

Intraoral premalign ve malign lezyonlu hastaların doku örneklerindeki candida türlerinin DNA analiziyle belirlenmesi ve sağlıklı doku ile karşılaştırılması

Betül Karaca(0000-0003-3123-3272)^α, Pelin Güneri(0000-0001-9423-9191)^α, Caner Vural(0000-0003-1400-6377)^β, Mamadou Malick Diallo(0000-0001-8264-2960)^β, Güven Özdemir(0000-0002-7577-4233)^β, Ceyda Gürhan(0000-0002-4101-4965)^α, Umut Aykutlu(0000-0002-9373-0912)^γ

Selcuk Dent J, ODMFR 2019 Kongre Kitapçığı Özel Sayısı

Başvuru Tarihi: 24 Ocak 2019
Yayına Kabul Tarihi: 15 Şubat 2019

ÖZ

Intraoral premalign ve malign lezyonlu hastaların doku örneklerindeki candida türlerinin DNA analiziyle belirlenmesi ve sağlıklı doku ile karşılaştırılması

Amaç: Bu retrospektif çalışmada premalign ve malign lezyonlu ile sağlıklı bireylere ait doku örneklerindeki *Candida albicans*, *Candida kruseii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida glabrata* türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya oral premalign veya malign lezyon şüphesi nedeniyle biyopsi uygulanmış doku örnekleri dahil edildi. Örnekler histolojik özelliklerine göre sağlıklı (n=20), displazi (n=20), karsinoma in-situ (n=20) ve skuamöz hücreli karsinom (SHK) (n=20) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. DNA izolasyonunun ardından *Candida* türlerine ait DNA örneklerinin miktar ve saflık kontrolleri gerçekleştirildi. Kantitatif ölçümler için Real-Time PCR (LightCycler 96, Almanya) kullanıldı ve standart eğriler hesaplandı. Veriler Mann-Whitney ve Wilcoxon Signed Ranks testleri ile değerlendirildi (P<0.05).

Bulgular: Sağlıklı ve displazik örneklerin yer aldığı gruplarda *C. parapsilosis* (10⁴DNA/50 mg) en sık görülen *Candida* türüydü. Karsinoma in-situ grubunda *C. tropicalis* ve *C. kruseii* (10³DNA/50 mg), SHK grubunda ise *C. kruseii* (10⁴DNA/50 mg) seviyelerinin daha yüksek olduğu belirlendi. Örneklerin hiçbirinde *C. albicans* varlığı gösterilemedi. Gruplar arasında farklı *Candida* türlerinin sayısına göre anlamlı bir fark gözlenmedi (P>0.05). Farklı *Candida* türlerinin gruplar içerisindeki seviyeleri incelendiğinde; sağlıklı örneklerde *C. glabrata* (10³DNA/50 mg), displazi grubunda *C. parapsilosis* (10⁴DNA/50 mg), karsinoma in-situ grubunda *C. tropicalis-C. kruseii* (10³DNA/50 mg), SHK grubunda ise *C. kruseii*'nin (10³DNA/50 mg) en fazla sayıda gözlenen *Candida* türü olduğu belirlendi. *Candida* türlerinin gruplar içerisindeki dağılımı anlamlı değildi (P>0.05).

Sonuç: Sağlıklı, displazik, karsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma doku örneklerinde Real-Time PCR yöntemiyle yapılan kantitatif değerlendirmede *Candida* türlerinin tüm gruplarda benzer oranda mevcut oldukları belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER

Oral *Candida*, *C. albicans*, ağız kanseri, Real-Time PCR, moleküler analiz

ABSTRACT

The determination of *Candida* species in tissue samples of patients with intraoral premalignant and malignant lesions by DNA analysis and comparison with healthy tissue

Background: Aim of this retrospective study is to determine level of *Candida albicans*, *Candida kruseii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* in samples of patients with premalignant, malignant or benign lesions.

Methods: Samples biopsied due to suspicion of premalignant or malignant lesions were included. They were divided into 4 groups: healthy (n=20), dysplasia (n=20), carcinoma in-situ (n=20) and squamous cell carcinoma (SCC) (n=20). Following DNA extraction, DNA samples were examined for quantity and quality. Quantitative measurements were performed using Real-Time PCR (LightCycler 96, Germany), standard curves were calculated. Data was analyzed using Mann-Whitney and Wilcoxon Signed Ranks tests (P<0.05).

Results: *C. parapsilosis* (10⁴DNA/50 mg) was the most common *Candida* species among healthy and dysplasia groups. Level of *C. tropicalis* and *C. kruseii* (10³DNA/50 mg) was higher in carcinoma in-situ samples, *C. kruseii* (10⁴DNA/50 mg) was higher among SCC. Presence of *C. albicans* was not detected in any of the samples. No significant difference regarding level of different *Candida* species (P>0.05) were observed. When level of *Candida* was examined within each group, amount of *C. glabrata* (10³DNA/50 mg), *C. parapsilosis* (10⁴DNA/50 mg), *C. tropicalis-C. kruseii* (10³DNA/50 mg), *C. kruseii* (10³DNA/50 mg) was higher among healthy, dysplasia, carcinoma in-situ and SCC groups respectively. No significant differences were observed regarding level of *Candida* species within each group (P>0.05).

Conclusion: The quantitative evaluation of *Candida* in healthy, dysplasia, carcinoma in-situ and squamous cell carcinoma samples using Real-Time PCR revealed similar levels of *Candida* among all groups.

KEYWORDS

Oral *Candida*, *C. albicans*, oral cancer, Real-Time PCR, molecular analyses

^α Ege Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı, İzmir

^β Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

^γ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir

GİRİŞ

Ağız içi fırsatçı patojenlerden olan *Candida* türlerinin oluşturdukları *Candida* enfeksiyonlarının ağız içi malignite gelişimindeki rolü henüz netleştirilememiştir.^{1,2} Epitelyal displazisi ve oral skuamöz hücreli karsinoma lezyonu olan hastalarda, displazi göstermeyenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek oranda *Candida* kolonizasyonu olduğu ve displazi derecelerinin artışına paralel olarak ağız içi fungal popülasyonun da anlamlı ölçüde değiştiği gözlenmiştir.³ Literatürde bu araştırmalarda tercih edilen değerlendirme yöntemi olan koloni oluşturan birim (CFU/*colony forming unit*), ağız epiteli yüzeyinde, tükürükte veya dental pelikülde bulunan *Candida* varlığını incelemek amacıyla çok sık kullanılmasına rağmen,^{3,4} *Candida*'nın dokunun derinlerine penetrasyonu konusunda bilgi vermek açısından yetersizdir. Sunulan retrospektif çalışmada intraoral premalign ve malign lezyonlara sahip hastalardan biyopsi amacıyla alınan doku örneklerinde farklı *Candida* türlerinin varlığının moleküler biyolojik yöntemlerle kalitatif ve kantitatif olarak saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nde Nisan 2012-Nisan 2017 tarihleri arasında klinik muayeneleri yapılan ve oral premalign veya malign lezyon şüphesi nedeniyle biyopsi uygulanmış hastalara ait doku örnekleri çalışmaya dahil edildi. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalında histolojik incelemesi tamamlanan doku örnekleri daha sonra arşivden alınarak histopatolojik özelliklerine göre sağlıklı (S) (n=20), hafif/orta şiddette displazi (D) (n=20), karsinoma in-situ (IN) (n=20) ve skuamöz hücreli karsinom (SHK) (n=20) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Medikal anamnezinde çalışma sonucunu etkileyecek sistemik düzensizlik, ilaç kullanımı, riskli gebelik durumu olan hastalara ait doku örnekleri ve histopatolojik değerlendirme öncesi yapılan hazırlık sürecinde zarar gören örnekler çalışma dışı bırakıldı. Çalışma protokolü Ege Üniversitesi Etik Kurul tarafından 17-7.2/5 karar no. ile onaylandı.

Çalışmada kullanılan *Candida albicans*, *Candida kruseii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida glabrata* türleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. DNA izolasyonu amacıyla Zymo Fungal/Bacterial DNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanıldı. *Candida* türlerine ait DNA örneklerinin miktarları ve saflık kontrolleri nanodrop spektrofotometre cihazında (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ABD) gerçekleştirildi. Total mikrobiyal DNA, Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) ile izole edildi. Her bir örnekten elde edilen 50 µL total genomik DNA'nın miktar ve saflık kontrolleri nanodrop spektrofotometre ile kontrol edildi. Kantitatif ölçümler için Real-Time PCR (LightCycler 96, Roche Diagnostics GmbH, Almanya) cihazı kullanıldı. Türler özgü primer setleri (Tablo 1) ile gerçekleştirilen PCR sonrasında elde edilen sentetik oligonükleotidler PCR ürünü temizleme kiti (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Almanya) kullanılarak temizlendi. Elde edilen sonuçlara göre tüm DNA örneklerinin bir seri seyreltmeleri yapıldı ve Real-Time PCR'da standart eğri oluşturmak için kullanıldı. Veriler Mann-Whitney testi ve Wilcoxon Signed Ranks test ile değerlendirildi (P<0.05).

Tablo 1. Candida türlerinin Real-Time PCR ile kantitatif analizinde kullanılan primer setleri

| Hedef organizma | Primer adı | Oligonükleotid dizileri (5'→ 3') | Uzunluk (bp) | Sıcaklık (°C) |
|------------------------|------------|----------------------------------|--------------|---------------|
| <i>C. albicans</i> | Calb1 | TTTATCAACTTGTCACACCAGA | 273 | 51 |
| | Calb2 | ATCCCGCCTTACCACTACCG | | |
| <i>C. glabrata</i> | Cgact1 F | GACGGCGATTATGAGTTAGGAG | 102 | 53 |
| | Cgact1 R | GTAGCATCTGTGCAGGTAGTT | | |
| <i>C. krusei</i> | Trfp4 F | AGGCAGCAGACTTGTACCTT | 183 | 54 |
| | Trfp4 R | TGCCAGTTTCGAGGTGAGA | | |
| <i>C. tropicalis</i> | Trf4 F | TGTTGGTGGTCTTGGTGGGT | 108 | 57 |
| | Trf4 R | ACCCCAAATTGTCTAATGCAC | | |
| <i>C. parapsilosis</i> | Sadh F | ACCCGTTGTGAGAAGTGCCA | 124 | 57 |
| | Sadh R | ACCAAGCCTATGTCCGCAACT | | |

BULGULAR

Tüm çalışma gruplarında *Candida albicans* dışındaki diğer *Candida* türleri kalitatif olarak saptandı. Farklı gruplarda *Candida* gözlenen örnek sayıları ve yüzleri Tablo 2'de sunulmaktadır. Kantitatif hesaplamalar sırasında bazı örneklerde Real-Time PCR cihazının saptama eşik limitinin altında değerler elde edildiği için bu örneklere ait veriler kantitatif olarak dikkate alınmadı.

Tablo 2. Candida varlığı belirlenen örnek sayıları ve oranları

| Pozitif Örnek Sayısı (Kalitatif) | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|
| Gruplar | Toplam Örnek Sayısı | <i>C.albicans</i> (%) | <i>C.glabrata</i> (%) | <i>C.kruseii</i> (%) | <i>C.tropicalis</i> (%) | <i>C.parapsilosis</i> (%) |
| Sağlıklı | 20 | ND* | 11 (55) | 6 (30) | ND | 3 (15) |
| Displazi | 20 | ND | 11 (55) | 9 | 7 (35) | 3 (15) |
| In-Situ | 20 | ND | 6 (30) | 10 | 1 (5) | ND |
| SHK | 20 | ND | 8 (40) | 8 (40) | 2 (10) | 1 (5) |

Sağlıklı ve displazik örneklerin yer aldığı gruplarda *C. parapsilosis* en sık görülen türdü (10^4 DNA/50 mg), bunu sağlıklı grupta *C. glabrata* ve *C. kruseii* (10^3 DNA/50 mg), displazi grubunda ise *C. tropicalis* ve *C. kruseii* (10^3 DNA/50 mg) izledi. Her iki grupta da *C. albicans* belirlenemezken, sağlıklı örneklerde *C. tropicalis* gösterilemedi. Karsinoma in-situ grubunda *C. tropicalis* ve *C. kruseii* en sık görülen *Candida* türleriydi (10^3 DNA/50 mg); *C. parapsilosis* ve *C. albicans* saptanmadı. Kanserli doku örneklerinin yer aldığı grupta *C. kruseii* en sık izlenen mikroorganizmaydı (10^4 DNA/50 mg); bunu sırasıyla *C. tropicalis* (10^3 DNA/50 mg) ve *C. parapsilosis* (10^2 DNA/50 mg) izledi (Tablo 3). Gruplar kendi içlerinde farklı *Candida* türlerinin sayısına göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmedi ($P>0.05$).

Tablo 3. Real-Time PCR ile pozitif olarak saptanan *Candida* türlerinin kantitatif değerleri

| Gruplar | Maksimum (adet/50 mg) | | | | | Minimum Sayı (adet/50 mg) | | | | | Ortalama Sayı (adet/50 mg) | | | | |
|----------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | <i>C.alb</i> | <i>C.gla</i> | <i>C.kru</i> | <i>C.tro</i> | <i>C.par</i> | <i>C.alb</i> | <i>C.gla</i> | <i>C.kru</i> | <i>C.tro</i> | <i>C.par</i> | <i>C.alb</i> | <i>C.gla</i> | <i>C.kru</i> | <i>C.tro</i> | <i>C.par</i> |
| Sağlıklı | ND | 2.13x10 ³ | 2.81x10 ³ | ND* | 1.2x10 ² | ND | 2.37x10 ³ | 5.47x10 ² | ND | 3.43x10 ³ | ND | 7.67x10 ² | 1.99x10 ³ | ND | 6.87x10 ³ |
| Displazi | ND | 3.09x10 ³ | 4.44x10 ³ | 6.05x10 ³ | 4.19x10 ⁴ | ND | 1.69x10 ³ | 7.23x10 ³ | 1.42x10 ² | 3.14x10 ³ | ND | 2.42x10 ³ | 1.81x10 ³ | 1.92x10 ³ | 2.74x10 ⁴ |
| In-situ | ND | 2.86x10 ³ | 2.45x10 ³ | 3.26x10 ³ | ND | ND | 1.43x10 ³ | 1.60x10 ² | 3.26x10 ³ | ND | ND | 2.34x10 ³ | 1.03x10 ³ | 3.26x10 ³ | ND |
| SHK | ND | 3.10x10 ³ | 1.57x10 ³ | 1.38x10 ³ | 6.68x10 ² | ND | 2.08x10 ³ | 7.69x10 ³ | 3.07x10 ² | 6.68x10 ² | ND | 2.60x10 ³ | 2.56x10 ³ | 8.44x10 ² | 6.68x10 ² |

Candida türlerinin farklı gruplardaki seviyeleri incelendiğinde; sağlıklı örneklerde *C. glabrata* (10³DNA/50 mg), displazi grubunda *C. parapsilosis* (10⁴DNA/50 mg), karsinoma in-situ grubunda *C. tropicalis* ve *C. kruseii* (10³DNA/50mg), SHK grubunda ise *C. kruseii*'nin (10³DNA/50 mg) en fazla sayıda gözlenen *Candida* türü olduğu belirlendi (Tablo 3). *Candida* türlerinin seviyeleri gruplar arasında anlamlı fark göstermedi (P>0.05).

TARTIŞMA

Sonuçlarımız *Candida* türlerinin farklı histolojik örnek grupları arasında değişken bir dağılım gösterdiğini ve gruplar arasında kantitatif değerler açısından anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda sağlıklı doku örneklerindeki *C. glabrata* miktarının diğer gruplardan 10³ kat daha fazla olduğu, *C. tropicalis*'in displazi, in-situ ve kanserli örneklerde daha sık gözleendiği, *C. albicans*'in ise dokuda beklenenin tersine Real-Time PCR cihazı ile tespit edilemeyecek kadar düşük miktarlarda yer aldığı ortaya konmuştur.

Çalkalama ya da swap yöntemi ile tüm ağızdan alınan örneklerinin kromojenik bir besi yerine ekilerek üreme oluşan örnek sayılarının incelendiği kalitatif araştırmalarda *C. albicans*'in genel popülasyonda görüme sıklığının %40 ila 60 arasında değiştiği bildirilmiştir.⁵⁻⁷Ancak kantitatif analizlerde, sağlıklı örneklerde ağızdaki tüm *Candida* türleri 06 ± 0.21CFU/mL seviyesindedir ve histolojik olarak *Candida* hiflerinin varlığı gözlenmemiştir.⁸ Ağız içi örneklerin swap, çalkalama ve konsantre edilmiş çalkalama yöntemiyle elde edildiği bir araştırmada tüm *Candida* türlerinin swapta 23 CFU, 100 µl çalkalama solüsyonunda 56 CFU ve 100 µl konsantre edilmiş çalkalama solüsyonunda 485 CFU seviyesinde olduğu bildirilmiştir.⁹ Bu araştırmalar, kantitatif yöntemlerle elde edilen sonuçların kalitatif yöntemlerden çok daha düşük oranda *Candida* kolonizasyonu saptadığını göstermektedir. Çalışmamızda ise lezyon bölgesinden ve epitelin derin katlarından alınan örnekler dahil edilmiş ve sonuçlar 50 mg örnekteki mikroorganizma sayısı olarak ifade edilmiştir. Bu nedenle sonuçlarımızın tüm ağızdan çalkalama yöntemi ile alınan ve mL ya da µL'deki CFU olarak bildirilen örneklerle yönelik sonuçlarla karşılaştırılması mümkün değildir ve benzer çalışma yöntemini kullanan, daha fazla sayıda örnek üzerinde gerçekleştirilen çalışmalara gerek duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17-Dış 016/ID: 367 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan *Candida* türlerinin ve histolojik örneklerin sağlanmasındaki katkılarından dolayı için Prof. Dr. Ali Veral, Prof. Dr. Süheyla Ertürk ve Doç. Dr. Özlem Abacı Günyar'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Jukka H. Meurman. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol* 2010;2:5195.
2. McCullough M. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol* 2002;38:391–393.
3. Bakri MM. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol* 2010;2:1-6.
4. Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens: a ten-year retrospective review at a single institution. *Am J Clin Pathol* 2009;131:364-375.
5. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010;8(6):e1000713.
6. Zegarelli DJ. Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26:1069-89.
7. Sedgley CM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese. *Arch Oral Biol* 1994;39:459–66.
8. Suhail S, Gupta S, Sharma N. Pathogenicity of *Candida* species in development of oral cancer from pre-cancer in patients of North India Population. *Int J Res Eng Appl Sci* 2016;6:19-32.
9. Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M, Kasuga E, Honda T. *Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. *BMC Oral Health* 2015;24:15:150.