



Ocena stężenia ATP w *Candida albicans* w procesie tworzenia form kiełkujących

Determining ATP concentration in *Candida albicans* in process of forming germ tube forms

Maria M. Drózdź, Sebastian J. Seget, Zenon P. Czuba

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

STRESZCZENIE

WSTĘP: *Candida albicans* (*C. albicans*) wchodzi w skład naturalnej mikroflory organizmu człowieka. Jednocześnie jest jedną z najczęstszych przyczyn oportunistycznych grzybic systemowych. *Candida albicans* jest drobnoustrojem polimorficznym. Zmiana fenotypu związana jest z oddziaływaniem czynników środowiskowych. Dzięki zdolnościom polimorficznym formy drożdżopodobne mogą przeciwstawić się mechanizmom fagocytozy. Celem pracy jest ocena stężenia ATP (*adenosine triphosphate*) w procesie tworzenia form kiełkujących przez *C. albicans*.

MATERIAŁ I METODY: Do badań wykorzystano wzorcowy szczep *C. albicans* ATCC 10231. W pomiarach stężenia ATP wykorzystano ATP Assay Kit firmy LKB Wallac. Do oceny liczby komórek użyto urządzenia Scepter firmy Merck Millipore oraz densytometru DensiLaMeter II.

WYNIKI: Stężenie ATP po 120 min było wyższe w przypadku komórek *C. albicans* stymulowanych L-proliną oraz D-glukozą niż w komórkach niestymulowanych. Największe stężenie ATP występowało w komórkach *C. albicans* poddanych stymulacji L-proliną. Również w tym przypadku występowała największa liczba form kiełkujących.

WNIOSKI:

1. Tworzeniu form kiełkujących *C. albicans* towarzyszy wzrost stężenia ATP w pojedynczej komórce.
2. Niezależnie od rodzaju substancji stymulującej w procesie tworzenia form kiełkujących w *C. albicans* dochodzi do wzrostu stężenia ATP w przeliczeniu na pojedynczą komórkę grzyba.

SŁOWA KLUCZOWE

Candida albicans, ATP, formy kiełkujące

Received: 15.10.2017

Revised: 10.11.2017

Accepted: 16.11.2017

Published online: 23.11.2018

Adres do korespondencji: Lek. Maria M. Drózdź, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, tel. + 48 32 272 25 54, e-mail: maria.drozd@med.sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl



ABSTRACT

INTRODUCTION: *Candida albicans* (*C. albicans*) is part of the natural microbiota of the human body. At the same time, it is one of the most common causes of opportunistic systemic fungal infections. *Candida albicans* is a polymorphic microorganism. The change in phenotype is related to the influence of environmental factors. Due to their polymorphic nature, these yeast-like forms can counter mechanisms of phagocytosis. The aim of the study is to evaluate the adenosine triphosphate (ATP) concentration in the process of forming germ tube forms by *C. albicans*.

MATERIAL AND METHODS: *Candida albicans* reference strain ATCC 10231 was used for the study. An ATP assay kit by LKB Wallac was used to measure the ATP concentration. The Merck Millipore cell counter Scepter and cell density meter DensiLaMeter II were used to assess the cell count.

RESULTS: The ATP concentration after 120 min was higher for *C. albicans* simulated with L-proline and D-glucose in reference to non-stimulated cells. The highest concentration of ATP was found in the *C. albicans* cells stimulated with L-proline. Moreover, in this case, the highest number of germ tube forms was found.

CONCLUSIONS:

1. The formation of germ tube forms of *C. albicans* is accompanied by an increase in single cell ATP concentration.
2. Regardless of the type of stimulating substance used in the formation of *C. albicans* germ tube forms, there is an increase in ATP concentration in a single fungal cell.

KEY WORDS

Candida albicans, ATP, germ tube forms

WSTĘP

Candida albicans (*C. albicans*) wchodzi w skład mikroflory błon śluzowych przewodu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego oraz skóry, u około 50–70% populacji ludzkiej nie wywołując objawów chorobowych [1]. U ludzi z obniżoną odpornością może być oportunistycznym patogenem [2]. W ostatnich latach częstość zakażeń *C. albicans* wzrosła i odpowiada za 6,8% zakażeń szpitalnych w Stanach Zjednoczonych [3,4]. Drożdżaki te mogą powodować dwa rodzaje zakażeń: powierzchowne, takie jak kandydoza jamy ustnej lub pochwy, oraz zagrażające życiu zakażenia układowe [5]. Na zakażenia grzybicze szczególnie narażeni są pacjenci z chorobami nowotworowymi oraz zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Grzybicy sprzyjają również cukrzyca, przewlekła glikokortykosteroidoterapia, antybiotykoterapia, leki immunosupresyjne, długotrwałe cewnikowanie naczyń, inwazyjne procedury medyczne, uszkodzenia skóry w wyniku oparzeń, zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego oraz niska waga wcześniaków [6,7].

Jednym z czynników wirulencji *C. albicans* jest zdolność do tworzenia czterech form morfologicznych: blastokonidiów, form *germ tube*, pseudostrzępek oraz strzępek prawdziwych. Ponadto na podłożach sztucznych w niekorzystnych warunkach tworzą chlamydosporę. Morfogeneza jest jedną z cech wirulencji *C. albicans*, czyli przechodzenia z formy drożdżopodobnej w formy micelalne o kształcie wydłużonym nitkowatym, uregulowana przez sieć szlaków przek-

azywania sygnału w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [1,8,9]. Morfologiczna przemiana komórek *C. albicans* jest przejawem adaptacji szczepu do różnych niszy biologicznych gospodarza, a każdy z morfotypów pełni ważną rolę w patogenezie zakażeń [7]. Forma drożdżopodobna umożliwia rozprzestrzenianie się drogą krwionośną oraz przyleganie do powierzchni śródbłonna, z drugiej strony formy nitkowate są bardziej przystosowane do inwazji przez nabłonki, mają także większą oporność na fagocytozę [10]. Formy drożdżopodobne pełnią więc istotną rolę w procesie rozszewu patogenu do tkanek żywiciela, natomiast formy strzępkowe są bardziej istotne w trakcie inwazji [11]. Proces tworzenia form kiełkujących *C. albicans* zachodzi w obecności tyrosolu (20 μ M), w temperaturze powyżej 37°C, pH = 8, a także w otoczeniu 5% CO₂. Dodatek do środowiska reakcji takich składników, jak D-glukoza, L-prolina, L-cysteina, L-glutamina, glutation, N-acetyloglukozamina, w stężeniach odpowiednio 5 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM i 1 mM, oraz surowicy (10%) wzmacnia morfologiczną transformację komórek *C. albicans* na korzyść form kiełkujących. Wpływ czynników fizykochemicznych na proces tworzenia form *germ tube* został dobrze zbadany, lecz wpływ stanu metabolicznego komórki na wymieniony proces wciąż pozostaje niejasny [12]. W żywych komórkach najważniejszym bogatoenergetycznym związkami pośrednim lub związkiem przenośnikowym jest adenozyndotryfosforan (*adenosine triphosphate* – ATP). To nukleozydotryfosforan zawierający adeninę, rybozę i trzy grupy fosforanowe [13]. Procesy oddechowe u *C. albicans* są typowe dla eukariota. Jej mitochondria zawierają białka transportujące elektrony, takie jak dehydrogenaza NADH, dehydro-



genaza bursztynianowa, cytochromy b, c i aa₃. Oprócz konwencjonalnej oksydazy cytochromu c *C. albicans* ma również alternatywną oksydazę [14]. Celem pracy była ocena stężenia ATP w procesie tworzenia form kiełkujących przez *C. albicans*.

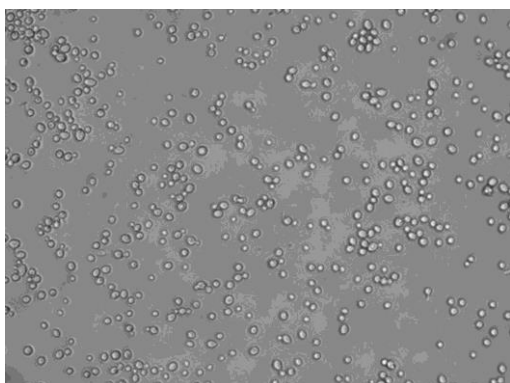
MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano wzorcowy szczep *C. albicans* ATCC 10231. *Candida albicans* hodowano na stałym podłożu Sabourauda. Do pomiaru stężenia ATP wykorzystano ATP Assay Kit firmy LKB Wallac. Liczbę komórek w zawieszynie określano za pomocą urządzenia Scepter firmy Merck Millipore oraz densytometru DensiLaMeter II.

Przygotowano roztwór 20 mmol/l L-proliny oraz 10 mmol/l D-glukozy. Równocześnie przygotowano zawiesinę komórek *C. albicans* o gęstości 0,5 McFarlanda. Następnie 0,25 ml 20 mmol/l L-proliny, 10 mmol/l D-glukozy lub PBS dodano do 0,25 ml zawiesiny *C. albicans* i inkubowano w 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Stężenie ATP w *C. albicans* oznaczono po czasie 0 i 120 min. Określono również liczbę utworzonych form kiełkujących (*germ tubes*) *C. albicans* metodą mikroskopową po 120 min [12]. Obliczeń statystycznych dokonano za pomocą programów STATISTICA 12 oraz Microsoft Office Excel 2007.

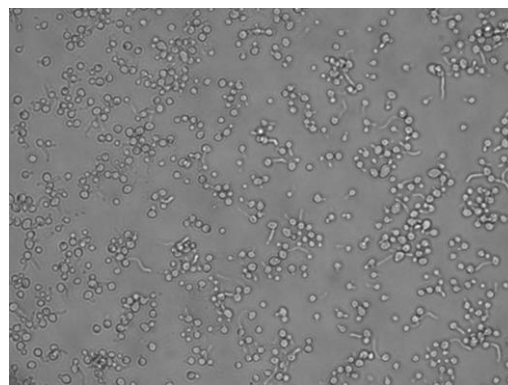
WYNIKI

Stężenie ATP po 120 min było wyższe w przypadku komórek *C. albicans* stymulowanych L-proliną oraz D-glukozą. Najwyższe stężenie ATP występowało w przypadku komórek *C. albicans* poddanych stymulacji L-proliną. Również w tym przypadku występowała największa liczba form *germ tube*.



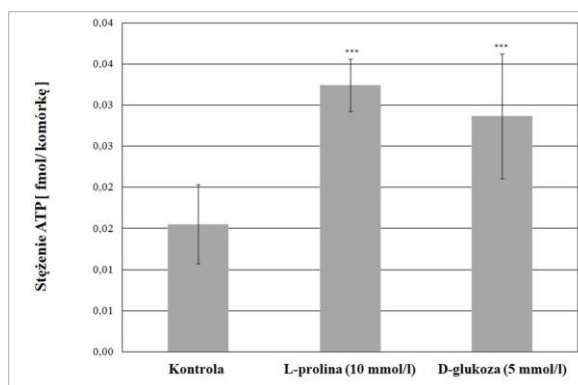
Ryc. 1. *Candida albicans* po 2 godzinach inkubacji w jałowym, buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS).

Fig. 1. *Candida albicans* after 2 hours of incubation in sterile buffered saline solution (PBS).



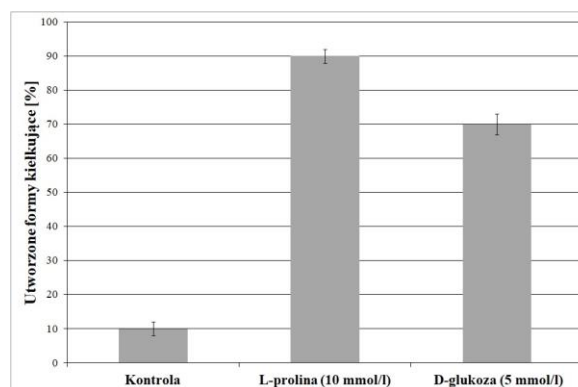
Ryc. 2. Formy *germ tube* *C. albicans* po 2 godzinach stymulacji L-proliną (10 mmol/l).

Fig. 2. *Candida albicans* germ tube cells after 2 hours of stimulation with L-proline (10 mmol/l).



Ryc. 3. Stężenia ATP (fmol/komórkę) w zawieszynie *C. albicans* o gęstości 0,25 McFarlanda w PBS (kontrola), w 10 mmol/l roztworze L-proliny, w roztworze 5 mmol/l D-glukozy po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C i warunkach 5% CO₂; *** odpowiada istotności różnicy $p < 0,001$.

Fig. 3. ATP concentration (fmol/cell) in *C. albicans* suspension (0.25 McFarlanda) in PBS (control), 10 mmol/l solution of L-proline, 5 mmol/l solution of D-glucose after 2 hour incubation at 37°C and 5% CO₂ conditions; *** corresponds to significance of difference $p < 0.001$.



Ryc. 4. Wpływ L-proliny (10 mmol/l), D-glukozy (5 mmol/l) na zdolność komórek *C. albicans* do tworzenia form *germ tube* po 2-godzinnej inkubacji w 5% CO₂ i temperaturze 37°C.

Fig. 4. Effect of L-proline (10 mmol/l), D-glucose (5 mmol/l) on ability of *C. albicans* cells to form germ tube after 2 hour incubation in 5% CO₂ and at 37°C.



DYSKUSJA

Wiele czynników wirulencji *C. albicans*, m.in.: pleomorfizm, adhezja, produkcja enzymów hydrolitycznych, tamponada naczyń przez konglomeraty strzępek oraz zmienność fenotypowa, odgrywa ważną rolę w rozwoju kandydozy. Zdolność komórek *C. albicans* do reagowania na stres środowiskowy prawdopodobnie zależy od wstępnie zmodyfikowanego stanu metabolicznego tych komórek, a zatem od dostępnych składników odżywczych w mikroorganizmach gospodarza [15]. Przejścia morfologiczne i regulacja metaboliczna mają kluczowe znaczenie dla *C. albicans*, aby dostosować się do zmieniającego się środowiska gospodarza [16]. Z naszych badań wynika, że tworzeniu form *germ tube* pod wpływem L-proliny oraz D-glukozy towarzyszy wzrost stężenia ATP w komórce grzyba.

Zjadliwość *C. albicans* nie została w pełni poznana [7]. Nawet nowoczesne metody molekularne nie pozwalają na jednoznaczne powiązanie form morfologicznych z rozwojem choroby. Większość zmian chorobowych jest wywołana obiema formami morfologicznymi, co sugeruje, że obie odgrywają rolę w roz-

woju i postępie choroby [17]. Zrozumienie mechanizmów patogenności *C. albicans* może mieć decydujące znaczenie w opracowaniu nowych leków przeciwgrzybiczych i nowych metod diagnostycznych [5].

WNIOSKI

Tworzeniu form kiełkujących *C. albicans* niezależnie od rodzaju substancji stymulującej proces powstawania form *germ tube* towarzyszy wzrost stężenia ATP w pojedynczej komórce. W związku ze wzrostem liczby zakażeń grzybiczych konieczne są dalsze badania nad metabolizmem *C. albicans* w trakcie tworzenia form polimorficznych, które umożliwią nam lepsze poznanie patogenyzy zakażenia oraz poszukiwanie nowych leków przeciwgrzybiczych.

Praca powstała dzięki finansowaniu zadań służących rozwojowi uczestników studiów doktoranckich KNW-2-033/D/5/N.

Author's contribution

Study design – M.M. Drózd, Z.P. Czuba
Data collection – M.M. Drózd
Data interpretation – M.M. Drózd, S.J. Seget
Statistical analysis – M.M. Drózd, Z.P. Czuba
Manuscript preparation – M.M. Drózd, S.J. Seget
Literature research – M.M. Drózd, S.J. Seget

PIŚMIENNICTWO:

1. Staniszewska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W. Patogeneza i leczenie zakażeń *Candida spp.* Post. Mikrobiol. 2014; 53(3): 229–240.
2. Wingard J.R., Merz W.G., Saral R. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. Ann. Intern. Med. 1979; 91(4): 539–543.
3. Carman A.J., Vylkova S., Lorenz M.C. Role of Acetyl Coenzyme A Synthesis and Breakdown in Alternative Carbon Source Utilization in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 2008; 7(10): 1733–1741, doi: 10.1128/EC.00253-08.
4. Rane H.S., Bernardo S.M., Raines S.M., Binder J.L., Parra K.J., Lee S.A. *Candida albicans* VMA3 Is Necessary for V-ATPase Assembly and Function and Contributes to Secretion and Filamentation. Eukaryot. Cell 2013; 12(10): 1369–1382, doi: 10.1128/EC.00118-13.
5. Mayer F.L., Wilson D., Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4(2): 119–128, doi: 10.4161/viru.22913.
6. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K. Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. Dent. Med. Probl. 2003; 40(2): 405–410.
7. Staniszewska M., Bondaryk M., Piłat J., Siennicka K., Magda U., Kurzątkowski W. Czynniki zjadliwości *Candida albicans*. Przegl. Epidemiol. 2012; 66: 629–633.
8. Sánchez-Martínez C., Pérez-Martín J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. Curr. Opin. Microbiol. 2001; 4(2): 214–221.
9. Jacobsen I.D., Wilson D., Wächter B., Brunke S., Naglik J.R., Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2012; 10(1): 85–93, doi: 10.1586/eri.11.152.
10. Han T.L., Cannon R.D., Villas-Bôas S.G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. Fungal Genet. Biol. 2011; 48(8): 747–763, doi: 10.1016/j.fgb.2011.04.002.
11. Sikora M., Gołaś M., Piskorska K., Swoboda-Kopeć E. Czynniki wirulencji grzybów z rodzaju *Candida* istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo. Post. Mikrobiol. 2015; 54(3): 224–234.
12. Trzaska D., Kocot-Warat M., Czuba Z. Fenotypowa plastyczność dimorficznych form *Candida albicans*. Ann. Acad. Med. Siles. 2011; 65(4): 83–89.
13. Mayes P.A. Bioenergetyka: rola ATP. W: Biochemia Harpera. Red.: R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa 2006, s. 161–162.
14. Anand S. Growth and Respiration Characteristics of *Candida albicans*. In: *Candida albicans*. Cellular and Molecular Biology. Prasad R. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin 1991, p. 46–61.
15. Brown A.J., Brown G.D., Netea M.G., Gow N.A. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Trends Microbiol. 2014; 22(11): 614–622, doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001.
16. Tao L., Zhang Y., Fan S., Nobile C.J., Guan G., Huang G. Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO₂ sensing and hyphal development in *Candida albicans*. PLoS Genet. 2017; 13(8): e1006949, doi: 10.1371/journal.pgen.1006949.
17. Calderone R.A., Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7): 327–335.