

***Candida Albicans*'in Yumuşak Astar Maddelerine Olan Adezyonunun Modifiye Bir Teknikle İn-vitro Değerlendirilmesi**

Evaluation of Adhesion of *Candida Albicans* to Different Soft-lining Materials by a Modified Technique in Vitro

*Yrd.Doç.Dr. Arzu ATAY, **Doç.Dr. M. Ali SARAÇLI, ***Yrd.Doç.Dr. M. Şamil AKYIL,
*Yrd.Doç.Dr. Alper TUKAY, *Prof.Dr. Selçuk ORUÇ

*Gülhane ASKERİ Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Diş Servisi
**Gülhane ASKERİ Tıp Akademisi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
***Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı

ÖZET

Giriş: Kandida enfeksiyonları, dişhekimliğinde bilinen en yaygın mantar enfeksiyonlarından biridir.

Amaç: Bu araştırmanın amacı; *Candida albicans*'in farklı polimerizasyon özelliği gösteren yumuşak astar maddelerine adezyonunun kolorimetrik yöntemle incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Araştırma kapsamında GDH 2346 ve klinik kaynaklı bir *C.albicans* kökeninin Viskogel, UfiGel, Molloplast B yumuşak astar maddeleri üzerindeki adeziv yetenekleri, RPMI 1640 besiyerinde, test edildi. Adezyonun kantitatif olarak ölçülmesi XTT/Koenzim Q_o yöntemiyle gerçekleştirildi.

Bulgular: Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis ve Wilcoxon W testi kullanıldı. Her iki *C.albicans* kökeninin de en fazla UfiGel'e, daha az olarak da sırasıyla Molloplast-B ve en az Viscogel'e adezyon gösterdikleri gözlemlendi ($p<0.01$).

Sonuç: Bu sonuçların ışığında, yumuşak astar maddesi hazırlanmasında Viscogel kullanılmasının *C.albicans* adezyonunu azaltacak bir önlem olarak teşvik edilebileceği değerlendirilmektedir.

ABSTRACT

Introduction: Oral candidosis is the most common fungal infection encountered in dentistry.

Aim: The aim of this study was to investigate adhesion of *Candida albicans* to soft-lining materials with different polymerization characteristics by use of a colorimetric method (XTT).

Material and Method: In this study, GDH 2346 and a clinical root form of *C. albicans* were used for tested to adhesive capability of *Candida albicans* on viskogel, UfiGel and Molloplast-B soft-lining materials in RPMI 1640. The quantitatively measurement was provided by use of XXT/coenzyme Q_o technique.

Result: Kruskal-Wallis and Wilcoxon w tests were used for statistical analysis of data. The most adhesion was measured on the UfiGel, followed by Molloplast-B and then Viscogel ($p<0.01$).

Conclusion: This finding emphasizes use of Viscogel in respect of prevention of *C. albicans* adhesion to soft lining materials in dentistry.

ANAHTAR KELİMELER

Yumuşak astar maddesi, *Candida albicans*, Adezyon

KEYWORDS

Soft-lining material, *Candida albicans*, Adhesion

GİRİŞ

Yumuşak astar materyalleri atrofik ve ağrılı mukozalarda veya proteze bağlı travmatik ülserasyonların meydana geldiği durumlarda protezin bazal yüzeyine uygulanan materyallerdir^{1,2}. Bu materyallerin önemli uygulama nedenlerinden biri; yaşlanmaya bağlı olarak görülen ağız dokularındaki fizyolojik değişikliklerin sebep olacağı sorunları hafifletmektir. Bununla birlikte temiz tutulmalarındaki zorluk dezavantajlarıdır. Bu materyaller üzerinde kolaylıkla *C.albicans* kolonizasyonu gelişir ve bu durum protez stomatitine neden olan faktörlerin en önemlisidir³. Yumuşak astar maddeleri yapısal olarak *C.albicans* üremesini desteklemedikleri halde, fiziksel yapısında mevcut olan porların gıda artıklarının birikmesine elverişli olması sebebi ile *C.albicans* adezyonuna, kolonizasyonuna ve üremesine uygun ortam oluşturmaktadırlar⁴.

Kandida türleri ağızda çok rastlanılan komensallerdir. *C.albicans* ise fırsatçı bir patojen olarak rol oynayan en yaygın ve zehirli kandida türüdür⁵. Oral kavitede bulunan mikroorganizmaların; sağlıklı bireylerde %25, çeşitli sağlık sorunlarına sahip bireylerde ve özellikle immünsüpresif hastalarda ise %50-90 kadarını oluşturlar³. *C.albicans*'ın adezyonunda yüzeydeki protein reseptörlerinin rol aldığı kabul edilmekle beraber, bu mekanizmayı aydınlatmaya yönelik pek çok araştırma yapılmıştır⁶⁻¹³. *C.albicans*'ın biyolojik materyaller dışındaki malzemelere olan adezyonunu incelemeye etkili yöntemler arasında en az dezavantajı olan yöntemin, bir tetrazolium tuzu olan (2,3)-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-karbonil]-2H-tetrazolium hidroksetin (XTT), 3-(4,5-dimetil-thiazole-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide yükseltilmesi düzeyinin metabolik aktivite göstergesi olarak kantitatif ölçüldüğü kolorimetrik yöntem olduğu kabul edilmektedir^{9,14}. XTT yöntemi *C. albicans*'ın dentin tabakası¹⁵, proteinler¹⁶, plastikler^{17,18} ve akriller¹⁹ gibi çeşitli yapılar üzerine adezyonunun değerlendirilmesi amacıyla bir çok araştırmada kullanılmıştır.

C.albicans'ın yumuşak astar maddelerine adezyonu çeşitli çalışmalarda incelenmiş olmakla birlikte, adezyonun XTT yöntemiyle kolorimetrik olarak araştırılması ve farklı polimerizasyon özelliği gösteren yumuşak astar maddelerinin karşılaştırılması yaygın değildir. Bu araştırma; *C.albicans*'ın, polimerizasyon özellikleri birbirinden farklılık gösteren UfiGel, Molloplast-B ve Viscogel'e olan adezyonunu kantitatif bir değerlendirme olan kolorimetrik XTT yöntemiyle incelenmesini amaçlamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yumuşak Astar Maddelerinin Hazırlanması: Çalışma kapsamında; Viscogel (akrilik rezin-otopolimerize) (Dentisply, D-78467 Konstanz, Germany), UfiGel (silikon bazlı-otopolimerize) (Voco. Cuxha\en. Postfach 767, Germany) ve Molloplast B (silikon bazlı-ısı ile polimerize) (Detax GmbH&Co. KG Ettlingen, Germany) yumuşak astar maddeleri kullanıldı. Yumuşak astar maddeleri, üretici firmaların önerileri doğrultusunda ve oluşabilecek hava boşluklarını en aza indirerek maksimum homojenliği sağlamak amacıyla vakumlu karıştırıcı (Multivac 4, Degussa, Germany) ile karıştırıldı. Malzemeler iki cam levha arasında polimerize olacak şekilde 14mm x 14mm x 2mm (en x boy x yükseklik) boyutlarında plakalar haline getirildi. Molloplast B örnekler ise muflada üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanarak pişirildi. Tüm örnekler 134°C'de 7 dakika bekletilerek sterilize edildi¹¹.

Adezyon Ölçümü: Adezyon ölçümü, Ramage ve ark.²⁰ ile Sen ve ark.'nın²¹ kullanmış oldukları araştırma yöntemleri esas alınarak oluşturulmuş modifiye bir teknikle gerçekleştirildi. YPD (%1 Yeast extract, %2 pepton, %2 dekstroz) agar besiyerine adezyon yaptığı bilinen *C.albicans* GDH 2346 kökeni ve klinik kaynaklı bir *C.albicans* kökeni pasajlandı. Bir gecelik kültür sonrasında yaklaşık beş identik koloni YPD sıvı besiyerine ekildi ve 100rpm hızda çalkalamalı etüvde 37°C'de bir gece inkübe edildi. 5000rpm hızda (9000gr) 10 dakika santrifüjlenerek elde edilen pellet iki kez PBS pH 7.2 (NaCl 8.0gr, KCl 0.2gr,

Na₂HPO₄ 1.15gr, KH₂PO₄ 0.2gr, dH₂O 1000ml) ile yıkandı. Hücre yoğunluğu mililitrede 1.0x10⁶ hücre olacak şekilde L-glutaminli, MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon edildi. RPMI 1640 besiyeri, 1.04gr RPMI 1640 (L-glutaminli ve bikarbonatsız) ve 3.453gr MOPS 90ml dH₂O içinde çözüldükten ve 1M NaOH ile pH'sı 7.0 ayarlandıktan sonra son hacmi 100ml ye tamamlanarak hazırlandı ve 0,44µm por çaplı filtre ile süzülerek sterilize edildi. Elde edilen standart maya süspansiyondan dörder mililitre altılı hücre kültür viyalleri içerisine yerleştirilmiş steril dental diskler üzerine eklendi ve 48 saat süre ile 60rpm çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri aspire edildikten sonra diskler steril PBS ile iki kez yıkandı. Diskler 24'lü steril hücre kültür viyallerine alınarak steril PBS ile bir kez daha yıkandıktan sonra üzerlerine 1ml steril PBS ve 500µl XTT/Co Q₀ karışımı (0.5mg/ml XTT, 40µg/ml Co Q₀/ PBS'de) eklenerek 2 saat süre ile 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda sıvı kısım mikrosantrifüj tüplerine alınarak 10000rpm de (9400gr) iki dakika santrifüjlendi ve üst kısımdan alınan 100µl sıvı örneklerinin optik dansiteleri (OD) mikropelatelere aktararak ELISA okuyucuda (BIO-TEK EL800, ABD) 490nm'de okundu. XTT/Co Q₀ karışımının OD değeri tüm okuma değerlerinden çıkarıldı. Testin tekrarlanabilirliği her bir deneyin üç kez tekrarlanması ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 10.5 (SPSS Inc., Il., USA)

programında, %95 güven aralığında, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandıktan sonra, gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi, grupların ikişerli karşılaştırmaları için Wilcoxon W testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

İki farklı *C.albicans* kökeninin üç farklı yumuşak astar maddesine olan adhezyon düzeylerinin XTT/Co Q₀ yöntemi ile kantitatif olarak ölçülen OD490 karşılıklarının ortanca değerleri Tablo I'de verilmiştir. Her iki kandida türünde en fazla adhezyonun UfiGel üzerinde, daha sonra Moloplast ve en az da Viscogel üzerinde olduğu bulunmuştur. Her bir *C.albicans* kökeni için araştırma kapsamında kullanılan astar materyalleri üzerine olan adhezyon değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.01). Benzer şekilde her bir materyal için farklı kökenli *C.albicans* adhezyon oranları arasındaki farkta istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur (p<0.001) (Tablo I). Tüm materyaller için en yüksek düzeyde adhezyonu GDH 2346 kökenli *C.albicans* göstermiştir.

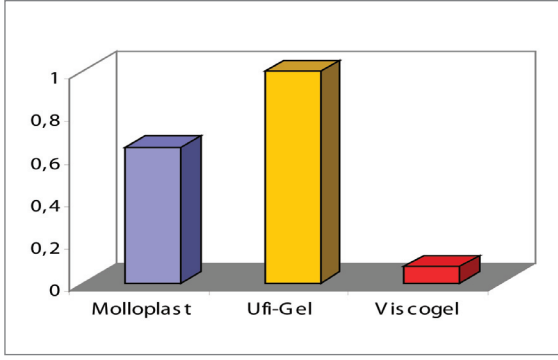
TARTIŞMA

Yumuşak astar materyalleri, özellikle doku uyumunun bozulduğu ileri yaşlardaki hastalarda, hareketli protezlerde ve sınırlı sürelerde kullanılan malzemelerdir. Bu malzemelerin yüzeyine olabilecek *C.albicans* adezyonu protez stomatitleri ile birlikte ciddi klinik tablolar oluşturabilmektedir.

TABLO I

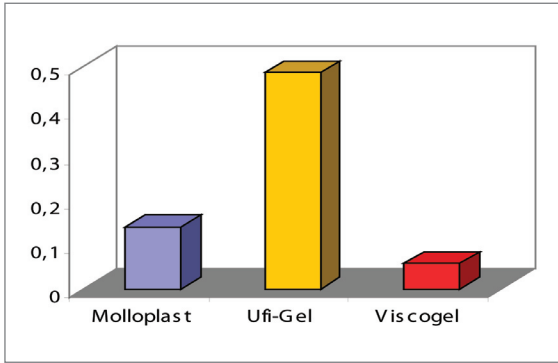
Candida albicans kökenlerinin değişik astar maddelerine olan adhezyonunun XTT/Co Q₀ yöntemi ile ölçülen OD490 değerlerinin ortalaması ve istatistiksel analiz sonuçları

Candida Albicans Kökeni			Wilcoxon W	
Astar Materyali	GDH 2346 (Ortanca)	Klinik Köken (Ortanca)	z	p
Moloplast	.640	.140	-2.677	p<0.01
Ufi-Gel	.999	.486	-2.557	p<0.01
Viscogel	.076	.057	-2.686	p<0.01
Kruskal-Wallis	$\chi^2=12.774$, df=2, p<0.01		$\chi^2=12.682$, df=2, p<0.01	



ŞEKİL I

GDH 2346 kökenli *C. albicans*'ın üç farklı yumuşak astar maddesi üzerine olan adhezyonu arasındaki ilişki



ŞEKİL II

Klinik kökenli *C. albicans*'ın üç farklı yumuşak astar maddesi üzerine olan adhezyonu arasındaki ilişki

C. albicans adezyonunu; ışık veya elektron mikroskobu kullanılarak histolojik düzeyde gösterme, metabolik aktivitenin pH değişimi veya formazon oluşumuna dayanan kantitatif tekniklerle ölçmek mümkündür. Ramage ve ark.²⁰ ile Sen ve ark.^{nın}²¹ çalışmalarında, XTT yönteminin ışık ve elektron mikroskobu çalışmalarına kıyasla daha avantajlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışma kapsamında bu araştırmacıların tanımladıkları tekniklerden modifiye edilen bir yöntem kullanılmıştır.

C. albicans'ın, yumuşak kaide maddeleri üzerinde kolaylıkla kolonize olarak ciddi enfeksiyonlar oluşturabilir. Adhezyon miktarı ile koloni oluşturma ve hastalık meydana getirme kabiliyeti arasında direkt bir ilişki olduğunu belirtmektedir.³ Yumuşak astar malzemelerine adezyonun nasıl oluştuğu, malzemenin yapısının buna etkisi

konusunda değişik araştırmalar mevcuttur^{13,20,21}. Yapılan araştırmalarda *C. albicans*'ın yüzeye adezyonu ile ilgili olarak; yüzey pürüzlülüğü, tükrük proteinlerinin ve diğer yapışkan mikroorganizmaların varlığı, konsantrasyon, maya hücrelerinin canlılığı, kültür şartları gibi faktörler sayılmaktadır¹⁻⁴. Bu araştırmada farklı polimerizasyon özelliklerinin, *C. albicans*'ın yüzeye adezyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

C. albicans'ın yüzeye yapışmasının iki safhalı bir işlem olduğu düşünülmektedir. İlk etkileşim non-spesifik ve geri dönüşümlüdür. Mikroorganizmalar ve serbest yüzey enerjisi sebebiyle yüzeye mikroorganizmaların yapışmasını tanımlayan termodinamik yaklaşımı içeren birçok yaklaşım, mikroorganizmaların ilk yapışmasının açıklanmasında kullanılmaktadır. Yapışma işleminin ikinci fazı olan spesifik yapışma, reseptör etkileşimini içerir. Bu safha, kolonizasyona müsaade eder. Mikroorganizmaların yüzeye sıkı bağlanması geri dönüşümü olmayan etkileşimler için gereklidir^{13,22}.

Yumuşak kaide materyalinin kompozisyonunun fungusidler için çekici bir ortam olduğu, fungal kolonizasyonun da yumuşak kaide materyalinin tipine bağlı olarak farklılık gösterdiği değişik araştırmalarla saptanmıştır^{13,22}. Bu araştırmalarda silikon esaslı yumuşak astar maddelerinin akrilik resin esaslı olanlardan daha az adezyon özelliği gösterdiği gözlenmiştir. En yüksek adezyon silikon bazlı UfiGel'de sonrasında sırasıyla silikon bazlı Molloplast B ve en az akrilik bazlı Viscogel'de saptanmıştır. Akrilik resin esaslı Viscogel, silikon astar maddelerinden (Molloplast ve UfiGel) istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha az adezyon göstermiştir. Bu çelişki kullanılan ölçüm tekniklerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu araştırma kapsamında farklı polimerizasyon özellikleri ile *C. albicans* adezyonu arasında bağlantı olduğuna dair bulgu elde edilmemiştir.

C. albicans adezyonu ile ilgili olarak ortamdaki pH oranının adezyonu inhibe ettiği yönünde düşünceler mevcuttur^{4,22}. Buradan yola çıkılarak, Viskojel yüzeyine olan adezyonun daha az oluşu, viskojelin pH üretimine bağlanmaktadır. Çalışmamızda diğer örneklerle oranla Viskojele olan

adezyonun daha az bulunması bu teoriyi destekler yöndedir.

Araştırma kapsamında test edilen her üç materyalde de adezyon oluşmuştur. En yüksek adezyon oranı, beklendiği gibi, klinik kökenli *C.albicans*'a oranla GDH 2346 kökenli *C.albicans*'da gözlenmiştir. Adezyon miktarı küçükten büyüğe doğru Viscogel<Molloplast-B<UfiGel şeklinde ölçülmüştür. Çalışmamızda, Viskojel adezyonunun diğer malzemelere oranla belirgin miktarda düşük çıkması, klinik çalışmalarda malzeme seçiminde Viscogel'in tercih edilebileceğini düşündürmektedir. Ancak, kesin bir öneride bulunmak için standart bir yöntem geliştirilmesi ve *C.albicans* adezyonu ile ilgili daha fazla sayıda araştırma yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bulad K, Taylor R L, Verren J, McCord F. Colonization and penetration of denture soft lining materials by Candida albicans. Dental Materials 2003;20(2):167-175.
2. Okita N, Orstavik D, Orstavik J, Ostby K. In vivo and in vitro studies on soft denture materials: microbial adhesion and tests for antibacterial activity. Dent Mater J 1991;7:155-60.
3. Odds FC. Candida and Candidosis. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 1988.
4. Yanıkoğlu N, Aktaş E, Duymuş Z. Candida albicansın yapışmasının incelenmesi. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. 2003;13(1):16-20.
5. Scully C, Flint SR, Stephen RP, Moos KF. Oral and maxillofacial diseases. 3th ed. New York: Mosby Co. 2004:114-115.
6. Mc Courtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of Candida albicans. Infect Immun 1984;45:6-12.
7. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of Candida albicans. Microbiol Rev 1991;55:1-20.
8. Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Samaranayake LP. Differences in Candida albicans adhesion to intact and denaturated type I collagen in vitro. Oral Microbiol Immunol 2002;17:129-31.
9. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 1991;142:257-65.
10. Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of candida species in vivo. J Prosthodont 2003;12(3):187-91.
11. Maza JL, Elguezabal N, Prado C, Ellacuria J, Soler I, Ponton J. Candida albicans adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94(5):589-92.
12. Wright PS, Young KA, Riggs PD, Parker S, Kalachandra S. Evaluation the effect of soft lining materials on the growth of yeast. J Prosthet Dent 1998;79(4):404-9.
13. Waters MG, Williams DW, Jagger RG, Lewis MA. Adherence of Candida albicans to experimental denture soft lining materials. J Prosthet Dent 1997;77(3):306-12.
14. Paul KD, Shoemaker RH, Boyd MR, et al. The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. J Heterocycl Chem 1988;25:911-4.
15. Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of Candida albicans to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;96:201-6.
16. Hawser SP, Islam K. Binding of Candida albicans to immobilized amino acids and bovine serum albumin. Infect Immun 1998;66:140-4.
17. Hawser S. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent Candida albicans to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised C.albicans cells. J Med Vet Mycol 1996;34:149-52.
18. Hawser S. Adhesion of different Candida spp. to plastic: XTT formazan determinations. J Med Vet Mycol 1996;34:407-10.
19. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res 2001;80:903-8.
20. Ramage G, VandeWalle K, Wickes B L, Lopez JL. Characteristics of biofilm formation by Candida albicans. Rev Iberoam Micol 2001;8:163-170.
21. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Growth patterns of Candida albicans in relation to radicular dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84:68-73.
22. Nikawa H, Yamamoto T, Hayashi S, Nikawa Y, Hamada T. Growth and/or acid production of Candida albicans on soft lining materials in vitro. J Oral Rehabil. 1994;21(5):585-94.

İLETİŞİM ADRESİ

Yrd.Doç.Dr.Diş.Tbp.Atgm. M.Şamil AKYIL

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Diş Servisi Üsküdar/İSTANBUL

Tel.: 0216 5422858 (İş) 0533 4154611 Fax: 0216 3487880 E-mail: Msamil@atauni.edu.tr