

Oral Kaviteden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarının Koloni Yapılarının Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Colony Structure of *Candida albicans* Strains Isolated from Oral Cavity

B. Güniz BAKSI¹ Bilge Hakan ŞEN² A. Akin DENİZCI³

¹Ege Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji AD, İZMİR. ²Ege Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Endodonti-BD, İZMİR. ³TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Mikroorganizma Biyoteknolojisi Grubu, KOCAELİ

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı oral kaviteden izole edilen *Candida albicans* suşlarına ait kolonilerin mikro-strüktürel yapılarını belirlemektir.

Yöntem: Üç farklı oral anatomik bölgeden (dil, damak mukozası ve periodontal cep veya gingival sulkus) alınan örneklerden kültür elde edildi. Koloni morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımı ile tanımlandı.

Bulgular: Oral kaviteden toplanan örneklerde üç farklı koloni tipi saptandı. Koloni tipi ile içerdiği hücrelerin yapısı arasında genel olarak ilişki olduğu görüldü. Düzgün kolonilerin sadece blastosporlardan oluştuğu ancak, düzensiz ve tüysü kolonilerin ise farklı oranlarda gerçek hif ve blastospor içerdiği izlendi.

Sonuç: Koloni morfolojisi ile spesifik hücre tipleri arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*, fenotipik dönüşüm, kandidiazis

Abstract

Objective: The aim of this study was to determine the micro-structure of colonies of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity.

Methods: Cultures were obtained from samples of three different oral anatomical locations (tongue, palatal mucosa and periodontal pocket or gingival sulcus). Colony morphology was determined with scanning electron microscopic (SEM) evaluation.

Results: Three different colony types were identified from oral cavity samples. A general relationship between colony type and structure was observed. Smooth colonies consisted entirely of blastospores whereas irregular and fuzzy colonies consisted of different proportions of true hyphae and blastospores.

Conclusion: These results indicate a clear relationship between colony morphology and development of particular cell types.

Keywords: *Candida albicans*, phenotypic switching, candidiasis

Bu çalışma TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir (SBAG-1673 no'lu proje).

Giriş

Candida albicans hem sağlıklı, hem de sistemik hastalığı olan bireylerin oral kavitesinden sıklıkla izole edilen ve insanda birçok hastalığa neden olan fırsatçı bir mantar cinsidir.¹ Son yıllarda immün yetmezliği olan hastaların sayısındaki artışa paralel olarak

C. albicans'ın neden olduğu patolojiler ve bu patolojileri inceleyen çalışmaların sayısında da artış izlenmektedir.^{2,4}

Çalışmalar *C. albicans*'a ait koloni tiplerinin birbirine kolayca dönüşebildiğini, yani hücrelerin yapılarını ve morfolojilerini (fenotiplerini) kolayca değiştirebildiğini

ortaya koymaktadır.⁵ Bu dönüşümlerden üzerinde en sık durulmuş WO-1 suşunda gözlenen "beyaz-opak dönüşümü" adı verilen dönüşümdür.⁹ Bu dönüşümde beyaz olan hücrelerin gri (opak) kolonilere dönüştüğü izlenmiştir. Bunun yanı sıra, beyaz hücrelerdeki bazı özelliklerin opak olanlarda gözlenmediği saptanmış, buna göre dönüşüm sayesinde hücrelerin morfolojisinde, yüzey özelliklerinde ve üreme şekillerinde farklılıklar ortaya çıktığı bildirilmiştir.⁶ Pomes ve ark.⁷ çalışmalarında fenotipik değişimin yüksek frekanslarda geri dönüşümlü olduğunu ortaya koymuştur. Fenotipik dönüşüm sayesinde mantar hücresinden hipli forma veya yalancı hipli yapıya değişebilme kapasitesinin *C. albicans*'ın patojenitesinde büyük rolü olduğu savunulmakta birlikte, bu konuda kesin bilgi yoktur.⁹

C. albicans'ın farklı ve çeşitli koloniler oluşturabilme potansiyeli ilk kez Di Menna⁹ tarafından ortaya konmuş ve başlıca üç farklı koloni yapısı tarif edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada ise, 17 değişik sert/saçlı koloni tipi daha bildirilmiştir.⁵ Ultraviyole radyasyonu ile fenotipik dönüşümü stimüle edilmiş kolonilerde ise bildirilenlerden farklı birçok koloni yapısı tarif edilmiştir.¹⁰ Son dönemde, doğal dönüşüm sonucu elde edilmiş 384 farklı izolatta sıklıkla bildirilen koloni tiplerinin sayısı 5 ile 8 arasındadır.¹¹

Son yıllarda DNA yapısını tanımlayan genetik yöntemlerle yapılan çalışmaların sayısında artış olmasına rağmen, kolonilerin mikro-strüktürel yapılarını tanımlayan çalışmaların sayısı sınırlıdır.¹¹⁻¹⁵ Taramalı elektron mikroskopu ile yapılan bir çalışma¹⁶ sert koloni tipinin büyük çoğunlukla yalancı-hüfleri bulunan hücrelerden oluştuğunu ortaya koymuşsa da, bu hücre yapısı sadece bir koloni için tarif edilmiş ve koloniye ait bundan başka bilgiye yer verilmemiştir.

Bu çalışmanın amacı oral kaviteden izole edilmiş *C. albicans* suşlarına ait kolonilerin yapısını taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile inceleyerek kolonilerdeki hücrelerin yapısal benzerlik veya farklılıkları ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Kültürleme yöntemi

Çalışmamıza dahil edilen bireyler tedavi görmekte olan böbrek transplantasyonu uygulanmış hastalardan seçildi. Transplant uygulanmış hastalar kortiko-

steroit tedavisi gördüğü ve dolayısı ile kandidiazis görülme sıklığı daha yüksek olduğu için çalışmaya dahil edildi. Toplam 20 hastanın dil, dişeti ve yanak mukozası olmak üzere üç farklı oral anatomik bölgesinden toplam 60 adet örnek toplandı. Örneklerin toplanması 5x5 mm'lik ufak süngerler yardımıyla bölgeden bastırılarak (imprint culture) elde edilmesiyle gerçekleştirildi. Sabouraud dekstrozu sıvı besiyerinde (SDB) toplanan örnekler, içinde Gentamisin (50mg/l) bulunan ve böylece diğer mikroorganizmaların üremesinin önlenildiği Sabouraud agar besiyeri (SDA) içine aktarıldı. Burada gelişen maya kolonileri SDA'ya stok kültür olarak alındı. Toplanan örnekler inceleme aşamasında fetal sığır serumu içine taşındı ve 44°C'de 2 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası steril plastik öze yardımı ile bir damla serum kültürü temiz bir lam üzerine taşınarak jerm-tüp formasyonunun var olup olmadığı mikroskopik olarak incelendi. Jerm-tüp formasyonunun varlığı muhtemel *C. albicans* varlığını doğrulayan en kolay ve en ucuz yöntemlerden biri olduğu için tercih edildi. *C. albicans* varlığı aynı zamanda klamidospore ve blastokonidya varlığına bakılarak doğrulandı. *C. albicans* varlığının doğrulanmasından sonra, stoktaki örnekler steril test tüpleri içindeki SDB içine atıldı. 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek mikroorganizmaların üremeleri sağlandı ve spektrofotometrik olarak %95 geçirgenlik oluşturacak şekilde serum fizyolojik içerisinde süspansiyon halinde hazırlandı. Bu süspansiyondaki maya hücrelerinin sayısı 1-5x10⁷ cfu/ml olarak saptandı. Mili-litrede 500-2000 maya hücresi olacak şekilde dilüe edildi ve bunlardan 0,1 ml alınarak SDA'da 27°C'de 2-3 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklar çıplak gözle ve binoküler mikroskop ile değerlendirildi (XSZ 107BN, Zume, Çin).

Örneklerin taramalı elektron mikroskopu için hazırlanması

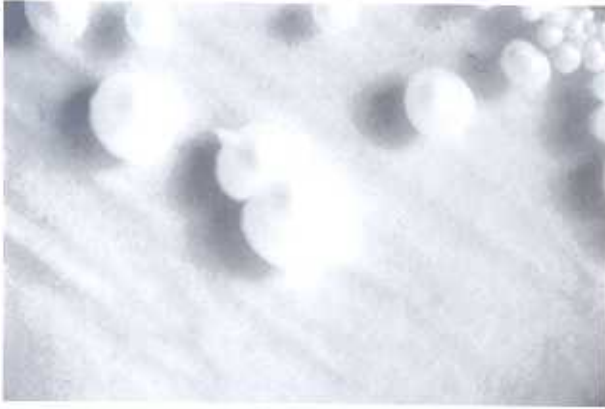
Binoküler mikroskop ile değerlendirilmesi yapılan plaklarda farklılaşma gösteren kolonilerden belirgin örnekler, çevresi ile birlikte tek tek uzaklaştırıldı. Pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilerek %2,5'lük fosfat tamponlu glutaraldehit içinde +4°C'de 24 saat süre ile fikse edildikten sonra, fosfat tamponu ile birkaç kez yıkandı. Yıkama işlemlerinin tamamlanmasından sonra alkol serisinden geçirilerek desikatörde 24 saat süreyle bekletildi. Bu işlemi takiben yaklaşık 200 Å

kalınlığında altına kaplanarak JEOL JSM-5200 (Tokyo, Japonya) marka taramalı elektron mikroskopunda çeşitli büyütme oranlarında incelendi ve gerekli görülen yerlerden örnek fotoğraflar alındı.

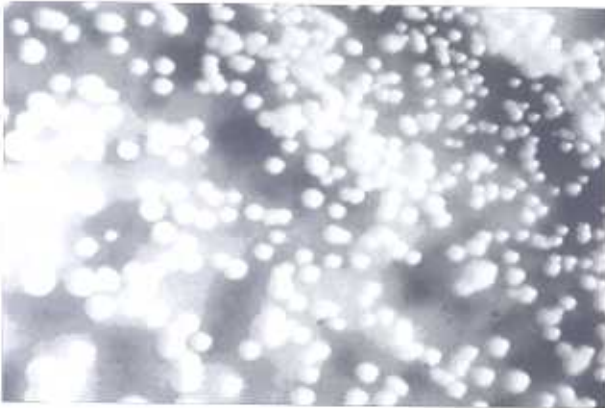
Bulgular

Mikrobiyolojik ekimlerin tekrarlanması takip eden sürenin sonunda ortaya çıkan farklı kolonilerin ışık mikroskobu altındaki morfolojik görüntüleri Resim 1, 2 ve 3'te izlenmektedir. Resim 1'de gözlenen koloni yapısının homojen olarak yuvarlak şekilde olduğu görülürken, Resim 2'deki kolonilerin yer yer uzamış olduğu belirlendi. Farklı yapıdaki üçüncü grup kolonilerin ucunda ise tüysü uzantılar olduğu gözlemlendi (Resim 3).

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde izole edilen farklı koloniler arasında, düzgün (*smooth*), düzensiz (*irregular*) ve tüysü (*fuzzy*) olarak tanımlanan koloniler olduğu izlendi.



Resim 1. Oral *Candida* izolatlarına ait düzgün kolonilerin ışık mikroskobu görüntüleri (x5).



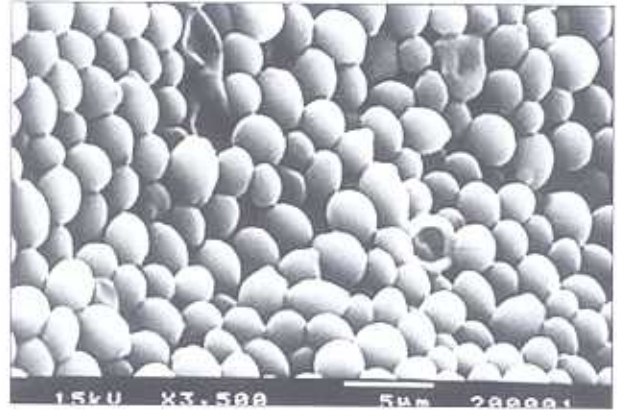
Resim 2. Oral *Candida* izolatlarına ait düzensiz kolonilerin ışık mikroskobu görüntüleri (x5).



Resim 3. Oral *Candida* izolatlarına ait tüysü kolonilerin ışık mikroskobu görüntüleri (x5).

Düzenli koloniler

Bu koloni yapısında yer alan hücre tipinin blastospordan (maya hücresi) zengin olduğu gözlemlendi. Hücreler arasında yer yer tomurcuklanmakta olanlar seçilirken, hücreler arasında ağı oluşturan filamentlerin ardışık olarak dizilmiş zincir görüntüsü verdiği izlendi. Düzenli görünümdeki hücrelerin yanı sıra, uzamış olarak gözlenen oval hücreler mevcuttu (Resim 4).

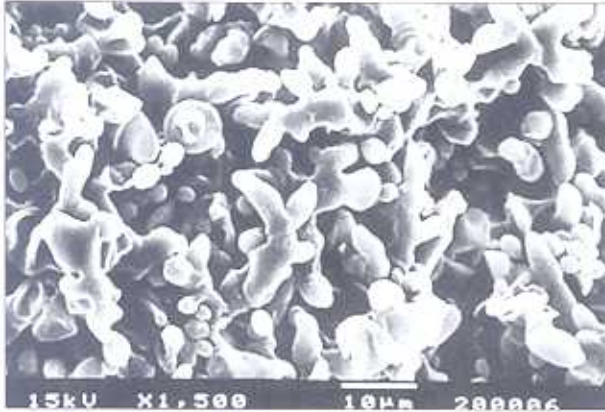


Resim 4. Düzenli koloni morfolojisini oluşturan mantar hücrelerinin taramalı elektron mikroskopik görüntüleri (x3500).

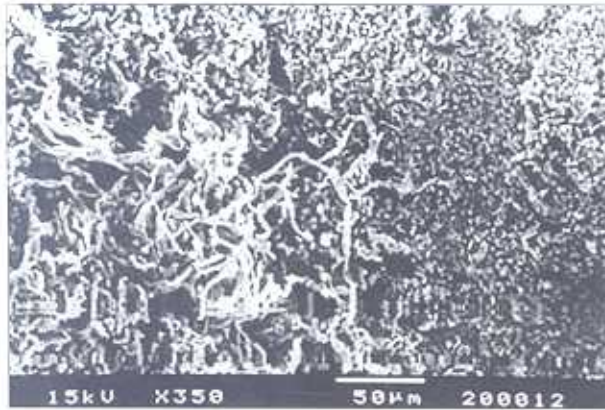
Düzensiz koloniler

Bu koloni morfolojisinde yer alan hücrelerin düzenli hücrelerden farklı olarak daha çok sayıda uzamış hücreler içerdiği ve hifli yapının hakim olduğu izlendi. Hiflerin gerçek veya yalancı hif olup olmadığı güçlükle ayırt ediliyordu. Yer yer maya hücreleri izlenirken, arada ana hücrelerin varlığı da gözlemlendi. Bu koloni morfolojisini oluşturan hücrelerin bir bölgede yoğun

olarak hifli yapıda olduğu izlenirken, bu bölgelere komşu alanlarda maya hücrelerinin yoğun olduğu görüldü (Resim 5). Buna karşın, koloniye küçük büyütmeye bakıldığında tamamen hifli yapının ve kalın hif demetlerinin olduğu gözlemlendi. Düzensiz kolonilere kesit yüzeyinden bakıldığında ise, periferdeki bölgelerin daha az kıvrımlı ve koloni yüzeyinde tamamen hifli yapı olduğu izlenirken merkezde maya hücrelerinin yoğun olduğu saptandı (Resim 6).



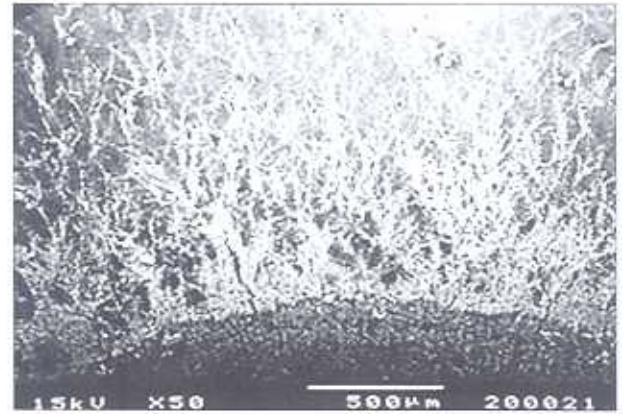
Resim 5. Düzensiz koloni yapısını oluşturan yer yer mantar hücrelerinin izlendiği hiften zengin yapıları taramalı elektron mikroskopik görünümü (x1500).



Resim 6. Düzensiz koloni morfolojisini oluşturan hücrelerin yoğun olarak hifli yapıda izlendiği bölgeye komşu alanlarda mantar hücrelerinin görünümü (x350).

Tüysü koloniler

Tüysü koloni morfolojisini oluşturan hücrelerin merkezden dışarı doğru ışınal uzantılar sergilediği gözlemlendi. Bu koloni tipini oluşturan hücreler arasında maya hücreleri, yalancı hifler ve gerçek hifler mevcut idi. Hücrelerin belirgin bir diziliş tarzı olmamakla birlikte, uzantıları oluşturan dalların çeşitli büyüklükte maya hücresi içerdiği ve klamidosporelerin varlığı saptandı (Resim 7).



Resim 7. Merkezden periferiye doğru ışınal uzantılar gösteren tüysü *Candida albicans* kolonilerinin elektron mikroskopik görünümü (x500).

Tartışma

C. albicans'ın ortam koşullarına adapte olabilmek için geliştirdiği bir kaçış mekanizması olarak tanımlanan fenotipik dönüşüm, koloni morfolojisinde ortaya çıkan değişiklikler olarak da tarif edilmektedir.⁷⁻¹⁰ *Candida*'nın standart bir laboratuvar suşuna çok sayıda farklı işlem uygulanarak yapılan çalışmalarda, tek bir suşun 8 farklı koloni fenotipi oluşturabildiği gözlemlenmiş ve bu fenotipler; düzgün (*smooth*), yıldız (*star*), halka (*ring*), düzensiz (*irregular*), büzülmüş (*wrinkled*), çizgili (*stippled*), tüysü (*fuzzy*) ve şapka (*hat*) olarak isimlendirilmiştir.^{10,15} Daha sonra yapılan çalışmalarda ise, sadece standart suşların değil, vücudun farklı bölgelerinden izole edilen kommensal veya patojenik suşların da fenotipik dönüşüm gösterdiği ve bu dönüşümün patojenik suşlarda daha hızlı (yüksek frekanslı) ortaya çıktığı bildirilmiştir.¹⁶ Suş dönüşümü ile koloni morfolojisinde meydana gelen değişiklikler dışında farklı suşlarda gözlenen dönüşüm özellikleri benzerlik taşımaktadır.^{12,17} Benzer olarak tanımlanan bu özellikler arasında; spontan dönüşümün hızlı veya yavaş frekansta gelişebilmesi, dönüşümün fenotipler arasında geri dönüşümlü olarak tekrarlanabilmesi, genelde temel olarak yuvarlak-düz fenotipin gözlenmesi, ortam koşullarına adapte olmuş dominant fenotiplerin sınırlı sayıda olması ve tüm fenotiplerin düşük dozda ultraviyole ışını ile stimüle edilerek dönüşüm frekansının artırılabilmesi sayılmaktadır. Birbirinden fenotipik olarak farklı olan kolonilerde gözlenen morfolojik değişikliklere ait hücresel mekanizma tam olarak açıklık kazanmamış olmakla birlikte, farklı koloni-

lerin farklı oranda ve uzunlukta hifler içeren hücrelerden oluştuğu bilinmektedir.^{15,17} Ek olarak, hızlı frekansta ortaya çıkan dönüşüm ve suşların birbirine dönüşebilme kapasitesi hücrelerde bazı genetik değişikliklerin olduğunu ve bunun dönüşüm mekanizmasının temel özelliğini oluşturduğunu düşündürmektedir.^{17,18}

Oral kaviteden izole ettiğimiz örnekler üzerinde yapılan SEM incelemeleri ile gözlenen koloni tipleri arasında; düzgün, düzensiz ve tüysü kolonilerin varlığı saptandı. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler, farklı koloni yapılarında farklı hücre tiplerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Koloni şekli ile koloniyi oluşturan hücrelerin morfolojik özellikleri arasında saptadığımız ilişki, Radford ve arkadaşlarının⁵ çalışmasına ait bulgular ile benzerlik göstermektedir. Elektron mikroskobunda büyük büyütme ile yapılan incelemeler, hücreler arasında izlenen ve hücreleri birleştiren bir interselüler matris yapısının varlığını ortaya koymaktadır. Odds,¹⁶ hücreler arasında gözlenen ağ yapısındaki matrisin *Candida*'nın dış hücre duvarından salgılanan fibriler yapıdaki materyalin sayıca artmasına bağlı olarak ve sadece agar üzerinde üretilen mantarlarda izlendiğini savunmaktadır. Radford ve ark.⁵ ise, elektron mikroskobu ile yaptıkları incelemelerde bu görünümün özellikle düzenli veya düzensiz kıvrık koloni tipinde olan hücrelerin yüzeyinde gelişen yoğun hifli yapıdan kaynaklandığını göstermiştir. Çalışmamızda saptanan düzensiz yapıdaki kolonilerin morfolojisinde de benzer şekilde yoğun hif demetlerinin izlenmesi Radford ve arkadaşlarının⁵ bulguları ile uyumludur. Tüysü koloni tipi ile düzgün koloni tipinde gözlediğimiz hücrelerin sırasıyla hiften veya maya hücresinden yoğun oluşu da benzer incelemeler yapan araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.^{5,14}

Sonuç

C. albicans'ın patojenitesinin bu mikroorganizmanın konak hücreye yapışması ve yüksek frekansta dönüşüm göstermesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. SEM ile yaptığımız incelemelerde elde edilen sonuçlara göre; oral kaviteden izole edilen *C. albicans* suşlarının, üç ana hücre yapısını içeren üç farklı tipte koloni oluşturduğu belirlendi. Buna göre, farklı koloni morfolojisindeki *C. albicans* suşlarının hücre yapısı ve içeriği yönünden farklılıklar gösterdiğini söylemek mümkündür.

Kaynaklar

1. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 359-383.
2. Wallimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 128-137.
3. Pinheiro A, Marcenes W, Zakrzewska JM, Robinson PG. Dental and oral lesions in HIV infected patients: a study in Brazil. *Int Dent J* 2004; 54: 131-137.
4. Muzyka BC. Oral fungal infections. *Dent Clin North Am* 2005; 49: 49-65. viii.
5. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. A scanning electron microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 1994; 40: 416-423.
6. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. White opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1987; 169: 189-197.
7. Pomes R, Gil G, Nombela C. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 2107-2113.
8. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004; 12: 317-324.
9. Di Menna ME. Natural occurrence of rough variant of a yeast *Candida albicans*. *Nature* 1952; 169: 550-551.
10. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 1985; 230: 666-669.
11. Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1990; 172: 1276-1283.
12. Anderson JM, Soll DR. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1987; 169: 5579-5588.
13. Suzuki T, Kobayashi I, Kanbe T, Tamaka K. High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 425-434.
14. Joshi KR, Gavin JB. The morphology of colony variants of three species of *Candida*. *Sabouraudia* 1975; 13: 274-279.

15. Soll DR, Morrow B, Srikantha T, Vargas K, Wertz P. Developmental and molecular biology of switching in *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 194-201.
16. Soll DR, Slutsky B, Mackenzie S, Langtimm C, Staebell M. Switching systems in *Candida albicans* and their possible role in oral candidiasis. *Laegeforeningens Folarg*, Denmark, 1987, 52-59.
17. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 183-203.
18. Odds FC. *Candida and Candidosis*, 2nd ed., Bailliere Tindall, W. B, Saunders, Londra, 1988, 1-67.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. B. Güniz BAKSI
Ege Üniversitesi
Dışhekimliği Fakültesi,
Oral Diagnoz ve Radyoloji AD,
35100 - Bornova / İZMİR
Tel : (232) 388 10 81
Faks : (232) 388 03 25
E-posta : bgunb@yahoo.com