



Obecność *Candida albicans* w jamie ustnej a całkowita liczba limfocytów u chorych z nowotworami głowy i szyi

Artur Stryjski¹, Maria Borysewicz-Lewicka²

¹Wielkopolskie Centrum Onkologii, Oddział Anestezjologii i Intensywnej Opieki Medycznej, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, ²Katedra i Klinika Stomatologii Dziecięcej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań

Rep Pract Oncol Radiother 2004;9:249-52, original paper

Received April 6th, 2004; received in a revised form June 16th, 2004; accepted August 27th, 2004

Streszczenie

Wstęp: Leczenie promieniami jonizującymi powoduje pojawienie się i/lub nasilenie zakażenia grzybiczego. Celem pracy była ocena występowania zmian grzybiczych w jamie ustnej u chorych objętych radioterapią z powodu nowotworów głowy i szyi oraz stwierdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy liczbą limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych a zwiększeniem się liczby kolonii *Candida albicans*.

Materiał i metoda: Materiał z jamy ustnej pobrano od 50 pacjentów leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu promieniami jonizującymi w dawce 60 - 70 Gy przez okres 6-7 tygodni z powodu nowotworów głowy i szyi. Grupę kontrolną stanowiło 20 chorych leczonych w tym Ośrodku z powodu innych nowotworów. U tych osób nie zastosowano radioterapii. U wszystkich wykonano posiew w kierunku zakażenia grzybiczego jak również oceniono stan odporności na podstawie całkowitej liczby limfocytów (CLL), jak i poziomu granulocytów obojętnochłonnych.

Wyniki: Wyniki wykazały, że po przeprowadzonym leczeniu wzrosła liczba osób z dodatnim wynikiem posiewów w kierunku *Candida*. Jednocześnie stwierdzono spadek CLL, u 34% chorych po radioterapii CLL w 1 mm³ był mniejszy niż 1 000, a liczba kolonii *Candida* powyżej 5 w porównaniu z 4% badanych przed radioterapią. Poziom granulocytów obojętnochłonnych u żadnego z chorych nie obniżył się poniżej 2 000 w 1 mm³.

Podsumowanie: Przeprowadzone badania sugerują, że radioterapia może mieć wpływ na rozwój zakażeń grzybiczych m.in. poprzez spadek odporności.

Słowa kluczowe: radioterapia, *Candida albicans*, limfocyt, odporność.

The presence of *Candida albicans* in the oral cavity and the total number of lymphocytes in patients with head and neck neoplasms

Summary

Objectives: Radiation therapy induces and/or exacerbates mycotic infection. The purpose of the present work was to determine the existence of mycological changes in the oral cavity in patients (pts) treated by radiotherapy because of head and neck neoplasms, and to determine the existence of dependence between the number of lymphocytes and neutrocytes and the increase in the number of *Candida albicans*.

Materials and method: The material from the oral cavity was taken from 50 pts with head and neck neoplasms treated at the Wielkopolskie Centrum Onkologii (*Great Poland Cancer Centre*) in Poznań. Patients received radiotherapy in a dose of 6 000 - 7 000 cGy over a period of 6 - 7 weeks. The control group consisted of 20 pts treated at the same hospital for cancer other than head and neck cancer. The patients did not receive radiotherapy treatment. In all pts mycological culture was carried out and the condition of immunity was examined on the basis of the total number of lymphocytes (CLL) and the level of neutrocytes.

Results: The data showed that after treatment the number of pts with positive results of the mycologically cultured examinations on *Candida* ID increased. At the same time a decrease in CLL was observed. After radiotherapy CLL per 1mm³ was less than 1000, and the number of *Candida* more than 5, compared with 4% of pts before radiotherapy. The level of neutrocytes in non of the pts decreased to less than 2 000 per 1 mm³.

Conclusion: Our study suggests that radiotherapy may have an effect on the development of mycological infection, among other things, through the decrease in immunity.

Key words: radiotherapy, *Candida albicans*, lymphocyte, immunity.

Wstęp

Obserwacje dowodzą, że z roku na rok wzrasta liczba zachorowań na choroby nowotworowe. W 1997 r. prawie co 8 zgon na świecie nastąpił z powodu guzów złośliwych (trzecia przyczyna zgonów po chorobach zakaźnych, chorobach serca i układu krążenia) [1]. W Polsce wskaźnik ten był wyższy. W 1995 r. nowotwory były przyczyną śmierci co 5 osoby (druga w kolejności przyczyna po chorobach układu krążenia) [1]. Guzy występujące w obrębie głowy i szyi stanowią 5% wszystkich zarejestrowanych procesów nowotworowych o charakterze złośliwym. Zauważono przy tym wzrost zapadalności na raka jamy ustnej [2]. Zmiany te na ogół występują po 40 roku życia (ponad 90% zachorowalności), częściej u mężczyzn niż u kobiet [3]. Czynniki ryzyka sprzyjającymi w powstawaniu tej grupy nowotworów są m.in.: palenie tytoniu, żucie tabaki, przewlekłe picie alkoholu [3,4,5,6]. Jedną z metod leczenia zmian rozrostowych jest radioterapia, często kojarzona z chirurgicznym usunięciem zmiany. Powoduje ona szereg niekorzystnych objawów ubocznych, a chorzy w trakcie i po zakończeniu leczenia skarżą się na: zaburzenia smaku, dysfagię, suchość w jamie ustnej i w gardle, trudności przy połykaniu, żucie, szczękocisk, uczucie pieczenia, ból samoistny, ból występujący podczas jedzenia i połykania (w efekcie czego mogą pojawić się objawy żołądkowo-jelitowe) oraz trudności z wymową [7,8,9,10]. Wiadomo także, że klinicznie stwierdza się u nich:

- zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej (zmiany zapalne, przekrwienie oraz krwawienie z błony śluzowej, które są pierwszymi objawami, potem mogą pojawić się nadżerki i owrzodzenia),
- zmniejszenie wydzielania śliny (jako efekt zmian zapalnych oraz degeneracyjnych w komórkach kwasochłonnych i w przewodach ślinianek),
- nasilenie się próchnicy zębów (bezpośredni wpływ promieniowania, przesunięcia jonowe w obrębie szkliwa, spadek wydzielania śliny, zwiększenie aktywności enzymów proteolitycznych, wzrost flory bakteryjnej próchnicotwórczej),
- martwicę kości (dość późno pojawiający się objaw).

W wyniku radioterapii w okolicy głowy i szyi dochodzi także do zmian we florze bakteryjnej jamy ustnej. Są one następstwem m.in. zmniejszenia wydzielania śliny, zapalenia błony śluzowej i uszkodzenia nabłonka, powstania owrzodzeń, zaburzeń w ilości immunoglobulin (spadek ilości immunoglobulin klasy IgA i IgM, wzrostu ilości immunoglobulin klasy IgD, IgG), zmniejszenia się ilości granulocytów obojętnochłonnych i monocytów, a także bezpośredniego wpływu promieni jonizujących [7].

Problem dotyczący pojawiania się zmian grzybiczych zarówno miejscowych, jak i ogólnoustrojowych budzi szczególne zainteresowanie ze względu na niejednoznaczne określenie stopnia zagrożenia oraz konieczność podjęcia dodatkowej farmakoterapii [11]. Trudności mogą pojawić

się już na poziomie diagnostyki, gdyż nie zawsze obserwacje kliniczne potwierdzone są wynikami badań laboratoryjnych. Wiadomo przy tym, że u 40 do 70% tzw. zdrowej populacji z posiewu materiału pobranego z jamy ustnej hoduje się *Candida albicans*. Utrudnia to podjęcie właściwej profilaktyki i terapii, co ma wpływ na poprawę standardu życia chorego, jak również na leczenie choroby podstawowej.

Celem pracy była ocena częstości występowania zmian grzybiczych w jamie ustnej u chorych z nowotworami głowy i szyi objętych radioterapią z uwzględnieniem stanu odporności organizmu.

Materiał i metoda

Badaniem objęto 50 pacjentów w wieku od 50 do 76 lat poddanych radioterapii w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu w latach 1998-2000. Powodem hospitalizacji były nowotwory głowy i szyi takie jak: rak dna jamy ustnej (4 mężczyzn), rak języka (5 osób - 3 mężczyźni, 2 kobiety), rak nosogardła (2 osoby - 1 mężczyzna, 1 kobieta), rak krtani (28 osób - 26 mężczyzn, 2 kobiety), rak policzka (2 kobiety), rak nagłośni (1 mężczyzna), rak migdałka podniebiennego (5 mężczyzn), rak ślinianki przyusznej (1 kobieta), rak ślinianki podżuchwowej (1 mężczyzna) i guz żuchwy (1 mężczyzna). Wszyscy pacjenci przebyli wcześniej, w innych ośrodkach, zabieg chirurgicznego usunięcia guza z ewentualnym usunięciem okolicznych węzłów chłonnych, po czym zostali skierowani do Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu celem kontynuacji leczenia promieniami jonizującymi.

Do grupy kontrolnej zaliczono 20 pacjentów, którzy byli leczeni w tym Ośrodku z powodu nowotworu w obrębie innych części ciała. U tych chorych nie stosowano radioterapii.

Obszar tkanek napromieniowanych w każdym przypadku ustalano indywidualnie w zależności od lokalizacji pierwotnej guza i stopnia zaawansowania nowotworu. Dwa pola przeciwległe napromieniano fotonami o energii od 1.22 do 6 MV w dawce dziennej 2 Gy/T (na punkt centrowania (ICRU 50) w guzie), w 5 frakcjach tygodniowo przez okres 6 - 7 tygodni do dawki 60 - 70 Gy/T. Dodatkowo napromieniano węzły szyjne dolne z pola przedniego dawką dzienną 2 Gy do dawki 50 Gy. W przypadku wystąpienia powikłań popromiennych w trakcie terapii leczenie przerywano do czasu poprawy stanu miejscowego (przez okres 7 do 14 dni), co w tych przypadkach przedłużało łączny czas leczenia.

Badania stomatologiczne i laboratoryjne przeprowadzone zostały dwukrotnie u każdego pacjenta z grupy badanej to jest przed (badanie 1) i po zakończeniu leczenia promieniami jonizującymi (badanie 2).

Badania mikologiczne wykonywano wykorzystując posiewy na płytkę z podłożem *Candida* ID. Wymaz z błony śluzowej w okolicy przedtrzonowców dolnych prawych po-

bierano przez około 5 sekund. Następnie materiał umieszczano w pojemniku transportowym i w ciągu 15 minut przekazywano do pracowni bakteriologicznej. Tam dokonywano posiewu wykorzystując wybiórcze podłoże Candida ID. Jest to oryginalne podłoże firmy bio-Merieux służące do hodowli i izolacji grzybów drożdżopodobnych oraz do wstępnej ich identyfikacji. Hodowlę prowadzono w temperaturze 35 - 37 stopni C przez 48 godzin, a następnie oceniano wyrosłą florę grzybiczą. Uzyskany wynik posiewu podzielono na 4 klasy: klasa 1 = posiew ujemny, klasa 2 = od 1 do 5 kolonii, klasa 3 = od 6 do 15 kolonii, klasa 4 = powyżej 15 kolonii.

Stan odporności oceniono u pacjentów na podstawie poziomu granulocytów obojętnochłonnych i całkowitej liczby limfocytów (CLL) w 1 mm³ krwi obwodowej (norma >1500). Krew do badania pobierano z żyły na grzbiecie dłoni.

$$CLL = \frac{\% \text{limfocytów} \times \text{liczba leukocytów}}{100}$$

Dokonując interpretacji CLL należy pamiętać, że oprócz zakażenia wpływ na wyniki mają także takie czynniki jak: niedożywienie, leki, stres, choroba nowotworowa.

Wyniki

Badania mikologiczne wykazały, że po przebyciu leczenia promieniami jonizującymi w znacznym stopniu wzrosła liczba chorych, u których stwierdzono dodatni wynik posiewu w kierunku Candida albicans. Dotyczyło to szczególnie klasy powyżej 15 kolonii. Różnice pomiędzy badaniem 1 i 2 były istotne. I tak przed radioterapią u 40% chorych posiew nie wykazał obecności kolonii Candida albicans, 50% chorych znajdowało się w klasie 2, a 10% w klasie 3 i 4. Natomiast po leczeniu ujemny wynik posiewu zaobserwowano u 38% pacjentów; w klasie 2 było 18%, w klasie 3 - 28%, a w klasie 4 - 16% osób. W grupie kontrolnej nie wyhodowano Candida albicans w materiale pobranym od 55% chorych, a u 45% odczyt mieścił się w klasie 1. W pozostałych klasach nie stwierdzono ani jednego przypadku (Tabela 1).

U 20% pacjentów przed leczeniem całkowita liczba limfocytów we krwi obwodowej przekroczyła 1 500 w 1 mm³, u 64% stwierdzono, że wynosi pomiędzy 1 001 a 1 500, u 14% pomiędzy 500 a 1000 u 2% mniej niż 500. Po radioterapii u żadnej osoby nie odnotowano wartości powyżej 1500 limfocytów w 1 mm³ krwi obwodowej, pomiędzy 1001 a 1500 stwierdzono u 38%, pomiędzy 501 a 1 000 u 46%, a mniej niż 500 u 16% chorych. Całkowita liczba limfocytów mniejsza niż 1 000 w 1 mm³ wykazana u badanych, u których liczba kolonii Candida albicans była większa od 5 odnosiła się do 34% pacjentów po radioterapii w porównaniu z 4% przed leczeniem (Tabela 2).

Poziom granulocytów obojętnochłonnych u żadnego chorego nie był niższy niż 2 000 w 1 mm³.

Omówienie wyników i dyskusja

Wykonane w tej pracy badania wykazały znaczny wzrost liczby kolonii Candida albicans w jamie ustnej. Liczba chorych, u których stwierdzono występowanie powyżej 15 kolonii wzrosła 4-krotnie po radioterapii. Stwierdzono także znaczny spadek CLL (całkowitej liczby limfocytów w 1 mm³ krwi obwodowej). Po radioterapii u żadnego pacjenta nie

Tabela 1. Wyniki badań w kierunku obecności Candida albicans w hodowlach na podłożu Candida ID BioMerieux.

Table 1. Microbiological results for Candida albicans based on Candida ID BioMerieux method.

posiew w kierunku Candida albicans	grupa badana			
	badanie 1		badanie 2	
	N	%	N	%
klasa 1	20	(40%)	19	(38%)
klasa 2	25	(50%)	9	(18%)
klasa 3	3	(6%)	14	(28%)
klasa 4	2	(4%)	8	(16%)

klasa 1 = posiew ujemny, klasa 2 = od 1 do 5 kolonii
klasa 3 = od 6 do 15 kolonii, klasa 4 = powyżej 15 kolonii

Tabela 2. Zależność pomiędzy całkowitą liczbą limfocytów (CLL) a liczbą kolonii Candida albicans (rtgter. = radioterapia).

Table 2. Correlation between the total number of lymphocytes and the number of colonies of Candida albicans (rtgter. = radiotherapy).

liczba limfocytów w 1 mm ³	liczba kolonii Candida albicans							
	posiew ujemny		1 - 5 kolonii		6 - 15 kolonii		> 15 kolonii	
	przed rtgter.	po rtgter.	przed rtgter.	po rtgter.	przed rtgter.	po rtgter.	przed rtgter.	po rtgter.
> 1 500	5 (10%)		5 (10%)					
1 001 - 1 500	12 (24%)	12 (24%)	17 (34%)	2 (4%)	2 (4%)	4 (8%)	1 (2%)	1 (2%)
501 - 1 000	3 (6%)	5 (10%)	2 (4%)	4 (8%)	1 (2%)	8 (16%)	1 (2%)	6 (12%)
< 500		2 (4%)	1 (2%)	3 (6%)		2 (4%)		1 (2%)

zauważono prawidłowego poziomu CCL ($> 1\ 500$). Natomiast u 16% poziom ten kształtował się poniżej 500. U 34% chorych poddanych terapii promieniami jonizującymi liczba limfocytów była mniejsza niż 1 000, a liczba kolonii *Candida albicans* powyżej 5 w porównaniu z 4% przed leczeniem.

Interpretacja tych wyników powinna być jednak ostrożna ze względu na małą specyficzność testu. Osłabienie odporności podczas radioterapii sprawia, że chorzy są szczególnie wrażliwi na zakażenie. Maksymiuk i wsp. u 69% pacjentów leczonych z powodu nowotworów stwierdził obniżenie poziomu granulocytów obojętnochłonnych poniżej 1 000 w $1\ \text{mm}^3$, a u 60% poniżej 500 w $1\ \text{mm}^3$. U tych chorych średnio po około 11 dniach wystąpiło zakażenie *Candida* [12]. Podobną zależność zauważyli Degregorio i wsp. W badaniach, które przeprowadzili, uogólniona grzybica (*Candida*) wystąpiła tylko u osób mających poziom granulocytów poniżej 1 000 w $1\ \text{mm}^3$ [13].

Wraz z rozwojem medycyny wzrasta znaczenie radioterapii. Związane jest to z coraz lepszym sprzętem, a także postępem w zakresie technik napromieniowania. Pomimo tego, dużym ograniczeniem stosowania tego sposobu leczenia są występujące niekorzystne objawy uboczne, które ograniczają, a w niektórych przypadkach uniemożliwiają stosowanie tej metody. Jednym z takich niepożądanych powikłań jest zakażenie grzybicze, które może mieć wpływ na leczenie choroby podstawowej, jak i na dalsze rokowanie.

Knoke i wsp. zauważyli trzykrotny wzrost liczby pacjentów z grzybicą jamy ustnej leczonych w latach 1992-1995 w szpitalu w Greifswaldzie oraz procentowy wzrost innych grzybów drożdżopodobnych w stosunku do *Candida albicans* [14]. Stenderup stwierdził natomiast, że u pacjentów z chorobą nowotworową *Candida albicans* stanowi 73% wszystkich grzybów drożdżopodobnych jamy ustnej [15]. Batura-Gabryel w badaniach przeprowadzonych w latach 1992-1997 zauważyła obecność grzybów *Candida albicans* w materiale, który został pobrany z dróg oddechowych (dodatni wynik badań płwociny u 74% chorych na raka płuc) [16]. Przytoczyć tutaj można opracowanie Szponar, która na podstawie badań własnych i piśmiennictwa ocenia częstość występowania grzybów drożdżopodobnych w jamie ustnej osób zdrowych na 6% do 71% [17].

Zgodnie z danymi uzyskanymi przez Baturę-Gabryel u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc częściej spotyka się zakażenia *Candida*, za co może odpowiadać m.in. obniżony poziom limfocytów CD8 we krwi. Występujący w badaniach własnych prawidłowy poziom granulocytów obojętnochłonnych ($>2\ 000/\text{mm}^3$) może zatem sugerować, że u żadnego pacjenta nie doszło do uogólnionego zakażenia grzybiczego i do uszkodzenia w wyniku leczenia szpiku [18].

Wnioski

U pacjentów z nowotworami głowy i szyi leczonych chirurgicznie i radioterapią obserwuje się wzrost zakażeń

Candida albicans. Szczególnie dotyczy to chorych, u których odnotowano spadek poziomu całkowitej liczby limfocytów jak również granulocytów obojętnochłonnych.

Piśmiennictwo

1. Godlewski D. Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce. Ośrodek Profilaktyki i Epidemiologii Nowotworów w Poznaniu, 1998.
2. Daskalopoulou D, Rapidis AD, Maounis N, Markidou S. Fine-needle aspiration cytology in tumors and tumor-like conditions of the oral and Maxillofacial region: diagnostic reliability and limitations. *Cancer* 1997;81:238-52.
3. Hindle MC, Downer MC, Speight PM. The epidemiology of oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:471-6.
4. Majer H, Zoller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller W. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;108:655-61.
5. Muscat JE, Richie J, Thompson S, Wynder EL. Gender differences in smoking and risk for oral cancer. *Cancer Res* 1996;56:5192-7.
6. Stryjski A. Czynniki ryzyka u chorych leczonych z powodu nowotworów dna jamy ustnej - analiza przypadków. *Poznańska Stom T.* 2000;XXVII:73-80.
7. Darczuk D. Zmiany w jamie ustnej wywołane napromieniowaniem nowotworów głowy i szyi. *Stom Wsp* 1999;6:23-5.
8. Dreizen S, Daly TE, Drane JB, Brown LR. Oral complications of cancer radiotherapy. *Postgrad Med.* 1977;61:85-92.
9. Kochańska B. Uboczne skutki działania promieni jonizujących na tkanki jamy ustnej i kości szczęki. *Gdańska Stom* 1979:59-73.
10. Stryjski A. Występowanie zmian popromiennych w jamie ustnej u pacjentów leczonych z powodu nowotworów głowy i szyi. *Stom Wsp* 1999;5:8-12.
11. Borysewicz-Lewicka M, Stryjski A. Przydatność Vivacult N Testu w ocenie *Candida albicans* w ślinie chorych z nowotworami głowy i szyi poddanych radioterapii. *Stom Wsp* 2002;1:16-20.
12. Maksymiuk AW, Thongprasert S, Hopfer R, Luna M, Fainstein V, Bodey GP. Systemic Candidiasis in cancer patients. *Am J Med* 1984;30:20-7.
13. Degregorio MW, Lee WM, Linker CA, Jacobs RA, Ries CA. Fungal infections in patients with acute Leukemia. *Am J Med* 1982;73:543-8.
14. Knoke M, Schulz K, Bernhardt H. Dynamics of *Candida* isolations from humans from 1992-1995 in Greifswald, Germany. *Mycoses* 1997;40:105-10.
15. Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand* 1990;48:3-10.
16. Batura-Gabryel H. Niektóre aspekty patogenezy kandydozy. *Mikol Lek* 1999;6:113-8.
17. Szponar E. Drożdżycy jamy ustnej - diagnostyka i leczenie na podstawie piśmiennictwa i obserwacji własnych. *Poznańska Stom* 1992:135-40.
18. Batura-Gabryel H. Wybrane czynniki warunkujące występowanie grzybów z rodzaju *Candida* u chorych z przewlekłymi chorobami układu oddechowego bez neutropenii. Rozprawa habilitacyjna Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.