayabildiği öne sürülmüştür.⁴² Tayland'da ve İtalya'da AIDS'lilerden ayrılmış toplam 129 kökenin fosfolipaz üretimlerinin araştırıldığı bir başka çalışmada bunların 128'i pozitif bulunmuş ve *C.neoformans* kökenlerinde bu özelliğin yaygın olarak bulunduğu yazılmıştır.⁴³

Fenotipik sıçrama

C.neoformans kökenlerinin koloni morfolojisinde yüksek sıklıkta geri dönüşümlü değişiklikler gözlemlenmiştir. Bir serotip A kökende düz (S), buruşuk (W) ve tırtıklı (C) olmak üzere üç koloni tipi belirlenmiştir; W tipi kolonilerle infekte edilen farelerin daha hızlı öldükleri bildirilmiştir; bu üç koloni tipinin hücre karakteristiklerinin farklılığı üzerinde durulmuştur. Serotip A ve D'ye ait başka iki kökende de S ve W arasında yüksek sıklıkta fenotip sıçraması gözlemlenmiştir; bütün bunların deney farelerindeki yangı cevabı da araştırılmış ve fenotip sıçramasının *C.neoformans*'a konak savunmasından kaçarak kronik infeksiyon oluşturma yeteneği verebildiği öne sürülmüştür.⁴⁴

Virülensin Düzenlenmesi

Kapsül üretimi, melanin oluşturulması gibi virülens faktörlerinin düzenlenmesi henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Ancak *GPA1* geninin *C.neoformans*'ın virülens faktörlerinin düzenlenmesinde ve çaprazlanmasında iş gördüğü öne sürülmektedir.²²

SONUÇ

C.neoformans'ın virulan kökenlerinin alveol boşluklarına girebilecek kadar küçük hücreler üretebilmeleri; 37°C'de, pH 7.3-7.4 civarın-

da %5'lik CO₂'lik bir atmosferde gelişebilme-leri ve olasılıkla α -çaprazlama tipine ait olmaları gerekmektedir. Geniş kapsül üretebilme ve konağın vücut sıvılarına çok miktarda kapsül maddesi bırakma yeteneği organizmayı yüksek virüslü kılmaktadır. Melanin, mannitol, süperoksit dismutaz, proteaz ve fosfolipaz üretimi gibi diğer faktörler *C.neoformans*'ın virülensini artırabilirler. Bu kriptokok virülens faktörlerinin etkinliği konağın savunma mekanizmasının durumuna bağlıdır. Bu mantarın virülensi ile ilgili birçok bilgi üretilmişse de daha birçok çalışmaya da gerek duyulmaktadır.²²

ÖZET

Cryptococcus neoformans kapsüllü bir mantar ve önemli bir insan patojenidir. Bu derlemede konak-mantar etkileşimi ile mantarın infeksiyon geliştirmesi için sahip olması gereken ve öncelikle önem kazanan polisakkarit kapsül başta olmak üzere, melanin üretimi, mannitol salgılanması, süperoksit dismutaz, proteaz ve fosfolipazlar gibi karakteristikleriyle ilgili mevcut bilgiler gözden geçirilmiş; yazarların bir kutanöz kriptokokkoz lezyonundan ayırdıkları bir kökenle fare deneyinde kapsülün belirginleştirildiği bir çalışmaları ile ilgi kurulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1992; 60: 602-605.
2. Kwon-Chung KJ. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. Medical Mycology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992; 397-446.
3. Kwon-Chung KJ, Yun C, Wickes B. The relationship between mating type and virulence in *Cryptococcus neoformans*. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (September 12th-16th 1999) London 1999; 30.
4. Cox GM, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. In: Coklier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. vol 4 Ajello L, Hay RJ vol eds. Medical Mycology 2000; 461-486.
5. Yücel A. Kriptokok ve Diğer Maya formundaki mantarlar. İnfeksiyon Hastalıklar'nda. 2nci baskı. Ed. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M. 2001 (Baskıda).
6. Cleare W, Brandt ME, Casadevall A. Monoclonal antibody 13F1 produces annular fluorescens patterns on *Cryptococcus neoformans* serotype AD isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 3080.
7. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol 1999; 37: 838-840.
8. Lazera MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in decaying wood forming hollows in Işving threes. J Vet Med Mycol 1996; 34: 127-131.
9. Lazera MS. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (September 12th-16th 1999) London 1999; 88.
10. Halliday C, Krockenberger M, Carter D. An investigation of mating type in Australian isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* using molecular techniques. 4th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis (September 12th-16th 1999) London 1999; 133.
11. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 515-548.
12. Perfect JR, Wong B, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Williamson PR. *Cryptococcus neoformans* : virulence and host defences. Med Mycol 1998; 36 (Suppl 1): 79-86.
13. Levitz SM, Dupont MP, Smail EH. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1994; 62: 194-202.
14. Diamond RD. *Cryptococcus neoformans*. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, 1995; 2331-2340.
15. Kozel TR. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol 1995; 3: 295-299.
16. Fries BC, Casadevall A. Serial isolates of *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS differ in virulence for mice. J Infect Dis 1998; 178: 1761-1766.
17. Abadi J, Nachatan S, Kressel AB, Pirofski L. Cryptococcosis in children with AIDS. Clin Infect Dis 1999; 28: 309-313.
18. Agrawal A, Brown WS, McKenzie S. Cryptococcal arthritis in an immunocompetent host. JSC Med Assoc 2000; 96: 297-299.

19. Nunez M, Peacock JE Jr, Chin R Jr. Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetent host. Therapy with oral fluconazole: a report of four cases and a review of the literature. *Chest* 2000; 118: 527-534.
20. Prendiville S, Bielamowicz SA, Hawrych A, Deeb ZE. Isolated cryptococcal sphenoid sinusitis with septicemia, meningitis, and subsequent skull base osteomyelitis in an immunocompetent patient. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 123: 277-279.
21. Patel P, Ramanathan J, Kayser M, Baran J Jr. Primary cutaneous cryptococcosis of the nose in an immunocompetent woman. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 344-345.
22. Buchanan KL. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerging Infect Dis* 1998; 4: 16-22.
23. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of and mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 337-340.
24. Hamilton AJ, Goodley J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Top Med Mycol* 1996; 19-42.
25. Dong ZM, Murphy JW. Mobility of human neutrophils in response to *Cryptococcus neoformans* cells, culture filtrate antigen, and individual components of the antigen. *Infect Immun* 1993; 61: 5067-5077.
26. Collins HL, Bancroft GJ. Encapsulation of *Cryptococcus neoformans* impairs antigen-specific T-cell responses. *Infect Immun* 1991; 59: 3883-3888.
27. Dong ZM, Murphy JW. Intravascular cryptococcal culture filtrate (CneF) and its major component glucuronoxylomannan (GXM) are potent inhibitors of leukocyte accumulation. *Infect Immun* 1995; 63: 770-778.
28. Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbiocidal proteins. *Med Mycol* 1999; 37: 175-181.
29. Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1998; 180:1570-1572.
30. Jacobson ES, Tinnell SB. Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol* 1993; 175: 7102-7104.
31. Wang I, Casadevall A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect Immun* 1994; 62: 3004-3007.
32. Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLACI, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 1996; 1: 377-386.
33. Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of . *Front Biosci* 1997; 2: 99-107.
34. Wang I, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* 1995; 63: 3131-3136.
35. Liu L, Tewari RP, Williamson PR. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 6034-6039.
36. Jacobson ES, Jenkins ND, Todd JM. Relationship between superoxide dismutase and melanine in a pathogenic fungus. *Infect Immun* 1994; 62: 4085-4086.
37. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Kato J, Ninomiya K, Vidotto V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1994; 128: 143-150.
38. Leone R, Çabeli P, Sinicco A, Ito-Kuwa S, Aoki S, Vidotto V. Relationship between protease production and capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *J Med Mycol* 1999; 9: 42-44.
39. Vidotto V. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1996; 136: 119-123.
40. Chen SCA, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrell TC. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis* 1997; 175: 414-420.
41. Chen SCA, Wright LC, Santangelo RT, Muller M, Moran VR, Kuchel PV, Sorrell TC. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1997; 65: 405-411.
42. Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-Kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 1998; 142: 71-76.
43. Pienthaweechai K, Ito-Kuwa S, Nakanura K, Aoki S, Vidotto V, Koga-Ito CY, Sinicco A. Phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in Thailand and Italy. *J Mycol Med* 1998; 8: 00-000.
44. Goldman DL, Fries BC, Franzot SP, Montella L, Casadevall A. Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents. *Proc Natl Sci USA* 1998; 95: 14967-14972.