

İki Farklı Akrilik Esaslı Yumuşak Astar Maddesinin Zamana Bağlı Olarak
Yüzeylerinden İzole Edilen *Candida albicans* Hücrelerinde *ALSI* Adezyon Geninin
Ekspresyonundaki Değişimin İncelenmesi

The Evaluation of the Changes in *ALSI* Adhesion Gene Levels in *Candida albicans* Cells
Isolated From Two Different Acrylic Based Soft Lining Materials in Different Time
Periods

¹Kaan Yerliyurt, ²Dilek Nalbant, ³Semra Kuştımur

¹Özel Dentatürk Ağız ve
Diş Sağlığı Hastanesi

²Gazi Üniversitesi Diş
Hekimliği Fakültesi
Protetik Diş Tedavisi
Anabilim Dalı

³Gazi Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi
Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı

Yazışma Adresi:

Dr. Kaan Yerliyurt
Adres: İhsaniye Mah.
Lefkoşe Sok. No:21/4
Nilüfer/BURSA
e-mail:
kaanyerliyurt@hotmail.co
m

Özet

Amaç: Bu çalışmada; in vitro hızlandırılmış eskitme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış iki farklı akrilik esaslı yumuşak astar maddesinin *C. albicans* hücreleri ile 12 ve 24 saat süreyle inkübasyonunun ardından, bu yumuşak astar maddelerinin yüzeylerinden izole edilen hücrelerdeki *ALSI* geni mRNA ekspresyonunun kantitatif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada; oda sıcaklığında polimerize olan akrilik esaslı yumuşak astar maddesi olarak Visco Gel, ısıyla polimerize olan akrilik esaslı yumuşak astar maddesi olarak Vertex Soft kullanılmıştır. Her bir maddeden 40'ar adet olmak üzere toplam 80 adet örnek hazırlanmıştır. Her bir maddeden hazırlanan örneklerin 20 tanesine Atlas UV2000 Hızlandırılmış Hava Koşullandırma Test Cihazında hızlandırılmış eskitme işlemi uygulanmıştır. Ardından her bir yumuşak astar maddesinden hazırlanan eskitme işlemi uygulanan ve uygulanmayan 10'ar tane olmak üzere toplam 20 örnek 12 saat, diğer 20 tane örnek ise 24 saat süreyle *C. albicans* hücreleriyle inkübe edilmişlerdir. Örneklerin yüzeyinde oluşan biyofilm kütleleri kazınmış ve mRNA'ları izole edilmiştir. Bu mRNA'lar cDNA'ya çevrilmiş ve Real-time PZR 'de kantitatif analizleri yapılmıştır.

Bulgular: In vitro hızlandırılmış eskitme işlemi uygulanmamış örneklerde ortalama gen ekspresyonları incelendiğinde Vertex Soft maddesinden hazırlanmış örneklerde Visco Gel maddesi örneklerine göre daha az gen ekspresyonu bulunmuştur.

Örnek grupları arasında en az gen ekspresyonu, eskitme işlemi uygulanmamış ve 12 saat süreyle inkübe edilmiş Vertex Soft maddesi örneklerinde görülmüştür (16.00 ± 2.91 kopya/mL).

Sonuç: Bu araştırma sonucunda yumuşak astar maddesi türünün, maddenin kullanım süresi ve *C. albicans* hücreleriyle inkübasyon sürelerinin *ALSI* geni ekspresyonu üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Candida albicans*, adezyon, *ALSI* geni, gen ekspresyonu, yumuşak astar maddeleri

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the quantitative expression of *ALSI* gene mRNA isolated from the surface of the acrylic based soft lining materials, after the incubation with *C. albicans* cells for 12 and 24 hours of two different soft lining materials subjected to a process of in vitro accelerated aging and of the ones not subjected.

Material and Method: In this study, Visco Gel (room temperature curing acrylic based soft lining material), Vertex Soft (heat-cured acrylic based soft lining material) were used . 40 specimens from each material were prepared so as to obtain totally 80 specimens. 20 specimens of each soft lining materials' were subjected to accelerated aging process by using Atlas UV2000 Accelerated Air Conditioning Test Device and the other 20 were not subjected to aging process. 10 of the 20 specimens which were subjected to accelerated aging were incubated with *C. albicans* for 12 hours and the other 10 specimens were incubated with *C. albicans* for 24 hours. And 10 of the 20 specimens which were not subjected to accelerated aging were incubated with *C. albicans* for 12 hours and the other 10 specimens were incubated with *C. albicans* for 24 hours. The biofilm layer occurred on the surfaces of the specimens were excavated and mRNAs were isolated. The mRNAs were converted into cDNA and quantitative analyses were performed with real-time PCR.

Results: When the average gene expression was analyzed in the samples, which was not applied to in vitro accelerated aging process, gene expression was less in the samples prepared under Vertex Soft material than the samples of Visco Gel material.

The least gene expression between samples groups was seen in the samples of Vertex Soft material (16.00 ± 2.91 copy/mL), which was not applied accelerated aging process, and was incubated during 12 hours.

Conclusion:As a result of this study, we observed that the types of soft lining materials, duration of the material usage and the incubation period of *C. albicans* influenced the expression of *ALSI* gene.

Key words: *Candida albicans*, adhesion, *ALSI* gene, gene expression, denture liners

Giriş

Yumuşak astar maddeleri esneklik ve yumuşaklık özellikleri ile hareketli protezlerde protez üzerine gelen kuvvetlerin eşit olarak dağıtılmasını sağlamak ve atrofiye uğramış bölgelerde oluşan kuvvet dağılımlarını azaltmak amacıyla protezlerin dokuya bakan yüzeylerine uygulanan elastik özellik gösteren polimerlerdir (1-5).

Bu olumlu özelliklerinin yanısıra yumuşak astar maddelerinin kullanımında bazı fiziksel ve mikrobiyolojik dezavantajlar bulunmaktadır (6). Yapılarındaki plastikleştiricilerin sızmasıyla yumuşaklıklarını kaybederler ve zamanla oluşan pürüzlü yüzeyleri plak birikimine ortam hazırlarlar. Bu mikrobiyal plak mantarlar için bir rezervuar görevi görmektedir. En yaygın görülen mantar tipi ise *Candida albicans*'tır (2,6-9).

Oral kandidoz, *Candida* türlerinin en çokta *C. albicans*'ın oral kavitede çoğalmasına bağlı olarak gelişen yaygın fırsatçı enfeksiyondur. *Candida* ilişkili protez stomatiti yaygın gözlenen bir oral kandidoz tipidir ve protez kullanan yaşlı kimselerin yaklaşık olarak %50-60'ında görüldüğü belirtilmiştir (10-13). *C. albicans*'ın kolonizasyon ve bir enfeksiyon gelişiminde başarı sağlaması için gerekli olan ilk basamak konak hücreye, akrilik yüzeylere ve yumuşak astar maddelerine olan adezyonudur (4-9). *C. albicans*'ın adezyonunda etkili olan birçok faktör vardır. Bunlardan bir tanesi de

yapısındaki agglutinin – like sequence (ALS) gen ailesidir (14). ALS genleri ilk defa *C. albicans*'ta tanımlanmıştır (15). *C. albicans*'taki agglutinin – like sequence (ALS) gen ailesinin konakçı yüzeylerine adezyonda görev alan büyük hücre yüzey glikoproteinlerini kodladıkları bilinmektedir (15,16).

Green ve arkadaşları (17) *C. albicans* hücreleri inoküle ederek yaygın kandidoz oluşturdukları farelerde RT-PZR yöntemi kullanarak ALS genlerinin ekspresyon yüzdelerini hesapladıkları çalışmada; enfeksiyon oluşturulduktan 12 saat sonra farelerin %14'ünde, 24 saat sonra %71'inde, 48 saat sonra %86'sında ALS1 gen ekspresyonu olduğunu belirtmişlerdir.

Kamai ve arkadaşları (18) deneysel orofaringeal kandidoz oluşturdukları farelerde; ALS1 geninin enfeksiyonun erken safhalarında *C. albicans*'ın adezyonunda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Dental literatür incelendiğinde; *C. albicans*'ın yumuşak astar maddelerine adezyonuyla ilgili olarak yapılmış birçok araştırma mevcuttur (4,6,7,9,19-24). Fakat bu maddelerin yüzeylerine yapışan *C. albicans* hücrelerinde adezyon gen ekspresyonlarındaki değişikliklerin kantitatif olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmanın amacı; in vitro olarak hızlandırılmış eskitme işlemi

uygulanmış ve uygulanmamış iki farklı akrilik esaslı yumuşak astar maddesinden hazırlanmış örneklerin *C. albicans* hücreleri ile 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilmesi sonucunda yüzeylerinden izole edilen hücrelerde oluşan ALS1 geni mRNA ekspresyonundaki değişimin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada, Tablo 1'de gösterilen 2 farklı akrilik esaslı yumuşak astar maddesi kullanılmıştır. Visco Gel ve Vertex Soft yumuşak astar maddelerinin her birinden 40'ar adet olmak üzere toplam 80 adet örnek hazırlanmıştır. Bu amaçla 1.5 mm kalınlığında 10 mm çapında silindir boşlukları olan alüminyum kalıp hazırlanmıştır. Kalıp boşluklarında mum örnekler hazırlanmış, hepsi muflaya yerleştirilmiş ve muflada negatif boşluklar elde edilmiştir. Üretici firmaların talimatlarına göre hazırlanan her bir yumuşak astar maddesi muflalara yerleştirilmiştir. Visco Gel maddesine ait örnekler brite yerleştirilmiş muflada oda sıcaklığında 12 saat bekletilerek polimerize olmaları sağlanmıştır. Vertex Soft maddesine ait örneklerin bulunduğu mufla soğuk suya konmuştur, 70 °C 'de 3 saat ve 100 °C'de 30 dakika bekletilerek örneklerin polimerize olmaları sağlanmıştır.

Tablo 1: Araştırmada kullanılan yumuşak astar maddeleri ve özellikleri

| MATERYAL | TİPİ | İÇERİĞİ | ÜRETİCİ FİRMA ve ÜRETİM YERİ |
|-------------|---|--|--|
| Visco Gel | Oda sıcaklığında polimerize olan akrilik esaslı yumuşak astar maddesi | Toz: Polietilmetakrilat Likit: Phthayl butyl glycolate, Ethanol | Dentsply De Trey GmbH Weybridge, UK |
| Vertex Soft | Isı ile polimerize olan akrilik esaslı yumuşak astar maddesi | Toz: Polietilmetakrilat Likit: Metil metakrilat monomer, Aromatik ester | Dentimex, Zeist, The Netherlands |

In Vitro Hızlandırılmış Eskitme İşlemi

Her bir yumuşak astar maddesinden 40'ar adet hazırlanan örneklerin 20'ser adedi Atlas UV2000 Hızlandırılmış Hava Koşullandırma Test Cihazında (Siemens, Almanya) in vitro hızlandırılmış eskitme işlemine tabi tutulmuştur. Yumuşak astar maddeleri için tavsiye edilen kullanım

Tablo 2: Araştırmada kullanılan yumuşak astar maddelerine uygulanan eskitme süreleri ve eskitilen örneklerin sayıları

| Yumuşak Astar Maddesi | Kullanım Süresi | Eskitme Süresi | Eskitilen Örnek Sayısı |
|-----------------------|-----------------|----------------|------------------------|
| Visco Gel | 3 hafta | 17 saat | 20 |
| Vertex Soft | 2 ay | 50 saat | 20 |

Örneklerin *Candida albicans* Suşu İle Karşılaştırılması

Çalışmada *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşu kullanılmıştır. 0,01 mol/L PBS (fosfatla tamponlanmış salin) solüsyonu hazırlanmıştır. SDA (Saboraud Dekstroz Agar) plaklarındaki *Candida albicans* suşundan cam tüplerin içindeki solüsyona öze ile ekim yapılmıştır. Her bir yumuşak astar maddesinin 20 adet

süreleri dikkate alınarak, her bir yumuşak astar maddesi için uygulanacak olan eskitme işleminin süresi hesaplanmıştır (Tablo 2). In vitro hızlandırılmış eskitme işlemi için, cihazın döngüleri 60 °C'de 8 saat süreyle UV ışması ve 50 °C'de 4 saat süreyle yoğuşma olacak şekilde programlanmıştır.

eskitilmemiş ve 20 adet eskitilmiş örnekleri cam tüplerin her birinin içine 1'er adet olacak şekilde konmuştur. Tüpler her bir grupta 10 adet eskitilmemiş ve 10 adet eskitilmiş örnek olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. 1. gruptaki tüpler 37 °C 'lik etüvün içine konulmuş olan yatay çalkalayıcıya yerleştirilip 200 x rpm'de 12 saat boyunca, 2. gruptaki örnekler ise 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Çalkalama

işlemi tamamlandıktan sonra tüplerdeki maya süspansiyonlarının dibine çöken tortulu kısımları ve içinde bulunan örnekler 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Eppendorf tüpler numaralandırılmıştır. Eppendorf tüpler ekstraksiyon işlemi yapılabildiği kadar -20 °C 'de saklanmıştır. Bu aşamadaki işlemler Visco Gel ve Vertex Soft yumuşak astar maddeleri için ayrı ayrı yapılmıştır.

Örneklerin yüzeyine yapışan *Candida albicans* kolonisinden total RNA eldesi

RNA elde edilmesi için Heliosis RNA Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılmıştır. Üretici firma önerilerine uygun olarak, 100 µl örnek ile çalışılmıştır. Elde edilen total RNA miktarları RNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek RNA varlığı kontrol edilmiştir. -20 °C 'de saklanmış olan 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içindeki örneklerin yüzeyinden kazıma yoluyla 100 µl maya kolonisi pipetle alınarak steril boş eppendorf tüplere aktarılmıştır. Eppendorf tüpler numaralandırılmıştır. *C. albicans* hücrelerinin lizisi için eppendorf tüplere 100 µl "Tissue Digestion Buffer" ve 10 µl Proteinaz K ilave edilip kuru ısı bloğunda 65 °C 'de 2 saat inkübe edilmiştir. Proteinaz K aktivitesini durdurmak için; daha sonra 95 °C'de 10 dk bekletilip santrifüj cihazında 10000 x rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerinin içindeki sıvının üst kısmından alttaki çökeleğe dokunulmadan 10 µl serum alınıp boş eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorf tüplere 400 µl lizis binding solution eklendi. Her bir eppendorf tüp vortekslenmiştir. Karışım 65 °C 'de 10 dakika, 4 °C 'de 2 dakika bekletilmiştir. Spin santrifüj edildikten sonra üzerine 500 µl Precipitation solution

eklenmiştir. Vortekslenmiştir. 15 dk 13000 x rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki sıvı çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alınmıştır. 500 µl Washing Solution eklenmiştir. Vortekslenmiştir. 5 dk süreyle 13000 x rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki sıvı pipetle tamamen alınmıştır. Eppendorf tüpler oda sıcaklığında 10 dakika kurutulmuştur. Ardından 20 µl Sample diluter eklenmiştir. Vortekslenip spin santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüpler -20 °C'de saklanmıştır.

Ters transkripsiyon (RT – PZR) ile cDNA eldesi

Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Germany) kullanılmıştır.

***ALS1* kodlayan cDNA'ların Real-Time PZR cihazında çoğaltılması**

ALS1 için en az 10 ng cDNA kullanılmıştır. LightCycler cihazı (Roche, Almanya) ve LightCycler yazılımının 3.5 versiyonu kullanılmıştır. Real-time PZR amplifikasyon karışımı, kalıp cDNA, SYBR Green master karışım tamponu ve her bir primerden [Forward 5'- gaa tgc aat tgg taa agt a- 3' ve Reverse 5' -atg ctt caa caa ttt aca- 3' (Alpha DNA, Kanada)] 100 pmol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon 3 aşamada gerçekleştirilmiştir; denatürasyon (95 °C'de 15 saniye), hibridizasyon (55 °C 'de 20 saniye), uzama (72°C 'de 15 saniye).

Analiz 55-90 °C arasında (sıcaklık değişimi 0.2 °C /sn) basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. Real-time PZR

amplifikasyonu sonrasında, erime eğrisi (“melting curve”) analizleri incelenmiştir.

Real -Time PZR’de ALS gen ifadesinin kantitatif analizi

Klinik örneklerden önce bir cDNA havuzunun 6 farklı dilüsyonu üç farklı kopya olarak ölçülmüştür ve floresansın başladığı siklus sayısı (Cp) ile gen ifadesinin logaritmik artışı arasında lineer regresyonla , kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. *ALS1* gen ifadesi miktarı kopya / mL olarak ölçülmüştür.

İstatistik Analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve tabloların oluşturulması amacıyla SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 15 kullanılmıştır. mRNA miktarlarının sunulması amacıyla ortalama, standart

sapma, minimum ve maksimum değerleri kullanılarak tablolar hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlara Üç Yönlü Varyans Analizi yapılmıştır. Yumuşak astar maddelerinin (Visco Gel ve Vertex Soft) mRNA miktarları arasında farklılığı belirlemek için Student T testi kullanılmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde önemlilik seviyesi olarak $p<0.05$ ve $p<0.01$ değerleri kabul edilmiştir.

Bulgular

In vitro hızlandırılmış eskitme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış iki farklı akrilik esaslı yumuşak astar maddesinin *C. albicans* hücreleri ile 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilmesi sonucunda elde edilen mRNA ekspresyon miktarlarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Elde edilen mRNA miktarlarının (kopya/mL) yumuşak astar maddelerine, eskitme işlemi (eskitilmemiş/eskitilmiş) ve inkübasyon sürelerine (12/24 saat) göre ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

| Yumuşak Astar Maddesi | Uygulanan İşlem | N | Ortalama | Std. Sapma | Minimum | Maksimum |
|------------------------------|------------------------|----------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|
| Visco Gel | Eskitilmemiş-12 saat | 10 | 29.70 | 3.92 | 24.00 | 36.00 |
| | Eskitilmemiş-24 saat | 10 | 27.00 | 4.22 | 20.00 | 33.00 |
| | Eskitilmiş- 12 saat | 10 | 30.00 | 3.16 | 26.00 | 36.00 |
| | Eskitilmiş-24 saat | 10 | 18.00 | 2.31 | 15.00 | 21.00 |
| Vertex Soft | Eskitilmemiş-12 saat | 10 | 16.00 | 2.91 | 11.00 | 20.00 |
| | Eskitilmemiş-24 saat | 10 | 22.10 | 3.96 | 17.00 | 30.00 |
| | Eskitilmiş-12 saat | 10 | 30.10 | 3.73 | 24.00 | 37.00 |
| | Eskitilmiş-24 saat | 10 | 21.00 | 2.91 | 16.00 | 26.00 |

Akrilik esaslı yumuşak astar maddesi, in vitro hızlandırılmış eskitme işlemi ve inkübasyon süresi faktörleri ile üç faktörlü varyans analizi (2x2x2 düzeni) yapılmış ve sonuçlar Tablo 4’de verilmiştir. Yumuşak astar maddeleri ve inkübasyon süresi faktörlerinin her birinin alt grupları arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$),

eskitme işlemi alt grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). İncelenen üç faktöre ait ikili etkileşimlerin hepsi anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Her üç faktörün birlikte etkileşimi incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4: Yumuşak astar maddeleri, eskitme işlemi ve inkübasyon süresi etkileşimine ilişkin varyans analizi sonuçları

| Kaynak | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F | P |
|------------------------|-----------|------------------|--------------------|--------|----------------|
| Malzeme | 1 | 300.313 | 300.313 | 25.322 | 0.000** |
| İşlem | 1 | 23.113 | 23.113 | 1.949 | 0.167 |
| Süre | 1 | 391.613 | 391.613 | 33.020 | 0.000** |
| Malzeme x İşlem | 1 | 588.613 | 588.613 | 49.631 | 0.000** |
| Malzeme x Süre | 1 | 171.112 | 171.112 | 14.428 | 0.000** |
| İşlem x süre | 1 | 750.313 | 750.313 | 63.266 | 0.000** |
| Malzeme x işlem x süre | 1 | 43.513 | 43.513 | 3.669 | 0.059 |
| Hata | 72 | 853.900 | 11.860 | | |
| Toplam | 80 | 50119.000 | | | |

** $p < 0.01$

Akrilik esaslı yumuşak astar maddelerinin eskitme işlemi ve inkübasyon süresi alt gruplarına göre elde edilen mRNA ekspresyon miktarlarının ortalama ve standart sapma değerleri ile her iki maddenin bu değerler bakımından karşılaştırma sonuçları Tablo 5’de

verilmiştir. mRNA ekspresyon miktarları en az eskitilmiş ve 24 saat inkübe edilmiş Visco Gel maddesinde (18.00 ± 2.31 kopya/mL) bulunurken, en fazla eskitilmiş 12 saat inkübe edilmiş Visco Gel ve Vertex Soft maddelerinde bulunmuştur.

Tablo 5: Yumuşak astar maddelerinin eskitme işlemi ve inkübasyon süresi gruplarına ilişkin karşılaştırma sonuçları

| Eskitme işlemi ve inkübasyon süresi grupları | Visco Gel | Vertex Soft | p |
|---|------------------|--------------------|----------------|
| Eskitilmemiş – 12 saat | 29,70 ± 3.92 | 16.00 ± 2.91 | 0.000** |
| Eskitilmemiş – 24 saat | 27.00 ± 4.22 | 22.10 ± 3.96 | 0.015* |
| Eskitilmiş – 12 saat | 30.00 ± 3.16 | 30.10 ± 3.73 | 0.949 |
| Eskitilmiş – 24 saat | 18.00 ± 2.31 | 21.00 ± 2.91 | 0.020* |

* p < 0.05

** p < 0.01

Eskitme işlemi ve inkübasyon süresi gruplarına göre akrilik esaslı yumuşak astar maddelerinin karşılaştırılması;

Eskitilmemiş ve 12 saat inkübe edilmiş akrilik esaslı yumuşak astar maddesi örneklerinde mRNA ortalamaları sırasıyla, Visco Gel maddesinde 29,70 ± 3.92 kopya/mL ve Vertex Soft maddesinde 16.00±2.91 kopya/mL olarak bulunmuştur. Yapılan t-testi sonucunda ortalamalar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.01) (Tablo 5).

Eskitilmemiş ve 24 saat inkübe edilmiş akrilik esaslı yumuşak astar maddesi örneklerinde mRNA ortalamaları sırasıyla, Visco Gel maddesinde 27.00±4.22 kopya/mL ve Vertex Soft maddesinde 22.10±3.96 kopya/mL olarak bulunmuştur. T-testi sonucuna göre ortalamalar arasındaki farklılık anlamlı miktardadır (p<0.05) (Tablo 5).

Eskitilmiş ve 12 saat inkübe edilmiş örneklerde mRNA ortalamaları, Visco Gel maddesinde 30.00±3.16 kopya/mL ve Vertex Soft maddesinde 30.10±3.73 kopya/mL olarak bulunmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel

olarak anlamlı miktarda değildir (p>0.05) (Tablo 5).

Eskitilmiş ve 24 saat inkübe edilmiş Visco Gel maddesi örneklerindeki mRNA ortalamaları (18.00±2.31 kopya/mL), Vertex Soft maddesindekilerden (21.00±2.91 kopya/mL) istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha azdır (p<0.05) (Tablo 5).

Tartışma

Araştırmada yumuşak astar maddeleri üzerinde oral çevrede meydana gelen değişiklikleri taklit etmek amacıyla Atlas UV2000 Hızlandırılmış Hava Koşullandırma Test Cihazı kullanılmıştır. Hızlandırılmış eskitme işlemi, birçok araştırmacı tarafından diş hekimliğinde kullanılan materyallerin ve yumuşak astar maddelerinin çeşitli özelliklerini araştırmada kullanılmıştır (9,25-29). Weathering cihazının üreticisi 300 saatlik eskitmenin klinik kullanımın bir yılına eşit olduğunu bildirmektedir ve bir çok araştırmacı bu süreyi dikkate almışlardır (9,25,26,30). Araştırmada da yumuşak astar maddelerinin klinik kullanım süreleri

göz önüne alınarak; Visco Gel yumuşak astar maddesinden hazırlanan örnekler 17 saat, Vertex Soft örnekleri 50 saat süreyle in vitro hızlandırılmış eskitme işlemine tabi tutulmuşlardır.

C.albicans'ın konak hücrede kolonizasyonu ve enfeksiyonunda ilk basamak olan adezyon patogenezi önemli bir rol oynamaktadır. *C. albicans*'ın konak hücre yüzeyine adezyonu hücre yüzey glikoproteinlerini kodlayan *ALS* (agglutinin-like sequence) genlerinin ekspresyonu ile ilgilidir (15,31). Als1p ve Als5p (Ala1p) insan yanak epitellerine ve fibronektine tutunmakta rol alırlar. Als1p özellikle enfeksiyonun erken döneminde maya hücresinin ağız mukozasına tutunmasında önemli rol oynar (14).

ALS genlerinin *C. albicans* hücrelerinin konakçı yüzeylere ve medikal yüzeylere adezyonunda etkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (14-16,32,33-35).

Green ve arkadaşları (36) yaptıkları çalışmada protez akriliğinde ve kateterlerde kullanılan silikon elastomerde *C. albicans* suşlarıyla biyofilm oluşturmuşlardır. Bu in vitro modellerde 6., 12. ve 48. saatlerde biyofilm hücrelerinde ve planktonik hücrelerde *ALS* gen ekspresyonlarını incelemişlerdir. *ALS1* gen ekspresyonu bir tane kateter modeli oluşturulmuş suşun 12. saatteki biyofilm hücresi ölçümünde zayıf pozitif, diğer bütün ölçümlerde ise pozitif çıktığı bildirilmiştir.

Kamai ve arkadaşları (18) deneysel orofaringeal kandidiyazis oluşturdukları farelerde; *ALS1* geninin enfeksiyonun erken safhalarında *Candida albicans*'ın adezyonunda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Babaç (33) 2007 yılında yaptığı doktora tez çalışmasında; çeşitli

yumuşak astar maddeleri ve akrilik yüzeylerle karşılaşmış *C. albicans* hücrelerindeki *ALS1* gen ekspresyonundaki değişikliklerin ve Als1 proteininin hücrelerin bu yüzeylere adezyonundaki rolünü araştırmıştır. RT-PZR deneyinde suşlar materyallerle karşılaştırılmadan önce bütün suşlarda *ALS1* geni mRNA ekspresyonu negatif bulunmuştur. Acron Duo ve Visco Gel ile karşılaşmış suşların bir kısmında, silikon esaslı yumuşak astar maddeleri (Ufi Gel P, Mollosil ve Molloplast B) ile karşılaşmış suşların ise tamamında *ALS1* geni mRNA ekspresyonu pozitif bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları *C. albicans*'ın protez materyalleri ile karşılaşmasından sonra *ALS1* geni ekspresyonunun arttığını destekler niteliktedir.

Bu çalışmada; eskitme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış 2 farklı akrilik esaslı yumuşak astar maddesinin örnek yüzeylerinden izole edilen *C. albicans* hücreleri ile 12 ve 24 saat inkübe edilmesi sonucunda oluşan *ALS1* geni mRNA ekspresyonundaki değişim incelenmiştir.

Araştırmada; Visco gel yumuşak astar maddesinde eskitilmiş ve 12 saat süreyle inkübe edilen örneklerde en fazla miktarda *ALS1* gen ekspresyonu görülmüştür (30.00 kopya/mL).

Visco Gel yumuşak astar maddesinde yeni olan örneklerden 12 saat inkübasyon süresi sonunda ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda izole edilen biyofilm hücrelerinde benzer miktarda *ALS1* gen ekspresyonları olmuştur. Eskitilmiş örneklerde ise 12 saat süreyle inkübe edilen örneklerde en fazla miktarda *ALS1* gen ekspresyonu görülürken (30.00 kopya/mL), 24 saat inkübe edilen örneklerde (18.00 kopya/mL) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az *ALS1* geni

mRNA ekspresyonu olmuştur ($p<0.01$). Bu durum eskitilmiş örneklerde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda *C. albicans* hücrelerinde; adezyonun farklı bir safhasına geçilerek, diğer adezyondan sorumlu genlerin etkisine girebileceğini gösterebilir.

Babaç (33) çalışmasında Visco Gel maddesinden hazırladığı 6 adet örneği farklı *C. albicans* suşları ile inkübe etmiş ve sonuçta 4 tanesinde *ALSI* gen ekspresyonu görüldüğünü belirtmiştir. Araştırmada Visco Gel maddesinden hazırlanan örneklerin hepsinde *ALSI* gen ekspresyonu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları yaptığımız çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Tarı ve arkadaşları (9) in vitro hızlandırılmış eskitme işlemi sonrasında pelikül tabakası oluşturulmuş ve oluşturulmamış örneklerde Visco Gel maddesinde *C.albicans* adezyonunda artış olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç, araştırmadaki eskitme işlemi uygulanmış ve 12 saat inkübe edilen örneklerin ortalama ekspresyon sonucuyla paralellik göstermektedir.

In vivo ve in vitro deney şartları kullanılarak yapılan bir çalışmada; Visco Gel, Fixo-gel ve Fitt marka doku şartlandırıcıları kullanımının *C. albicans* gelişimine etkisi değişik zaman dilimlerinde incelenmiştir. In vitro çalışmada üçüncü günde yapılan ölçümde doku şartlandırıcılarının *Candida* gelişimini bir miktar inhibe ettiği , ancak 6. günde adezyon miktarının kontrol grubu örnekleriyle aynı düzeyde olduğu , 12. ve 15. günlerde ise adezyon miktarının arttığı belirtilmiştir (37).

Yapılan bazı çalışmalarda; yumuşak astar maddelerinde kullanılan plastikleştirici türünün, polimer partikül büyüklüğünün ve etil alkol miktarının *C.*

albicans gelişimi, asit üretimi ve kolonizasyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Visco Gel maddesinin yapısında bulunan etil alkol ve dibütil fitalatın bu hücrelerin çoğalması ve kolonizasyonu üzerinde inhibitör etkisi olduğu belirtilmiştir (38,39).

Çalışmada Vertex Soft yumuşak astar maddesinde yeni örneklerde 12 saatlik inkübasyon sürecinde en az *ALSI* geni mRNA ekspresyon miktarı gözlenmiştir (16.00 kopya/mL) . Bu miktar yeni örneklerin 24 saat süreyle inkübe edilmesi sonucunda artmıştır. Eskitilmiş örneklerde 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum (30.10 kopya/mL) gen ekspresyonu olmuştur. Eskitilmiş örneklerin 24 saat inkübe edilmesi sonucunda ise gen ekspresyonunda azalma görülmüştür. Vertex Soft maddesinde elde edilen bu sonuçlar eskitilmiş maddelerde artmış yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak adezyonun kolaylaştığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar; bu maddenin kullanım sürecinin başlangıcında gen ekspresyonunun az olabileceğini göstermektedir .

In vitro ve in vivo yapılan bazı çalışmalarda yüzey pürüzlülüğünün ve materyaldeki eskimenin *Candida* adezyonunu arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (19,20,40,41).

Verran ve arkadaşları (41) yüzey şeklinin *C. albicans* adezyonuna etkisini inceledikleri çalışmada akrilik rezin ve silikon elastomer örneklerin düz yüzeyli olanlarında daha az adezyon gözlenmiştir. Ayrıca akrilik rezin ve silikon elastomer örnekleri kendi aralarında kıyaslandığında düz yüzeyli örnekler arasındaki fark önemsiz iken , pürüzlü yüzeylere sahip örneklerde silikon elastomerlerde akrilik rezinden hazırlanmış

örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla adezyon gözlenmiştir.

Tarı ve arkadaşları (9) çalışmalarında, pelikül tabakası oluşturulmamış Visco Gel, Ufi Gel P ve Molloplast-B maddelerinin eskitme öncesi ve sonrası adezyon skorları ayrı ayrı istatistiksel olarak incelendiğinde her maddede eskitme işlemi sonrasında *C. albicans* adezyon miktarının arttığını bildirmiştir.

Bu araştırma, in vitro koşullar ile sınırlı bir çalışma olduğu için, in vivo çalışmalar ile desteklenmelidir. Bu çalışmada *C. albicans* da sadece adezyondan sorumlu bir gen incelenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda; adezyondan sorumlu başka genlerin de incelenmesi ve aynı çalışmada örnekler üzerindeki adezyon yapmış hücrelerin sayılarının ölçülmesi ile konu hakkında daha detaylı sonuçların elde edilmesine olanak sağlanabileceği düşüncesindeyiz.

Teşekkür

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇELİK'e istatistik analizlerin yapılmasında gösterdiği özverili yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Mack PM. Denture soft lining materials: Clinical Indications. Aust Dent J. 1989;34:454-8.
2. Phillips RW. Skinner's science of dental materials. 11th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1996.
3. Garcia LT, Jones JD. Soft liners. Dent Clin North Am. 2004;48:709-20.
4. Bulad K, Taylor RL, Verran J, McCord JF. Colonization and penetration of denture soft lining materials by *Candida albicans*. Dent Mater. 2004;20:167-75.
5. Hong G, Li Y, Maeda T, Mizumachi W, Sadamori S, Hamada T, Murata H. Influence of storage methods on the surface roughness of tissue conditioners. Dent Mater J. 2008;27:153-8.
6. Boscato N, Radavelli A, Faccio D, Loguercio AD. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of a soft denture-lining material. Gerodontol. 2009;26:210-3.
7. Vural C, Ozdemir G, Kurtulmus H, Kumbuloglu O, Ozcan M. Comparative effects of two different artificial body fluids on *Candida albicans* adhesion to soft lining materials. Dent Mater J. 2010;29:206-12.
8. Kulak-Ozkan Y, Sertgoz A, Gedik H. Effect of thermocycling on tensile bond strength of six silicone-based, resilient denture liners. J Prosthet Dent. 2003;89:303-10.
9. Tari BF, Nalbant D, Doğruman Al F, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. J Contemp Dent Pract. 2007;8:18-25.
10. Marsh P, Martin MV. Oral microbiology. 4th ed. Bodmin: MPG Books Ltd; 1999;153-62.
11. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. J Oral Rehabil. 2002;29:1115-9.

12. Darwazeh AMG, Al-Refai S, Al-Mojavel S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J Prosthet Dent.* 2001;86:420-3.
13. Budtz-Jorgensen E. Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;12:170-85.
14. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36: 223-8.
15. Hoyer LL. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9:176-80.
16. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin – like sequence (*ALS*) gene family: a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008;46:1-15.
17. Green CB, Zhao X, Hoyer LL. Use of green fluorescent protein and reverse transcription-PCR to monitor *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression in a murine model of disseminated candidiasis. *Infect Immun.* 2005;73:1852-5.
18. Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans ALS1* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun.* 2002;70:5256-8.
19. Bal BT, Yavuzylmaz H, Yücel M. A pilot study to evaluate the adhesion of oral microorganisms to temporary soft lining materials. *J Oral Sci.* 2008;50:1-8.
20. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture- base materials with different surface finishes. *J Dentistry.* 1998;26:577-83.
21. Nikawa H, Jin C, Hamada T, Makihira S, Kumagai H. Interactions between thermal cycled resilient denture lining materials, salivary and serum pellicles and *Candida albicans* in vitro. Part II. Effects on fungal colonization, *J. Oral Rehabil.* 2000;27:124-30.
22. Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Invest.* 2009;13:237-42.
23. Nevzatoğlu EU, Ozcan M, Kulak-Ozkan Y, Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin Oral Invest* 2007;11: 2316.
24. Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture–lining materials. *J Prosthet Dent.* 1992;68:804-8.
25. Dootz ER, Koran A, Craig RG. Physical property comparison of 11 soft denture lining materials as a function of accelerated aging. *J Prosthet Dent.* 1993;69:114-9.
26. Ergün G, Nagaş IÇ. In vitro color stability of soft denture liners after accelerated aging. *Hacettepe Dişhek Fak Derg.* 2007;31:65-73.
27. Mancuso DN, Goiato MC, Dekon SF, Gennari-Filho H. Visual evaluation of color stability after

- accelerated aging of pigmented and nonpigmented silicones to be used in facial prostheses. *Indian J Dent Res.* 2009;20:77-80.
28. Anil N, Hekimoglu C, Büyükbas N, Ercan MT. Microleakage study of various soft denture liners by autoradiography: effect of accelerated aging. *J Prosthet Dent.* 2000;84:394-9.
 29. Goiato MC, Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA. Effect of accelerated aging on the microhardness and color stability of flexible resins for dentures. *Braz Oral Res.* 2010;24:114-9.
 30. Anil N, Hekimoglu C, Sahin S. Color stability of heat-polymerized and autopolymerized soft denture liners. *J Prosthet Dent.* 1999;81:481-4.
 31. Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71:282-94.
 32. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008;18:1017-24.
 33. Babaç YG. Çeşitli Yumuşak Astar Materyalleri ve Akrilik Yüzeyinden İzole Edilen *Candida Albicans* Suşlarında, *ALS* Gen Ailesinden *ALS1* Adezyon Geninin ve *ALS1* Proteinin Araştırılması. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
 34. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9:327-35.
 35. Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2004;279: 30480-9.
 36. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiol.* 2004;150:267-75.
 37. Kulak Y, Kazazoglu E. *In vivo* and *in vitro* study of fungal presence and growth on three tissue conditioning materials on implant supported complete denture wearers. *J Oral Rehabil* 1998; 25(2): 135-138.
 38. 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;21:585-94.
 39. Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T. Effect of components of resilient denture-lining materials on the growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. *J Oral Rehabil.* 1995;22:817-24.
 40. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci: Mater Med.* 2009;20:249-55.

41. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. J Prosthet Dent. 1997;77:535-9.