

# **Élesztőgombák és halitosis szájüregi laphámrákban- egy betegség két mikrobiológiai aspektusa**

A PhD értekezés tézisei



Dr. Berkovits Csaba, DMD, DDS  
Témavezető:  
Prof. Dr. Nagy Katalin, DDS, PhD  
Dr. Laczkóné Dr. Turzó Kinga, MS, PhD

Szegedi Tudományegyetem  
Fogorvostudományi Kar  
Szeged, 2017

## **A tézis alapjául szolgáló közlemények**

---

I. **Berkovits C**, Tóth A, Szenzenstein J, et al. Analysis of oral yeast microflora in patients with oral squamous cell carcinoma. *Springerplus*. 2016;5(1):1257.

Q1 IF: 0,982 (2015)

II. Szabó A, Tarnai Z, **Berkovits C**, et al. Volatile sulphur compound measurement with OralChroma(TM): a methodological improvement. *J Breath Res*. Jan 05 2015;9(1):016001.


Q1 IF: 4,177 (2015)

Összesített impakt faktor: 5,159

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Szabó Gábor (felelős társszerző) kijelentem, hogy Dr. Berkovits Csaba (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

Szeged, 2017.06.26.



szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Volatile sulphur compound measurement with OralChroma(TM): a methodological improvement  
Volatile sulphur compound measurement with OralChroma(TM): a methodological improvement.

Szabó A, Tarnai Z, Berkovits C, Novák P, Móbácsi Á, Braunitzer G, Rakonczay Z, Turzó K, Nagy K, Szabó G.

J Breath Res. 2015 Jan 5;9(1):016001. doi: 10.1088/1752-7155/9/1/016001.

PMID:  
25557613

Similar articles

## **Rövidítések jegyzéke**

---

**ASR-W** – korstandardizált súlyozott incidenciaráta

**IACR** – Rákregiszterek Nemzetközi Szövetsége

**BNO** – Betegségek Nemzetközi Osztályozása

**IL-8** – Interleukin 8

**MALDI-TOF MS**- mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós tömegspektrográfia repülési idő- analízissel

**TNF- $\alpha$**  – tumornekrózis faktor alfa

**VOC**- illékony szerves vegyület

**VSC**- illékony kénvegyület

## I. Bevezetés

---

A szájüregi daganatok (BNO C00-C14) a legsúlyosabb morbiditású és mortalitású daganatos megbetegedések közé tartoznak, ugyanakkor epidemiológiai jellemzőiket a földrajzi elhelyezkedés nagyban meghatározza: gyakoribbak a fejlett országokban, mint a fejlődő országokban.

Magyarország az európai országok között első helyen áll, úgy a szájüregi daganatok morbiditása, mint mortalitása terén. Ez tükröződik a WHO GLOBOCAN 2012 felmérése által megállapított súlyozott korstandardizált incidenciarátákban (ASR-W) is:<sup>1</sup> Magyarország esetén ez az érték 9,7, míg a szomszédos országok közül például Szlovákia 6,5-es, Románia 5,4-es, Ausztria pedig mindössze 4,2-es értéket ér el. Az európai országok közül egyébként Görögország ASR-W értéke a legalacsonyabb (1,6), Magyarország pedig, a már említett 9,7-es értékkel nem csupán közép-európai viszonylatban, hanem az egész európai régióban is első. Ugyanerre a tendenciára mutatnak rá a Nemzetközi Rákregiszter (IACR) és a Nemzeti Rákregiszter adatai is. Ennek a sajnálatosan figyelemre méltó pozíciónak a pontos oka egyelőre nem tisztázott teljes egészében és a jelenség feltehetően nem is magyarázható csupán néhány egyszerű és jól ismert faktoral, mint például a dohányzás vagy az excesszív alkoholfogyasztás (esetleg ezek kombinációja).

---

<sup>1</sup> Ez az érték az adott betegség incidenciáját egy ún. standard világpopulációhoz képest fejezi ki, 100000 főre vetítve figyelembe véve azt is, hogy az adott betegség egyes korcsoportokon belüli eloszlása nem egyenletes.

Sajnálatos módon Magyarország nem csak európai összehasonlításban foglal el vezető helyet a szájüregi daganatok tekintetében. ASR-W értékünk túlsz India „mindössze” 7,2-es értékén, és a szájüregi daganatokkal leginkább sújtott országként ismert Pakisztán standardizált rátája is csak egy tizeddel haladja meg Magyarországét, ami kétségtelenül riasztó adat.

Magyarország sajnálatos vezető pozíciója a szájüregi daganatos megbetegedések<sup>2</sup> és halálozás területén kézenfekvő téma a magyar klinikus-kutató számára. Ugyanakkor ez a téma szinte áttekinthetetlenül nagy, különösen egy PhD-disszertáció kereteihez képest. Ezért jelen dolgozatban két résztémát emeltem ki, azokat, amelyekkel klinikai- és kutatómunkám során a leggyakrabban találkoztam.

Az élesztőgombákat (különösen a *Candida* specieseket) számos szerző oki tényezőnek tartja a szájüregi laphámrák és a rákelelő állapotok kialakulásában. Jelen tézisben egy olyan saját kutatásunkat mutatok be, amelynek során szájüregi laphámrákban szenvedő betegek szájüregi élesztőgombaflóráját határoztuk meg, tekintettel arra a kérdésre is, hogy a laphámrákot kolonizáló fajok proteáz- és lipáztermelése (mint ismert virulenciafaktor) eltér-e az egészséges felszínről, illetve egészséges kontrollszemélyektől nyert minták enzimtermelésétől. Ezzel arra a kérdésre kívántunk választ találni, hogy az extracellularis hidrolitikus enzimtermelés a szájüregi laphámrák kolonizációjában meghatározó tényező-e.

---

<sup>2</sup> itt elsősorban a szájüregi laphámrákra gondolunk, minthogy az esetek 90%-ában erről a daganattípusról van szó.

Ismert, hogy a szájüregi laphámrákos betegek szájüregének mikrobiális összetétele minőségi és mennyiségi vonatkozásokban is eltér az egészséges szájüreg mikroflórájától. Ez egyben azt is jelenti, hogy a betegek által kilégtetett levegő összetétele eltér az egészséges viszonyok között regisztrálhatótól, ami gyakran halitosishoz vezet, hiszen a VOC-k/VSC-k szintje szájüregi laphámrákban emelkedett. Ennek igen súlyos pszichoszociális következményei lehetnek, ami miatt a halitosis kezelése kiemelt figyelmet érdemel. Ugyanakkor a kilégtetett levegő megváltozott összetétele (akár korai) diagnosztikai lehetőséget is kínálhatna, noha ezt a lehetőséget szájüregi laphámrák esetén feltűnően kevesebben vizsgálták, mint más daganatok (pl. tüdőcarcinoma) esetében. Az ilyen irányú kutatások relatív hiányának mindenképpen oka, hogy a halitometria céljára rendelkezésre álló eszközök és módszerek jelenleg nem eléggé pontosak és megbízhatóak. A disszertáció második részében egy elsősorban módszertani- fejlesztési irányú kutatást mutatok be, amelynek során egy már meglévő eszközt tettünk alkalmassá pontosabb diagnosztikára, és ezt a fejlesztést szájüregi laphámrákos betegekkel is teszteltük.

## II. Célkitűzések és hipotézisek

---

A. A candidiasissal kapcsolatos tanulmányunk céljai a következők voltak:

1. Az egészséges és laphámrákos epithelium élesztőgomba-flórájának jellemzése, különös tekintettel a *Candida* specierekre

2. Megvizsgálni, hogy a daganatfelszínről izolált *Candida* törzsek extracellularis lipáz/proteáz-termelése összefüggésbe hozható-e ezen törzsek kolonizációs képességével, illetve kolonizációs rátájával.

Feltételeztük, hogy a daganatos epithelialis felszínen az élesztőgombák nagyobb változatossága és szignifikánsan nagyobb száma lesz fellelhető, mint az egészséges felszínen, valamint feltételeztük, hogy az izolált *Candida* törzsek extracellularis hidrolitikus enzimtermelése összefüggésbe hozható lesz ezek jelentősebb kolonizációjával.

B. A halitosis vizsgálatával kapcsolatban az alábbi célokat és hipotéziseket fogalmaztuk meg:

1. Célunk volt, hogy fejlesztéseket eszközöljünk a halitosis diagnosztikájában használatos egyik legelfogadottabb, és hardver szempontjából legjobb eszköz, az OralChroma szoftverén, valamint, hogy ezt az új szoftvert szájüregi laphámrákos betegek és egészséges kontrollok bevonásával teszteljük. További cél volt, hogy



a mérési eredményeket összehasonlítsuk a másik legelterjedtebb mérőeszköz, a Halimeter azonos populáció mérési adataival, ez által is ellenőrizve az új szoftver megbízhatóságát és pontosságát.

2. Célul tűztük ki, hogy az OralChromát képessé tegyük izoprén és acetaldehid koncentrációjának meghatározására is.

3. Célul tűztük ki végül azt, hogy összehasonlítsuk a betegek és kontrollok által kilégzett levegő összetételét, tekintettel az izoprénre és acetaldehidre is.

Feltételeztük, hogy az új szoftver segítségével lehetővé válik az izoprén és acetaldehid koncentrációjának meghatározása, valamint, hogy a mérések az OralChroma által gyárilag meghatározható VOC-k tekintetében a gyári szoftverhez képest pontosabbá válnak. A kilégzett levegő összetételét illetően feltételeztük, hogy méréseink az irodalmi adatokkal összhangban azt fogják mutatni, hogy szájüregi laphámrákban a VOC-k koncentrációja emelkedett, az új vegyületek - az izoprén és az acetaldehid - tekintetében pedig eltérést tételeztünk fel a betegek és a kontrollok között.

### III. Szájüregi élesztőgomba-flóra laphámrákban

#### III.1. Háttér

A *Candida* speciesek szerepe a különféle karcinómák kialakulásában és a daganatos megbetegedés kórlefolyásában ma már evidenciának tekinthető, azonban ez nem volt mindig így. Annak ellenére, hogy már az 1960-as évektől kezdve merültek fel adatok ilyen összefüggésre, a téma kutatása csak az elmúlt két évtizedben vett lendületet. A karcinogenitás szempontjából a legfontosabb következtetésnek az tűnik, hogy a *Candida* fajok elsősorban a már meglévő premalignus léziók malignizálódása irányában hatnak. Emberben elsősorban a *Candida albicans* kóroki szerepe igazolt.

A karcinogén hatással kapcsolatban ugyanazok a fő irányok merülnek fel, mint egyéb mikrobiális tényezők esetén, azaz, hogy a *C. albicans* közvetlenül termel karcinogén vegyületeket, prokarcinogéneket metabolizál karcinogénekké vagy krónikus gyulladást alakít ki. Ezek a hatások természetesen párhuzamosan is jelentkezhetnek.

Az első kérdés, ami ebben a körben felvetődik, az, hogy a gomba hogyan kolonizálja az epitheliumot. Ezzel kapcsolatban az irodalomban kétféle hipotézissel találkozhatunk. Egyes szerzők feltételezik, hogy a *C. albicans* olyan enzimeket (főként aszpartát- proteázokat) termel, amelyek segítségével lebontja az epithelsejt felszíni komponenseit, így utat nyitva a hypháknak a sejt belseje felé, illetve a sejtek közé. Ezt a hipotézist mi magunk is vizsgáltuk (alább). Megfigyelték azt is, hogy a gomba a keratinocytákat az Als3 invazin segítségével

képes álláb-szerű struktúrák kibocsátására készíteni, amelyek aztán behúzzák a sejt belsejébe. A kolonizáció ugyanakkor nem csupán a *C. albicans* aktivitásának függvénye, hiszen bizonyítást nyert, hogy azt pl. a keratinocyta típusa és differenciáltságának foka is befolyásolja.

### III.2. Módszertan

A vizsgálatban összesen 60 fő vett részt. Ebből 20 szájüregi laphámsejtes karcinómával diagnosztizált beteg volt, 40 fő egészséges kontroll. A betegek (14 férfi és 6 nő) medián életkora 61,95 év volt. A kontrollok (22 férfi, 18 nő) medián életkora 67,62 év volt. A betegeket és kontrollokat a Szegedi Tudományegyetem Fogorvostudományi Kar Szájsebészeti Tanszékének és az Általános Orvostudományi Kar Arc-, Állcsont-, és Szájsebészeti Klinikájának betegei közül toboroztuk.

A betegek beválasztásának feltétele az volt, hogy esetükben a vizsgálat idejéig kezeletlen, szövettanilag igazolt szájüregi laphámsejtes karcinóma álljon fenn. A kontrollokat olyan páciensek közül választottuk, akik mentesek voltak a szájüregi mucosa bármilyen jellegű kóros elváltozásától. Ezek a betegek főleg fogeltávolítás vagy kontroll céljából érkeztek.

A mintavételezés (kenet) mind a betegek, mind a kontrollok esetében a szájüreg eltérő, hozzávetőleg  $1 \text{ cm}^2$  -nyi területeiről történt (kontrollok esetén 2 helyről, betegek esetén 4 helyről: 2-2 helyről az ép és a daganatos oldalon is).

A kolóniaképző egységek számlálásán túl a mintákat MALDI-TOF analízisnek és az extracelluláris hidrolitikus enzimtermelés vizsgálatának vetettük alá.

### III.3. Eredmények és összegzés

A 20 beteg közül 18 személy (90%) szájüregéből voltak élesztőgombák izolálhatók, az egészséges kontrollok közül ez mindössze 12 személy (30%) esetében sikerült. Az összefüggés a csoport és az élesztőgombakolonizáció között igen szignifikáns volt ( $p < 0.0001$ , Fisher's exact).

Azonban nem csupán több esetben voltak élesztőgombák izolálhatók a betegek csoportjában, de a kolóniaképző egységek is jóval számosabbak voltak (átlagosan  $73,08 \pm 33,39$  CFU/cm<sup>2</sup>, szemben a kontrolloknál számolt  $1,10 \pm 0,78$  CFU/cm<sup>2</sup> - rel). A statisztikai próba alapján igen szignifikáns különbség igazolódott ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney U). Összehasonlítást végeztünk ugyanazon betegek daganatos és egészséges epitheliuma között is. A daganatos oldalon átlagosan  $77,38 \pm 38,53$  CFU/cm<sup>2</sup> kolóniaképző egységet számláltunk, szemben az egészséges oldalon számlálható mindössze  $28,58 \pm 19,18$  CFU/cm<sup>2</sup> értékkel. A különbség itt, a látszólag nagy eltérés ellenére, nem bizonyult szignifikánsnak ( $p = 0,084$ ).

A MALDI-TOF a laphámrákos betegek esetében (a *Candidák* dominanciája mellett) a kontrolloknál nem megfigyelhető genusok jelenlétét igazolta.

Az extracellularis enzimtermelés nem bizonyult meghatározó tényezőnek a kolonizáció szempontjából. Ilyen értelemben eredményeink gyengítik azt a hipotézist, hogy ezen gombák hirdolitikus enzimtermelése lenne a meghatározó abból a szempontból, hogy az általuk kolonizált epithelium megindul-e a rákos elfajulás irányába.

## **IV. Egy, a kilégzett levegő összetételének elemzését szolgáló szoftveres fejlesztés tesztelése szájüregi laphámrákos betegek bevonásával**

---

### IV.1. Háttér

A halitosis nem más, mint kellemetlen szájszag, amely eredetét tekintve az esetek 90%-ában intraoralis, de lehet extraoralis is, egyébként pedig fiziológiás vagy kóros.

A háttérben leggyakrabban a szájüregi szerves szubsztrátok mikrobiális lebontása áll, amelynek folyamán illékony kénvegyületek ( $H_2S$ ,  $CH_3SH$ ,  $(CH_3)_2S$ ), diaminok (pl. kadaverin, putreszcin), valamint indol és szkatol képződhetnek. A kellemetlen szagért lényegében ezek a vegyületek a felelősek. Ezeket a vegyületeket főként olyan Gram-negatív anaerob baktériumok termelik, amelyekről kimutatták, hogy a laphámrákos epitheliumon felülreprezentáltak. Ez utóbbiból következik, hogy a szájüregi laphámrák - megfelelő kezelés hiányában - mindenképpen együtt jár valamilyen mértékű halitosisal.

A kilégzett levegőt a halitosis diagnosztikájában ma 3 fő módon elemezzük. az organoleptikus módszerrel, szulfidmonitorozással (Halimeter), illetve gázkromatográfiával (OralChroma).

Az organoleptikus módszer túlzottan szubjektív, a Halimeter inkább alkalmas az összesített VSC-koncentráció meghatározására, mint az egyes vegyületek közti különbségtételre, az OralChroma pedig kiváló hardverrel rendelkezik, de gyári szoftverének gyengeségei miatt pontatlan. Ez utóbbi probléma adta az ötletet, hogy

fejlesztést végezzünk, és az új szoftvert betegekkel is teszteljük.

## IV.2. Módszertan

Az új szoftvert az eszközök (Halimeter, OralChroma) megfelelő előkészítése és kalibrálása után teszteltük (ld. erről és a szoftverről részletesebben a tézis szövegét) szájüregi laphámrákban szenvedő betegek (2 nő, 12 férfi, átlagos életkor: 59,8 év) és egészséges, kiemelkedően jó szájhygiénével jellemezhető kontrollok bevonásával. (11 nő, 10 férfi, átlagos életkor: 35,6 év). A részvétel minden esetben önkéntes volt. A méréseket egyénenként háromszor, reggel 8:30 és 12:30 között végeztük, legalább 3 órával az utolsó étkezést/italfogyasztást és orálhygiénés tevékenységet követően. Kizárási kritériumok voltak: antibiotikus kezelés a mérések kezdetét megelőző 4 héten belül, hagyma és alkohol fogyasztása 2 nappal az egyes mérések előtt.

## IV.3. Eredmények és összegzés

Az új szoftverrel lehetővé vált  $\text{CH}_3\text{SH}$  és  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$  koncentrációinak meghatározása, amire a gyári szoftver nem volt képes. A metil-merkaptán igen kis koncentrációban is kimutatható volt, ami arra utal, hogy az új szoftverrel a mérések igen jó felbontással végezhetők. Ezen felül a szórások is csökkentek, és a haliméteres mérésekkel mutatott korreláció is javult.

A kilégzett levegő összetételét illetően méréseink megerősítették azt az irodalomban is gyakran leírt

megfigyelést, miszerint a szájüregi daganatos betegek összesített VSC-koncentrációja emelkedett. Némileg váratlanul hatott az az eredmény, hogy az acetaldehid koncentrációjában nem találtunk eltérést tekintve a tipikusnak tekinthető magyar szájüregi laphámrákos beteg alkoholfogyasztási szokásait és a mikroflóra fokozott acetaldehid-termelés irányába mutató, másutt leírt változásait. Megállapítottuk azt is, hogy az izoprén koncentrációja csökkentnek mutatkozik a szájüregi laphámrák esetében. Ezen utóbbi két eredmény értelmezése mindenképpen további vizsgálatokat kíván meg.

## V. Köszönetnyilvánítás

---

Kiemelt köszönettel tartozom első sorban témavezetőimnek, Prof. Dr. Nagy Katalinnak és Dr. Laczkóné Dr. Turzó Kingának. Nagy Katalin Professzor Asszony a Szegedi Tudományegyetemen töltött éveim alatt mindvégig nagy szeretettel és odaadással egyengette pályámat, Turzó Dékán Asszony pedig lehetőséget biztosított, hogy klinikusi munkám mellett kutatásokat is végezzek.

Nem kevesebb köszönet illeti Dr. Gácsér Attilát, aki a szájüregi gombák tanulmányozásához korszerű technikai háttérrel és tudást biztosított.

Mindenképpen hálával kell szólnom Sonkodi István Professzor Úrról, aki önzetlenül tette számomra lehetővé, hogy betegeivel dolgozzak.

Külön köszönetet érdemelnek szerzőtársaim az SZTE-TTIK kötelékéből, akik révén megismerkedhettem a kilégzett levegő analízisének aktuális állásával, módszertanával és a megválaszolásra váró kérdésekkel. Közülük is ki szeretném emelni Dr. Szabó Annát, aki a jelen tézis elkészítésében is nagy segítségemre volt.

A Szegedi Tudományegyetem Fogorvostudományi Karának Szájsebészeti Tanszéke napi munkakörnyezetem volt. Természetes tehát, hogy nekik is köszönetet mondok, hiszen abban, hogy a klinikum mellett kutatóként is tudtam dolgozni, az általuk megteremtett légkörnek nagy szerepe volt. Köszönöm mindannyiótoknak!