

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Barbara Dorocka-Bobkowska

**Stomatopatie protetyczne  
z towarzyszącym zakażeniem grzybami  
z rodzaju *Candida* u chorych na cukrzycę typu 2  
– badania kliniczne i laboratoryjne**

Poznań 2011

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
Poznań 2011

© Copyright by Barbara Dorocka-Bobkowska, Poznań 2011

*Tytuł angielski*

*Candida-associated denture stomatitis in patients with type 2 diabetes – clinical and laboratory studies*

*Recenzja wydawnicza*

prof. dr hab. Wiesław Hędzielek

*Korekta*

Janina S. Rogalińska

*Skład i łamanie*

Maciej Busza

ISBN 978-83-7597-123-1

Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
ul. Bukowska 70, 60-812 Poznań  
[www.wydawnictwo.ump.edu.pl](http://www.wydawnictwo.ump.edu.pl)

Ark. wyd. 5,3. Ark. druk. 9,3.

Papier offset 80 g/m<sup>2</sup> 70 × 100.

Format B5. Zam. nr 90/11.

Druk ukończono w maju 2011 r.

*Rodzicom i Nauczycielom moim dziękuję*

Praca wykonana w:

Klinice Protetyki

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Klinice Chorób Wewnętrznych i Diabetologii

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Pracowni Bakteriologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Department of Biomedical Sciences, School of Dentistry

University of the Pacific, San Francisco, USA



# Spis treści

|   |    |
|---|----|
| Wykaz skrótów stosowanych w pracy . . . . .   | 7  |
| 1. Wstęp . . . . .  | 9  |
| 1.1. Stomatopatie protetyczne powikłane zakażeniem grzybiczym . . . . .                     | 9  |
| 1.2. Czynniki chorobotwórczości grzybów rodzaju <i>Candida</i> . . . . .                    | 11 |
| 1.3. Rola biofilmu <i>Candida</i> w patogenezie stomatopatii protetycznej . . . . .         | 15 |
| 1.4. Stomatopatia protetyczna u chorych na cukrzycę typu 2 . . . . .                        | 17 |
| 2. Założenia i cele pracy . . . . .   | 20 |
| 3. Materiał i metody . . . . .  | 22 |
| 3.1. Materiał . . . . .   | 22 |
| 3.1.1. Grupa badana . . . . .   | 22 |
| 3.1.2. Grupa kontrolna . . . . .  | 23 |
| 3.2. Metody . . . . .   | 25 |
| 3.2.1. Badanie kliniczne . . . . .  | 25 |
| 3.2.2. Badania mikologiczne . . . . .   | 26 |
| 3.2.2.1. Identyfikacja izolowanych grzybów z rodzaju<br><i>Candida</i> . . . . .            | 26 |
| 3.2.2.2. Test filamentacji . . . . .  | 27 |
| 3.2.2.3. Ocena intensywności wzrostu grzybów . . . . .                                      | 27 |
| 3.2.2.4. Ocena wrażliwości grzybów na leki przeciwgrzybicze<br><i>in vitro</i> . . . . .    | 27 |
| 3.2.3. Ocena parametrów wyrównania glikemii oraz stężenia<br>białka C-reaktywnego . . . . . | 28 |
| 3.2.4. Badania doświadczalne nad biofilmem <i>Candida</i> . . . . .                         | 28 |
| 3.2.5. Analiza statystyczna . . . . .   | 33 |
| 4. Wyniki . . . . .   | 34 |
| 4.1. Wyniki badań klinicznych . . . . .   | 34 |
| 4.1.1. Objawy podmiotowe i stan kliniczny błony śluzowej jamy<br>ustnej . . . . .           | 34 |
| 4.1.2. Czas i sposób użytkowania uzupełnień protetycznych . . . . .                         | 41 |
| 4.1.3. Ocena użytkowanych uzupełnień protetycznych . . . . .                                | 43 |
| 4.1.4. Ocena higieny użytkowanych uzupełnień protetycznych . . . . .                        | 45 |
| 4.2. Wyniki badań mikologicznych . . . . .  | 48 |
| 4.2.1. Identyfikacja izolowanych grzybów z rodzaju <i>Candida</i> . . . . .                 | 48 |
| 4.2.2. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze <i>in vitro</i> . . . . .                        | 51 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3. Ocena parametrów wyrównania glikemii . . . . .                      | 57  |
| 4.4. Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi . . . . .             | 66  |
| 4.6. Wyniki badań doświadczalnych nad biofilmem <i>Candida</i> . . . . . | 68  |
| 5. Dyskusja . . . . .  | 73  |
| 6. Podsumowanie . . . . .  | 89  |
| 7. Wnioski . . . . .   | 91  |
| 8. Streszczenie. . . . .   | 92  |
| 9. Summary . . . . .   | 97  |
| 10. Piśmiennictwo . . . . .  | 101 |

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

- AGEs – produkty glikozylacji białek (*advanced glycation end products*)
- BMS – zespół pieczenia błony sluzowej jamy ustnej (*burning mouth syndrome*)
- CRP – białko C-reaktywne (*C-reactive protein*)
- FPG – poziom glukozy w osoczu na czczo (*fasting plasma glucose*)
- HbA1c – hemoglobina glikowana (*glycated hemoglobin*)
- IL-1 $\beta$  – interleukina-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* )
- IL-6 – interleukina-6 (*interleukin-6*)
- MIC – najniższe stężenie hamujące (*minimal inhibitory concentration*)
- NAC – szczepy *Candida* spp. (*non-albicans Candida*)
- PMMA – polimetakrylan metylu (*polymethylmethacrylate*)
- RMA – redukcja aktywności metabolicznej (*reduction in metabolic activity*)
- SD – odchylenie standardowe (*standard deviation*)
- sIgA – sekrecyjna IgA (*secretory IgA*)
- SPIG – stomatopatia protetyczna z towarzyszącym zakażeniem *Candida* (*Candida-associated denture stomatitis*)
- TNF $\alpha$  – czynnik martwicy guza (*tumour necrosis factor*)
- M – forma mycelialna (*Mycelium*)
- Y – forma blastosporowa (*Yeasts*)



# 1. Wstęp

## 1.1. Stomatopatie protetyczne powikłane zakażeniem grzybiczym

Stomatopatia protetyczna jest procesem zapalnym błony śluzowej podłoża protetycznego o różnym nasileniu i złożonej etiologii z dominującym udziałem urazu mechanicznego ze strony protezy oraz infekcji grzybiczej (Budtz-Jørgensen, 1977; Majewski i wsp., 2003; Mierzwińska-Nastalska, 1999; Spiechowicz i wsp., 1994a). Narastająca częstość występowania stomatopatii protetycznych oraz ich wieloczynnikowa etiologia czyni je problemem zarówno w aspekcie społecznym, jak i medycznym. W świetle obecnej wiedzy należy z całym przekonaniem podkreślić, że w etiopatogenezie stomatopatii najczęściej mamy do czynienia ze skojarzonym działaniem kilku czynników.

Występowanie stomatopatii protetycznych jest zjawiskiem narastającym i zależy od kraju i okresu badań. Majewski i wsp. (2003), oceniając występowanie stomatopatii w społeczeństwie polskim w grupie 800 użytkowników protez płytowych, wykazał objawy tego schorzenia u 40% pacjentów. Częstość występowania stomatopatii protetycznych w Stanach Zjednoczonych w populacji osób użytkujących protezy całkowite ocenia się na 34,4% (Shulman i wsp., 2005).

Mierzwińska-Nastalska i wsp. (2002) stwierdzili obecność grzybów drożdżopodobnych w 71% przypadków stomatopatii u użytkowników protez całkowitych. U chorych ze schorzeniami nowotworowymi oraz chorych na cukrzycę typu 2 nawet 100% przypadków stomatopatii jest powikłanych infekcją grzybiczą (Doročka-Bobkowska i wsp., 2010; Golecka i wsp., 2006). W ostatnich latach obserwuje się również wzrost częstości występowania zakażeń grzybiczych, najczęściej wtórnych, stanowiących powikłanie ciężkich chorób podstawowych. Grupą ryzyka szczególnie narażoną na rozwój infekcji grzybiczej są chorzy z zaburzeniami układu immunologicznego (AIDS, neutropenia), pacjenci z chorobami nowotworowymi, zwłaszcza ci poddani chemioterapii lub radioterapii oraz chorzy na cukrzycę. Wprowadzenie do leczenia metod diag-

nostycznych o charakterze inwazyjnym spowodowało dalszy, znaczący wzrost występowania zakażeń grzybiczych, najczęściej wywołanych grzybami rodzaju *Candida* (Jainkittivong i wsp., 2002; Sims i wsp., 2005; Spiechowicz i wsp., 1995b; Szymankiewicz i Kowalewski, 2005; Ten Cate i wsp., 2009).

Prowadzone w ostatnich latach badania dostarczają wielu informacji, które pozwalają na bardziej precyzyjną ocenę patogenezы infekcji grzybiczej w rozwoju stomatopatii. Według współczesnej wiedzy istotą zakażenia grzybiczego w przebiegu stomatopatii protetycznej jest ilościowy wzrost endogennej flory grzybiczej, który dotyczy błony śluzowej pod płytą protezy i jej powierzchni dośluzowej, która jest kolonizowana przez drobnoustroje tworzące strukturę biofilmu. Proces dojrzewania drobnoustrojów w populacji biofilmu polega na indukcji lub supresji specyficznych genów oraz zmianie cech fenotypowych komórek planktonicznych w cechy charakterystyczne dla komórek struktury dojrzałego biofilmu (Coco i wsp., 2008; Donlan, 2001; Ramage i wsp., 2004). Proteza akrylowa stwarza korzystne, lokalne warunki do rozwoju drobnoustrojów, poprzez pozbawienie błony śluzowej buforującego i spłukującego działania śliny, obniżenie pH pod płytą protezy oraz obniżenie zawartości tlenu (Nikawa i wsp., 2005; Radford i wsp., 1999; Spiechowicz i wsp., 1994a).

Stwierdzono, że dotkankowa inwazja grzybów w przebiegu stomatopatii protetycznych zdarza się niezwykle rzadko (Budtz-Jørgensen, 1970). Majewski (1982), badając rozmieszczenie komórek grzybów w stosunku do nabłonka, stwierdził, że lokalizują się one głównie na powierzchni komórek nabłonkowych, lub rzadziej, w przestrzeniach międzykomórkowych, podczas gdy w głębszych warstwach błony śluzowej autor nie stwierdził obecności grzybów, co wyklucza mechanizm zakażenia na drodze bezpośredniej, dotkankowej penetracji. Budtz-Jørgensen (1971), na podstawie doświadczalnego modelu zakażenia grzybiczego w przebiegu stomatopatii protetycznych u małp, nie wykazał inwazji dotkankowej mycelialnych form *C. albicans*, nawet w przypadkach, gdy wzrost grzybów był wzmocniony stosowaniem antybiotyków z grupy tetracyklin.

Badania wielu autorów dostarczają informacji wskazujących na udział czynnika immunologicznego w patogenezie stomatopatii protetycznych powikłanych infekcją grzybiczą. Dotyczy to zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej (Leigh i wsp., 2002; Mierzwińska, 1999; Pietruski i wsp., 2000). W surowicy ludzkiej mogą znajdować się naturalne przeciwciała przeciwko

grzybom z rodzaju *Candida*, obecność których związana jest z bezobjawowym nosicielstwem grzybów drożdżopodobnych. Jednak w tych przypadkach miano przeciwciał jest niskie i nie przypisuje się mu wartości diagnostycznej. Dopiero podwyższenie miana może sugerować istniejące lub przebyte zakażenie (Farah i wsp., 2010; Fidel, 2002; Kantardjiev i Popova, 2002). Majewski (1982) w badaniach immunologicznych pacjentów ze stomatopatią, stosując antygeny szczepów własnych, tzn. izolowanych ze zmian chorobowych pacjenta, uzyskał dodatni odczyn aglutynacji w 100% badanych przypadków. Budtz-Jørgensen (1990) w warunkach *in vitro* wykazał, że w przebiegu stomatopatii z towarzyszącą infekcją grzybiczą dochodzi do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Do podobnych wniosków doszła Mierzwińska (1977; 1978), w badaniach której leukocyty jednojądrzaste, izolowane od chorych z zakażeniem grzybiczym w przebiegu stomatopatii protetycznych, wykazywały obniżoną aktywność cytotoksyczną zależną od udziału przeciwciał oraz obniżoną aktywność angiogenetyczną, w porównaniu z aktywnością leukocytów jednojądrzastych izolowanych od osób zdrowych.

## 1.2. Czynniki chorobotwórczości grzybów rodzaju *Candida*

Patogenność grzybów drożdżopodobnych jest wypadkową wielu czynników, takich jak, dimorfizm, produkcja toksyn i enzymów, zmienność fenotypowa, mimikra oraz zdolność przylegania. Zjawisko przylegania odgrywa kluczową rolę w patogenezie zakażenia grzybiczego, gdyż umożliwia kolonizację i ewentualną inwazję dotkankową drobnoustroju. Adhezja jest wynikiem interakcji między adhezynami grzyba a komplementarnymi cząsteczkami na powierzchni nabłonka, zwanymi ligandami (Macura i Bort, 2001; Szkaradkiewicz, 2002; Tronchin, 2008). Adhezja jest złożonym procesem, uwarunkowanym przez działanie czynników specyficznych (interakcja receptor-ligand), jak i niespecyficznych (siły elektrostatyczne, elektrodynamiczne, interakcja hydrofobowa) (Filler, 2006; Sundstrom, 1999). Ściana komórkowa grzybów jest zbudowana z wielocukrów, głównie polimerów glukanu i mannanu oraz chityny. Znajdujące się na powierzchni komórki fibrylle, zbudowane z glikoprotein, uznaje się

za niezbędny warunek przylegania grzybów do nabłonka (Filler, 2006). Istnieją dowody, iż adhezyną *C. albicans* jest mannoproteina, która odgrywa kluczową rolę w wykształceniu fibrylnej warstwy ściany komórkowej grzybów, mającej własności adhezyjne (Elguezabal i wsp., 2004; Nobile i wsp., 2008; Szkaradkiewicz i wsp., 1998).

Wyniki badań doświadczalnych wskazują, że hydrofobowe właściwości błony komórkowej grzybów mają istotne znaczenie w procesie adhezji tych drobnoustrojów do nabłonka i tworzyw sztucznych. Wykazano, że szczepy *Candida* o silnych właściwościach hydrofobowych wykazują wyższą zdolność przylegania aniżeli szczepy nieagregujące (Macura, 1993; Ten Cate i wsp., 2009). Dowiedziono również, że przyleganie grzybów do powierzchni akrylu było zależne od własności hydrofobowych, zarówno powierzchni akrylu jak i grzybów. Preinkubacja grzybów z substancjami obniżającymi ich hydrofobowość powoduje obniżenie zdolności adhezji tych drobnoustrojów do nabłonka policzka i do powierzchni akrylu (Koczorowski i Szkaradkiewicz, 2003; Yoshijima i wsp., 2010).

W licznych badaniach wykazano istotny wpływ wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA, *secretory IgA*) zawartej w ślinie na zjawisko adhezji grzybów drożdżopodobnych do powierzchni nabłonka oraz biomateriałów. Dowiedziono, iż sIgA, poprzez wiązanie z adhezynami drobnoustrojów, blokuje ich połączenie z receptorami komórek nabłonkowych gospodarza i tym samym hamuje kolonizację i dalszą inwazję dotkankową drobnoustroju (Ueta i wsp., 2000; San Millán i wsp., 2000).

Zmienność morfologiczna jest uważana za ważny czynnik wirulencji grzybów. Drobnoustroje gatunku *C. albicans* mogą występować w formie drożdżowej jako pączkujące komórki – blastospori, określane jako forma Y (*Yeasts*) lub w formie mycelialnej M (*Mycelium*), zawierającej strzępki rzekome lub prawdziwe. Konwersja formy Y w formę M wiąże się z reorganizacją cytoszkieletu komórki, ze wzrostem ilości chityny w ścianie komórkowej grzybów oraz z syntezą specyficznych białek strukturalnych i enzymów (Billhan i wsp., 2009; Lopez-Ribot, 2005). Powyższe zmiany wpływają na właściwości hydrofobowe komórek grzybów i tym samym na ich zdolności adhezyjne. Zidentyfikowano geny odpowiedzialne za kontrolę procesu morfogenezy grzybów *C. albicans*, który jest złożonym procesem, uwarunkowanym genetycznie. Podstawowym



genem supresorowym filamentacji jest gen TUP1, regulacja pozytywna odbywa się głównie szlakiem kinazy A zależnej od cAMP-PKA (*cAMP dependent protein kinase A*) oraz kinazy aktywowanej mitogenem (*mitogen activated protein kinase*) (Nawrot i Karpiewska, 2002; Watanoto i wsp., 2009).

Kolejnym istotnym czynnikiem patogenności grzybów jest mimikra antygenowa. Wykazano, że drobnoustroje z rodzaju *Candida* indukują zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową. Działanie immunogenne wykazują mannoproteiny, glikan, chityna, a także białka wewnątrzkomórkowe uwalniane po lizie komórki (Nawrot i Karpiewska, 2002; Szkaradkiewicz i wsp., 1998). Zjawisko mimikry molekularnej polega na występowaniu u grzybów antygenów podobnych do antygenów gospodarza, co umożliwia tym drobnoustrojom maskowanie się przed układem immunologicznym i jest jedną ze strategii unikania odpowiedzi immunologicznej przez grzyby. Uzupełnieniem zjawiska mimikry molekularnej jest zjawisko zmienności fenotypowej grzybów. Polega ono na zdolności występowania różnych fenotypów w obrębie tego samego gatunku grzybów. Poszczególne fenotypy różnią się między sobą morfologią, właściwościami biochemicznymi, zdolnością adhezji oraz produkcji toksyn i enzymów. Zmienność fenotypowa jest wynikiem zmian na poziomie molekularnym komórki, wpływa ona istotnie na patogenność drobnoustroju (Fidel, 2002; Nawrot i Karpiewska, 2002).

W patogenetycznej roli grzybów opisuje się też działanie toksyn i enzymów hydrolitycznych produkowanych przez komórki grzybów. Toksyny i enzymy produkowane i uwalniane w trakcie rozmnażania i obumierania komórek grzybów inicjują proces zapalny poprzez efekt cytopatogeny, prowadzący do uszkodzenia komórek nabłonka (Louie i wsp., 1994; Majewski i Macura, 1983). Wykazano, iż enzymami, które odgrywają najważniejszą rolę w chorobotwórczości grzybów z rodzaju *Candida* są proteazy i fosfolipazy. Grzyby te produkują między innymi lipazę (Lip 1-10), fosfolipazy oraz proteazę aspartylową (SAP 1-10) (Abaci, 2011; Pinto i wsp., 2008; Schaller i wsp., 2005). Wykazano, iż proteazy wspomagają proces adhezji drobnoustrojów do komórek nabłonka. Enzymy lipolityczne na drodze degradacji fosfolipidów stanowią źródło węgla, który jest niezbędny w procesie wzrostu i namnażania grzybów. Fosfolipazy uszkadzają komórki błony śluzowej, ułatwiając tym samym penetrację dotkankową drobnoustroju. Z kolei enzymy hydrolityczne, odpowiedzialne za rozkład

związków wielkocząsteczkowych, ułatwiają grzybom proces kolonizacji (Braga-Silva i Santos, 2011; Zhu i Filler, 2010).

Enzymy z grupy proteaz w sposób szczególnie istotny wpływają na patogenność grzybów rodzaju *Candida*. Odpowiedzialne są one za proces degradacji komórek nabłonka oraz wybranych czynników odpowiedzi immunologicznej (cytokin oraz immunoglobulin). Modyfikują one również antygeny powierzchniowe komórek grzyba, wspomagając tym samym proces adhezji, kolonizacji i inwazji dotkankowej drobnoustroju (Abaci, 2011; Schaller i wsp., 2005). Wśród proteaz szczególnie istotna rola przypada proteazie aspartyłowej (SAP). Występuje ona w postaci 10 izoenzymów kodowanych przez geny SAP 1-10. Stwierdzono, iż w genomie *C. albicans* występuje najwięcej, 10 genów SAP, w genomie *C. dubliniensis* odkryto 9 genów, *C. tropicalis* 4 geny, a w genomie *C. parapsilosis* odkryto 2 geny SAP (Braga-Silva i Santos, 2011; Naglik i wsp., 2003). Wśród powyższych genów w procesie patogenezy zakażenia grzybiczego najlepiej poznano funkcję genów SAP 1-6. Stwierdzono, iż proteazy SAP 1-3 występują głównie w formie blastosporowej grzybów i są one odpowiedzialne za proces adhezji grzybów do komórek nabłonka. Proteazy SAP 4-6 występują przede wszystkim w formie mycelialnej grzyba, zaś proteazy SAP 5-7 obserwuje się w strukturze biofilmu grzybów *Candida*. Obecnie prowadzone są badania nad poszukiwaniem inhibitorów proteaz aspartyłowych *Candida*, które będą uniemożliwiać proces kolonizacji i inwazji dotkankowej grzybów (Braga-Silva i Santos, 2011; Gropp i wsp., 2009; Naglik i wsp., 2003).

### 1.3. Rola biofilmu *Candida* w patogenezie stomatopatii protetycznej

Badania ostatnich lat dowiodły, iż tworzenie biofilmu przez grzyby z rodzaju *Candida* odgrywa kluczową rolę w patogenezie stomatopatii protetycznej (Gendreau i Loewy, 2011; Ramage i wsp., 2004). Biofilm *Candida* jest heterogenną, zorganizowaną przestrzennie strukturą, składającą się z komórek i materiału pozakomórkowego. Struktura biofilmu posiada rozgałęziony system kanałów, który umożliwia dostarczenie substancji odżywczych do głębiej położonych warstw komórek (Baillie i Douglas, 2000; Davey i wsp., 2000; Ramage i wsp., 2009). Zróżnicowanie patomechanizmu adhezji grzybów *Candida* umożliwia kolonizowanie wielu ontocenz gospodarza, komórek nabłonkowych, komórek śródbłonna oraz powierzchni biomateriałów, takich jak polimetakrylan metylu, silikon elastomerowy, polichlorek winylu (Mnichowska-Polanowska i wsp., 2009a). Do rozwoju zakażenia w miejscu zastosowania powyższych biomateriałów może dochodzić na drodze endogennej (drogą układu krążenia) lub częściej egzogennej, gdzie źródłem drobnoustrojów jest mikroflora własna skóry i błon śluzowych pacjenta. Udowodniono, że obfity biofilm *Candida* może powstawać na powierzchni polimetakrylanu metylu, tworzywa wykorzystywanego do wytwarzania protez zębowych. Szorstkość powierzchni dośluzowej płyty protezy sprzyja powstawaniu obfitego biofilmu *Candida*. Istniejąca pod płytą protezy duża wilgotność, podwyższona temperatura oraz brak oczyszczającego działania śliny dodatkowo sprzyjają namnażaniu drobnoustrojów (Nikawa i wsp., 2000; Redding i wsp., 2009; Salerno i wsp., 2010).

Proces powstawania struktury biofilmu *C. albicans* na powierzchni metakrylanu metylu zachodzi w trzech fazach: wczesnej, trwającej do 11 godzin, pośredniej (12–30 godzin) oraz dojrzewania (38–72 godzin). Podczas pierwszych 2 godzin, w tzw. fazie adhezji, pływające komórki planktoidalne *C. albicans*, które występują najczęściej w formie drożdżowej (blastospora), osiadają na powierzchni tworzywa i przyłączają się do tej powierzchni. Pierwsze mikrokolonie widoczne są już po 3–4 godzinach od momentu inokulacji polimetakrylanu metylu zawiesiną *C. albicans*. W fazie pośredniej dominuje rozwój struktury pozakomórkowej (macierzy), której głównym składnikiem są polisacharydy

ściany komórkowej, zawierające mannozę i reszty glikozydowe. W trakcie fazy dojrzewania struktury biofilmu następuje dalszy przyrost substancji pozakomórkowej, aż do momentu całkowitego otoczenia przez nią powstałych kolonii *Candida* (Chandra i wsp., 2001a; Dorocka-Bobkowska i Konopka, 2003; Nett i wsp., 2010).

Charakterystyczną cechą komórek grzybów żyjących w środowisku biofilmu jest ich oporność na większość obecnie stosowanych leków przeciwgrzybiczych, co powoduje komplikacje terapeutyczne (Mishra i wsp., 2007; Mni-chowska-Polanowska i wsp., 2009b; Niimi i wsp., 2010). Wykazano, że komórki grzybów rosnące w populacji biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu charakteryzują się zwiększoną opornością na działanie amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu oraz chlorheksydyny w porównaniu z komórkami tych samych drobnoustrojów w formie planktoidalnej (Chandra i wsp., 2001b). Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, badając oporność grzybów biofilmu *C. albicans* wobec amfoterycyny B, nystatyny, flucytozyny oraz ketokonazolu (Hawser i wsp., 1996; Seneviratne i wsp., 2008).

Kuhn i wsp. (2002a) wykazali wysoką oporność *C. albicans* i *C. parapsilosis* rosnących w populacji biofilmu na flukonazol, nystatynę, amfoterycynę B, oraz pochodne azolowe – vorikonazol i ravukonazol. Oba powyższe gatunki *Candida* rosnące w postaci biofilmu były wrażliwe na lipidowe preparaty amfoterycyny B (liposomalna amfoterycyna B i lipidowy kompleks amfoterycyny B) oraz na echinokandyny, caspofunginę i micafunginę (Bachman i wsp., 2002). Echinokandyny stanowią grupę leków przeciwgrzybiczych, które hamują syntezę 1,3- $\beta$ -D-glukanu, głównego składnika ściany komórkowej grzybów (Kuhn i wsp., 2002b).

Mimo prowadzenia wielu badań, mechanizmy biologiczne, obniżające wrażliwość grzybów w populacji biofilmu na dostępne leki przeciwgrzybicze, nie zostały jak dotąd dostatecznie poznane. Komórki mikroorganizmów żyjących w środowisku biofilmu różnią się fenotypowo od komórek wolnożyjących. Specyficzne warunki, jakie występują w mikrośrodkowisku biofilmu, zwłaszcza gęstość komórek, istniejąca w tej niszy ekologicznej, oraz ich kontakt z powierzchnią substratu, mogą brać udział w powstawaniu fenotypu charakterystycznego dla biofilmu (Mah i wsp., 2001; Ramage i wsp., 2009).

## 1.4. Stomatopatia protetyczna u chorych na cukrzycę typu 2

Cukrzyca należy obecnie do najczęściej występujących schorzeń przewlekłych, i ze względu na stale rosnącą liczbę zachorowań zalicza się ją do chorób cywilizacyjnych. Liczba chorych na cukrzycę stale wzrasta, osiągając skalę pandemii. Według prognoz 366 mln osób, czyli 4,4% populacji na świecie będzie chorować na cukrzycę w 2030 roku (Shaw i wsp., 2010). Cukrzyca typu 2 stanowi ponad 90% wszystkich przypadków zaburzeń gospodarki węglowodanowej. W populacji polskiej wskaźnik chorobowości kształtuje się na poziomie 3–4%, jest nieco wyższy u kobiet i wykazuje tendencję wzrostową. W populacji powyżej 65. roku życia częstość występowania cukrzycy sięga nawet 25% (Moore i wsp., 2005; Shaw i wsp., 2010).

Cukrzyca w wieku podeszłym stanowi poważny problem kliniczny, starzenie się organizmu wiąże się z zaburzeniami metabolizmu węglowodanów. W patogenezie cukrzycy typu 2 bierze udział zarówno upośledzenie wrażliwości tkanek obwodowych na działanie insuliny, jak również zaburzenia jej wydzielania przez komórki  $\beta$  trzustki (Górska-Ciebiada, 2009; Wierusz-Wysocka, 2001).

Stwierdzono, iż u ponad 50% chorych na cukrzycę typu 2 w momencie rozpoznania schorzenia stwierdza się obecność powikłań narządowych (Naskręt i Zozulińska, 2002). Dochodzi do zmian w strukturze i czynności naczyń włosowatych (mikroangiopatia cukrzycowa) oraz tętniczek i tętnic (makroangiopatia), obwodowego układu nerwowego (polineuropatia) oraz niektórych narządów, jak nerki, wątroba, układ kostny. U podstaw złożonego procesu patogeny mikro- i makroangiopatii cukrzycowej leżą czynniki genetyczne, hiperglikemia i insulinooporność tkanek, zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy, dyslipidemia oraz zaburzenia funkcji śródbłonna (Naskręt i Zozulińska, 2002). Wykazano zależność pomiędzy parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy a rozwojem przewlekłych powikłań (Piłaciński i wsp., 2005). Miarą wyrównania cukrzycy w aspekcie długoterminowym jest oznaczanie odsetka hemoglobiny glikowanej (HbA1c, *glycated hemoglobin*). Udoskonalenie i standaryzacja metod oznaczania wartości HbA1c pozwoliły uzyskać dużą dokładność analizy (Nakagami w wsp., 2010).

Spostrzeżenia kliniczne wykazują, że u chorych na cukrzycę, zakażenia grzybicze oraz bakteryjne są częstsze i charakteryzują się na ogół cięższym klinicznym przebiegiem (Bader i wsp., 2004; Dorocka-Bobkowska i wsp., 2010). Uważa się, że jedną z przyczyn są obserwowane w cukrzycy zaburzenia metaboliczne, które prowadzą do upośledzenia swoistych mechanizmów obrony, zarówno komórkowej jak i humoralnej. Przeprowadzona przez Wierusz-Wysocką (1983) ocena układu granulocytów obojętnochłonnych u chorych na cukrzycę ujawniła istnienie szeregu zaburzeń czynności tych komórek (upośledzenie chemotaksji, agregacji i adhezji oraz śródkomórkowego zabijania drobnoustrojów). Zdaniem autorki zaburzenia te zdają się być odpowiedzialne za upośledzenie odporności nieswoistej u tych chorych.

Objawy cukrzycy w jamie ustnej opisane zostały po raz pierwszy przez Seiferta w 1862 roku (wg Frączak i wsp., 2002). Najczęściej zgłaszane skargi przez chorych na cukrzycę to suchość jamy ustnej, pieczenie języka i błony śluzowej jamy ustnej oraz zapalenie kątów ust. Wykazano również ścisłą zależność między stopniem destrukcji przyzębia a zapadalnością na cukrzycę (Banach, 2009; Frączak i wsp., 2002; Madejczyk i Bachanek, 2001; Ship, 2003). U chorych leczonych protetycznie cukrzyca należy do najczęstszych schorzeń ogólnoustrojowych upośledzających odporność błony śluzowej jamy ustnej na działanie czynnika urazowego oraz sprzyjających rozwojowi infekcji. Stomatopatie protetyczne powikłane zakażeniem grzybiczym należą do przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2, stwierdzanych u około 58% pacjentów, użytkowników protez całkowitych. Ze względu na zaburzoną zdolność odnowy tkanek, gojenie owrzodzeń odleżynowych spowodowanych użytkowaniem protez u chorych na cukrzycę jest utrudnione (Dorocka-Bobkowska i wsp., 1996; Guggenheimer i Moore, 2000a). Zmniejszone wydzielanie śliny daje w konsekwencji upośledzenie jej oczyszczającego działania w stosunku do błony śluzowej oraz obniża działanie zawartych w niej substancji przeciwdrobnoustrojowych, zwiększając tym samym możliwość infekcji (Guggenheimer i Moore, 2003; Madejczyk i Bachanek, 2001).

W ostatnich latach coraz większe znaczenie w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy przypisuje się procesowi zapalnemu, w trakcie którego dochodzi do uruchomienia zespołu mechanizmów obronnych, określanych jako odpowiedź ostrej fazy. Rola białek ostrej fazy polega na ograniczaniu proce-

sów destrukcyjnych oraz stymulowaniu procesów odtwórczych i naprawczych w celu przywrócenia homeostazy ustroju (Fukuhara i wsp., 2007; Pradhan i wsp., 2001). Szczególną pozycję wśród białek ostrej fazy zajmuje białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), które jest czułym markerem stanu zapalnego, odzwierciedlającym jego nasilenie (Lund i wsp., 2009; Skowroński i wsp., 2005). Syntetyzowane jest głównie w wątrobie w odpowiedzi na działanie cytokin prozapalnych, interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , *interleukin-1 $\beta$* ), czynnika martwicy guza TNF $\alpha$  (*tumour necrosis factor*) i interleukiny-6 (IL-6, *interleukin-6*) (Skowroński i wsp., 2005). Stężenie CRP w przebiegu zapalenia lub procesu martwiczego szybko wzrasta, co pozwala na wykorzystanie go jako markera procesów zapalnych.

Podwyższenie poziomu CRP wykazano w zaawansowanych postaciach zapalenia przyzębia, co potwierdzono prowadząc badania doświadczalne na zwierzętach. Podanie dożylnie bakterii *Porphyromonas gingivalis* znacząco nasilało zmiany zapalne w naczyniach, jak również powodowało podwyższenie poziomu CRP oraz IL-6 w surowicy krwi (Górska 2009; Noack i wsp., 2001; Salzberg i wsp., 2006). Stwierdzono wzrost stężenia CRP w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2, najwyższe wartości wykazując u chorych z obecnością przewlekłych powikłań (Franek i wsp., 2010; Lund i wsp., 2009; Pisarczyk-Wiza i wsp., 2002; Skowroński i wsp., 2005).

W podsumowaniu części wstępnej warto podkreślić, iż powszechność schorzenia jakim są stomatopatie protetyczne oraz liczne wątpliwości problemu etiopatogenezy tego schorzenia, skłaniają do prowadzenia interdyscyplinarnych badań naukowych, które przyczynią się do znalezienia efektywnych metod leczenia oraz prowadzenie skutecznej profilaktyki stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym.



## 2. Założenia i cele pracy

Według najnowszych badań populacja osób w wieku podeszłym w Polsce ciągle wzrasta, obecnie szacuje się, iż osoby 65-letnie i starsze stanowią około 13,5% społeczeństwa. Prognozy wskazują, iż w wyniku procesu starzenia, kraj nasz będzie charakteryzował się wysokim wskaźnikiem wieku ludności. Szacuje się, że w 2035 roku odsetek ludzi powyżej 65. roku życia będzie wynosił ponad 23%. Wiąże się to ze wzrostem liczby osób bezzębnych, a tym samym wzrasta liczba użytkowników ruchomych uzupełnień protetycznych, zwłaszcza protez całkowitych.

Cukrzyca typu 2 jest najczęstszym typem cukrzycy, stanowi 90% wszystkich przypadków zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Szacuje się, że w Polsce na cukrzycę typu 2 choruje około 2 milionów osób. Światowa Organizacja Zdrowia przewiduje, że do roku 2025 liczba chorych na cukrzycę wzrośnie do 5,4%, a w populacji osób między 65. a 74. rokiem życia nawet do 25%. Wobec faktu starzenia się populacji w Polsce obserwuje się rosnącą grupę chorych na cukrzycę typu 2, której często towarzyszą liczne powikłania. Stomatopatie protetyczne z towarzyszącą infekcją grzybiczą należą do przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2, stwierdzanych u około 58% pacjentów, użytkowników protez całkowitych.

Mimo wprowadzanych nowych leków i modeli terapeutycznych, wzrasta odsetek chorych z niewyrównaną cukrzycą. Liczne badania wskazują na istotną zależność pomiędzy parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy a rozwojem przewlekłych powikłań o charakterze mikroangiopatii i makroangiopatii. Pomiar odsetka HbA1c jest parametrem długoterminowego wyrównania glikemii u chorych na cukrzycę. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień wskazujących w jakim stopniu parametry wyrównania metabolicznego cukrzycy hamują progresję czy też zapobiegają powstawaniu odległych powikłań związanych z leczeniem protetycznym u chorych na cukrzycę typu 2.

Powstawanie struktury biofilmu *Candida* na powierzchni tworzywa akrylowego płyty protezy odgrywa kluczowe znaczenie w patogenezie stomatopatii protetycznej u pacjentów użytkujących protezy ruchome. Z punktu widzenia zjawiska narastającej lekooporności gatunków grzybów z rodzaju *Candida* na



leki przeciwgrzybicze stosowane w terapii stomatopatii powikłanej zakażeniem grzybiczym, istotna jest ocena wrażliwości komórek biofilmu na działanie leków przeciwgrzybiczych. Synteza pochodnych azolowych, posiadających wysoki wskaźnik terapeutyczny otworzyła nowy etap w leczeniu grzybic. Wśród pochodnych imidazolowych, mikonazol znalazł szerokie zastosowanie w leczeniu infekcji miejscowych. Charakteryzuje się on wysoką aktywnością przeciwgrzybiczą. Lek ten jest stosowany w leczeniu grzybic powierzchniowych skóry i błon śluzowych oraz stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym, gdzie może być stosowany w postaci żelu, lakieru, aplikowanego na powierzchnię dośluzową płyty protezy, oraz dodawany do materiałów służących do podścielania protez.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki przeprowadzono badania, których celem było:

1. Określenie występowania i nasilenia objawów klinicznych stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybiczym u chorych na cukrzycę typu 2.
2. Ocena wpływu czynników związanych z użytkowaniem ruchomych uzupełnień protetycznych na powstawanie objawów stomatopatii protetycznej.
3. Analiza zależności pomiędzy parametrami wyrównania glikemii a wykładnikami zakażenia grzybiczego u chorych na cukrzycę typu 2 z objawami stomatopatii protetycznej.
4. Ocena wpływu działania azotanu mikonazolu na aktywność metaboliczną komórek grzybów rodzaju *Candida* tworzących strukturę biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu w warunkach *in vitro*.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Materiał

Badania przeprowadzono w grupie 110 chorych ze stomatopatią proteptyczną i cukrzycą typu 2 (grupa I) oraz 50 chorych z objawami stomatopatii proteptycznej bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (grupa II). W każdym przypadku uczestników poinformowano o celu badania i uzyskano ich zgodę na udział w badaniach. Projekt badawczy uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

##### 3.1.1. Grupa badana

Badaniami objęto 110 chorych na cukrzycę typu 2 skojarzoną z otyłością, z objawami stomatopatii proteptycznej powikłanej infekcją grzybiczą, (63 kobiety i 47 mężczyzn), w wieku od 40 do 85 lat (średnia wieku  $\pm$  SD:  $63,2 \pm 10,5$ ), leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (grupa I). Nie stwierdzono istotnej różnicy wieku pomiędzy kobietami i mężczyznami w badanej grupie (średnia wieku  $\pm$  SD:  $65,1 \pm 11,0$  lat vs  $60,7 \pm 9,3$  lat; NS). Do badań zakwalifikowano pacjentów bezzębnych, użytkowników protez całkowitych szczęki i żuchwy, u których czas jawnej klinicznie cukrzycy wynosił ponad 5 lat. Do badań nie kwalifikowano chorych z niedokrwistością, niewydolnością nerek, zaburzeniami czynności wątroby, zaburzeniami czynności gruczołu tarczowego oraz tych, którzy w ciągu sześciu miesięcy przed wykonywanym badaniem stosowali leki z grupy antybiotyków, sterydów lub leków immunosupresyjnych. Wykluczono też chorych po przebytych incydentach sercowo-naczyniowych (zawał serca, niestabilna choroba niedokrwienności serca, udar mózgu). Informacje dotyczące przebiegu choroby, stanu zdrowia oraz wyników badań dodatkowych zaczerpnięto z historii choroby.

Pacjenci użytkowali akrylowe protezy całkowite szczęki i żuchwy przez okres nie krótszy niż jeden rok. Średni czas użytkowania protez wynosił  $5,3 \pm 2,4$  lat. Nikt z badanych nie używał środków adhezyjnych poprawiających utrzymanie

protez. Wstępne rozpoznanie stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybiczym postawiono na podstawie badania klinicznego, w oparciu o badanie podmiotowe i przedmiotowe, potwierdzone badaniem mikrobiologicznym.

Badania przeprowadzono u chorych na cukrzycę typu 2, stąd użyte w dalszym tekście określenia „cukrzyca”, które dotyczą grupy badanej, odnoszą się do cukrzycy typu 2.

### **3.1.2. Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną (II) stanowiło 50 pacjentów (29 kobiet, 21 mężczyzn), w wieku od 47 do 87 lat (średnia wieku  $\pm$  SD:  $66,9 \pm 8,8$ ), leczonych w Klinice Protetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Nie stwierdzono istotnej różnicy wieku pomiędzy kobietami i mężczyznami w badanej grupie (średnia wieku  $\pm$  SD:  $65,9 \pm 9,4$  lat vs  $68,4 \pm 7,9$  lat; NS). Przyczyny zgłoszenia chorych do Kliniki Protetyki przedstawia tabela 1.

Do grupy kontrolnej kwalifikowano pacjentów bezzębnych, z poczuciem zdrowia, ze stwierdzoną stomatopatią protetyczną. Wszyscy badani użytkowali protezy całkowite szczęki i żuchwy, przez okres nie krótszy niż jeden rok, średni czas użytkowania protez wynosił  $6,2 \pm 2,1$  lat. Nikt z badanych nie używał środków adhezyjnych poprawiających utrzymanie protez.

Średnie wieku grupy badanej i kontrolnej oraz struktury grup według płci nie różniły się istotnie statystycznie (Tabela 2).

Podział badanych chorych grupy I i II ze względu na wiek przedstawia tabela 3. Najliczniejszą grupę stanowiły osoby starsze, powyżej 60. roku życia.

**Tabela 1.** Przyczyny zgłoszenia chorych z objawami stomatopatii protetycznej do Kliniki Protetyki

| Przyczyny zgłoszenia chorych do Kliniki Protetyki | Liczba chorych (%) |
|---|--------------------|
| Dolegliwości związane z użytkowaniem protez       | 5 (10%)            |
| Naprawa protezy                                   | 9 (18%)            |
| Wymiana użytkowanych protez                       | 33 (66%)           |
| Inne  | 3 (6%)             |

Szczegółową charakterystykę kliniczną grupy badanej i grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 2.** Porównanie wybranych parametrów dotyczących wieku i płci u chorych grupy I i II

| Liczebność                                | Grupa I         | Grupa II       | p  |
|---|-----------------|----------------|----|
|   | 110             | 50             | –  |
| Wiek (lata; średnia $\pm$ SD)             | 63,2 $\pm$ 10,5 | 66,9 $\pm$ 8,8 | NS |
| Rozkład płci (stosunek kobiety/mężczyźni) | 63/47           | 29/21          | NS |
| Wiek kobiet (lata; średnia $\pm$ SD)      | 65,1 $\pm$ 11,0 | 65,9 $\pm$ 9,4 | NS |
| Wiek mężczyzn (lata; średnia $\pm$ SD)    | 60,7 $\pm$ 9,3  | 68,4 $\pm$ 7,9 | NS |

**Tabela 3.** Zestawienie liczby pacjentów w grupach według wieku

| Przedział wieku | Grupa |    |
|-----------------|-------|----|
|                 | I     | II |
| 40–49 lat       | 10    | 1  |
| 50–59 lat       | 34    | 10 |
| 60–69 lat       | 31    | 19 |
| 70–79 lat       | 33    | 16 |
| 80–89 lat       | 2     | 4  |

**Tabela 4.** Charakterystyka kliniczna i biochemiczna chorych grupy I i II, dane przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SD

| n  | Grupa I          | Grupa II        |
|--|------------------|-----------------|
|  | 110              | 50              |
| Czas trwania cukrzycy (lata)             | 10,6 $\pm$ 5,1   | –               |
| Glikemia na czczo (mmol/l)               | 9,8 $\pm$ 2,6    | 4,4 $\pm$ 0,9   |
| HbA1c (%)                                | 8,6 $\pm$ 1,9    | 3,8 $\pm$ 0,8   |
| Cholesterol całkowity (mmol/l)           | 5,9 $\pm$ 1,8    | 4,2 $\pm$ 0,8   |
| Cholesterol frakcji HDL (mmol/l)         | 1,9 $\pm$ 0,4    | 1,2 $\pm$ 0,4   |
| Cholesterol frakcji LDL (mmol/l)         | 3,3 $\pm$ 1,4    | 2,6 $\pm$ 0,5   |
| Trójglicerydy (mmol/l)                   | 2,1 $\pm$ 0,8    | 1,6 $\pm$ 0,4   |
| Wskaźnik masy ciała (kg/m <sup>2</sup> ) | 33,3 $\pm$ 5,5   | 23 $\pm$ 0,9    |
| RRsk (mmHg)                              | 139,1 $\pm$ 21,2 | 121 $\pm$ 19,2  |
| RRrozk (mmHg)                            | 81,4 $\pm$ 17,2  | 69,9 $\pm$ 15,0 |

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Badanie kliniczne

Przeprowadzono badanie kliniczne jamy ustnej. W badaniu podmiotowym uwzględniono objawy zgłaszane przez pacjenta odnośnie następujących dolegliwości ze strony błony śluzowej: pieczenie, suchość, ból oraz zaburzenia smaku. Uwzględniano również czas oraz sposób użytkowania protez (użytkowanie całodobowe – bez przerwy nocnej/z przerwą nocną).

W badaniu przedmiotowym oceniano nasilenie zmian chorobowych błony śluzowej jamy ustnej według kryteriów przyjętych w klasyfikacji Newtona (1962), która wyróżnia trzy typy zapalenia, uwzględniając charakter zmian chorobowych oraz ich rozległość (Tabela 5).

**Tabela 5.** Klasyfikacja zmian zapalnych błony śluzowej podłoża protetycznego szczęki według Newtona

| Typ stomatopatii | Charakterystyka   |
|------------------|---|
| I                | Drobne punkty zaczerwienienia zlokalizowane głównie wokół ujść podniebiennych gruczołów śluzowych lub małe plamiste rumieniowe pola na błonie śluzowej podłoża protetycznego – zapalenie o charakterze ograniczonym |
| II               | Rozlany rumień zapalny, obejmujący swym zasięgiem błonę śluzową całego podłoża protetycznego – zapalenie o charakterze uogólnionym  |
| III              | Zmiany ziarninujące zlokalizowane najczęściej w środkowej części podniebienia – zapalenie o charakterze przerostowym  |

Oceniano stan higieny użytkowanych uzupełnień protetycznych, stosując zmodyfikowany indeks płytki protez według Ambjörnsena (Ambjörnsen i wsp., 1982). Zestawiano średnie wskaźniki higieny obliczane dla pięciu pól powierzchni dośluzowej protezy całkowitej górnej. Wartość wskaźnika 0–0,5 uznano za higienę dobrą, 0,6–1,0 za higienę zadowalającą, a wartość 1,1–2,0 za higienę złą.

Oceniano również użytkowane aktualnie przez pacjenta protezy, z uwzględnieniem: szorstkości powierzchni dośluzowej płyty protezy górnej, stabilizacji protez na podłożu, okluzji i artykulacji oraz wysokości zwarcia.

### **3.2.2. Badania mikologiczne**

#### **3.2.2.1. Identyfikacja izolowanych grzybów z rodzaju *Candida***

Materiałem do badania mikologicznego był wymaz z błony śluzowej podniebienia pobierany przed spożyciem pierwszego dziennego posiłku. Przestrzegano ogólnie przyjętych w badaniu mikrobiologicznym wymogów w odniesieniu do sposobu pobierania materiału i jego transportu do pracowni mikrobiologicznej oraz zachowania środków ostrożności wymaganych w czasie pracy z materiałem potencjalnie zakaźnym (Ciuruś, 1999). Materiał do badań pobierano jałową wymazówką, dokonując stykowego obrotu na ustalonej powierzchni błony śluzowej, znajdującej się w obszarze między fałdami podniebiennymi błony śluzowej. Próbkę umieszczano w podłożu transportowym Portagerm Amies Agar (bioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, France) i przekazywano do Pracowni Bakteriologii Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wymaz posiewano na płynne podłoże Sabourauda i stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem gentamycyny i chloramfenikolu (bioMerieux SA). Identyfikację wyizolowanych szczepów grzybów przeprowadzono przy użyciu testu ID 32C (bioMerieux SA). Test ten jest wystandaryzowanym biochemicznym szeregiem identyfikacyjnym dla grzybów drożdżopodobnych.

Przygotowywano zawiesinę wyhodowanego szczepu grzybów poprzez zawieszenie ich w 2 ml 0,85% NaCl. Gęstość uzyskanej zawiesiny wynosiła 2 jednostki według skali McFarlanda. Następnie 250 µl zawiesiny przenoszono do ampułki przygotowanego fabrycznie C Medium i dokładnie mieszano. Uzyskaną mieszaninę przenoszono do wgłębień pasków testowych ID 32C tak, aby mieszanina stanowiła równy poziom z krawędzią paska. Wgłębienia pasków testowych zawierały zestaw 32 podłoży, z dodatkiem różnych węglowodanów lub związków azotowych, pozwalających na ocenę przyswajania węgla lub azotu z tych związków przez różne szczepy grzybów. Paski zamykano i inkubo-

wano przez 24–48 godzin w cieplarni w temperaturze 30°C. Po inkubacji odczytywano wyniki reakcji z poszczególnymi substratami i poddawano analizie komputerowej przy użyciu systemu ATB Reader.

Formy morfologiczne badanych izolatów oceniano również w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama.

### **3.2.2.2. Test filamentacji**

Testem filamentacji oceniano zdolność wytwarzania przez grzyby strzępek – tzw. germ tubes, charakterystycznych dla grzybów gatunku *C. albicans* (Darwazeh i wsp., 2001). 2 krople uzyskanej uprzednio zawiesiny grzybów inkubowano w 0,5 ml jałowej surowicy ludzkiej w temp. 37°C przez 3 godziny. Po inkubacji z dna próbówki pobierano kroplę osadu i oglądano ją w preparacie wilgotnym pod mikroskopem. Dodatni wynik badania ustalano w przypadku stwierdzenia krótkich, charakterystycznych wypustek, tzw. „short germ tubes”.

### **3.2.2.3. Ocena intensywności wzrostu grzybów**

Po stwierdzeniu obecności grzybów określono odsetek wyników dodatnich oraz intensywność wzrostu (IW) grzybów w hodowli, stosując następującą skalę: 1–10 kolonii grzybów, wzrost słaby – S; 10–50 kolonii, wzrost umiarkowany – U; 50–100 kolonii, wzrost obfity – O; > 100 kolonii, wzrost zlewny – Z. Oceniono także formę morfologiczną grzybów, przy ocenie wzięto pod uwagę komórki pączkujące i wegetatywne – forma morfologiczna Y (*yeasts*) oraz strzępki i pseudostrzępki – forma morfologiczna M (*mycelium*) (Dynowska i wsp., 2004).

### **3.2.2.4. Ocena wrażliwości grzybów na leki przeciwgrzybicze *in vitro***

Wrażliwość grzybów na antymikotyki oznaczono za pomocą testu ATB Fungus (bioMerieux SA). Procedura wykonywania oznaczeń była zgodna z zaleceniami producenta. W badaniach uwzględniano następujące leki przeciwgrzybicze: amfoterycyna B: 1–8 mg/l, nystatyna: 4–8 mg/l, flucytozyna:

0,25–128 mg/l, mikonazol: 1–8 mg/l, ekonazol: 1–8 mg/l i ketokonazol: 1–8 mg/l. Zawiesinę komórek grzybów o zmętnieniu 2 w skali McFarlanda przygotowano z hodowli na podłożu Sabourauda. 100  $\mu$ l przygotowanej zawiesiny umieszczano w ampułce zawierającej podłoże ATB-F. Nanoszono po 135  $\mu$ l zawiesiny komórek grzybów z ampułki ATB-F do zagłębień pasków testowych, gdzie znajdowały się poszczególne leki przeciwgrzybicze. Przeprowadzono inkubację (24–48 godz.) w temp. 30°C. Wyniki testu odczytywano automatycznie za pomocą czytnika ATB firmy bioMerieux i kwalifikowano badane grzyby jako wrażliwe, średniowrażliwe lub odporne.

### ***3.2.3. Ocena parametrów wyrównania glikemii oraz stężenia białka C-reaktywnego***

U chorych na cukrzycę typu 2 oznaczano stężenie glukozy w osoczu krwi żyłnej na czczo metodą standardową oraz odsetek HbA1c, stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). HbA1c odzwierciedla średnie stężenie glukozy we krwi w okresie 2–3 miesięcy poprzedzających oznaczenie i jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem długoterminowej kontroli glikemii u chorych na cukrzycę. Przyjmując zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (2011), odsetek HbA1c  $\leq$  7% uznano jako kryterium dobrego wyrównania glikemii u badanych chorych na cukrzycę typu 2.

Oznaczono poziom białka C-reaktywnego w surowicy krwi za pomocą wysocze czułej metody immunoturbidymetrycznej firmy Olympus, z użyciem przeciwciał opłaszczonych na lateksie skierowanych przeciwko ludzkiemu CRP. Czułość testu wynosiła 0,05 mg/l.

### ***3.2.4. Badania doświadczalne nad biofilmem Candida***

Z punktu widzenia zjawiska narastającej lekooporności drobnoustrojów na leki stosowane w terapii stomatopatii powikłanej zakażeniem grzybiczym, istotna jest ocena wrażliwości komórek biofilmu wobec stosowanych antymiko-



tyków. Zastosowano model badawczy do pracy nad biofilmem *Candida* w warunkach *in vitro*, wykorzystując fakt, iż kontakt komórek grzyba z powierzchnią biomateriału indukuje morfogenezę i dalsze powstawanie dojrzalego biofilmu. Badania doświadczalne nad biofilmem *Candida* wykonano w Department of Biomedical Sciences, School of Dentistry, University of the Pacific, San Francisco, USA. W analizie wykorzystano metodę kolorymetryczną, określającą aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy, enzymu będącego wskaźnikiem aktywności metabolicznej komórek grzybów. W metodzie tej aktywność metaboliczna oceniana jest na podstawie redukcji związku tetrazolowego XTT [2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo)-2H-tetrazolium-5-carboksyanilidu] do rozpuszczalnego w wodzie brązowego formazanu. Ilość wytworzonego produktu mierzy się spektrofotometrycznie. Zmiana barwy podczas reakcji jest wskaźnikiem aktywności metabolicznej komórek grzybów i odpowiada liczbie żywych komórek w strukturze biofilmu (Chandra i wsp., 2001b).

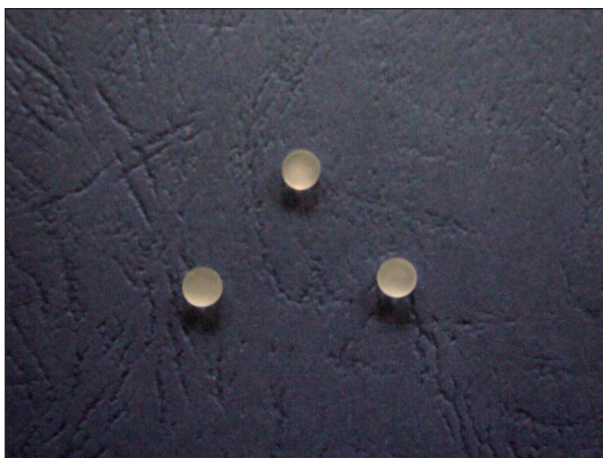
W badaniach wykorzystano szczepy grzybów kolekcji American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC): *C. albicans* MYA-2732 oraz *C. glabrata* MYA-275. Zbadano również następujące szczepy grzybów izolowane z ontocenozy jamy ustnej od chorych ze stomatopatią protetyczną: *C. albicans* 6122/06, *C. glabrata* 7531/06, *C. tropicalis* 8122/06 oraz *C. parapsilosis* 11375/07. Materiałem wyjściowym była 24 godzinna hodowla grzybów w temp. 37°C na podłożu Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco, Detroit, MI, USA) suplementowanym 100 mM glukozą. Komórki grzybów zawieszano w 5 ml PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,2), dwukrotnie płukano i wirowano przez 5 minut. Komórki grzybów liczone w hemocytometrze Bürkera i zawieszano w stężeniu  $1 \times 10^7$  komórek /1 ml podłoża YNB suplementowanego 100 mM glukozą. Zawiesinę grzybów w ilości 1 ml nanoszono na powierzchnię dysków wykonanych z polimetakrylanu metylu (PMMA, *polymethylmethacrylate*) (dysk o paramterach: 5 mm średnicy x 1,5 mm grubości) otrzymanych z Hing Lung Engineering Inc. (Hong Kong, China), umieszczonych w jałowych 48-dołkowych polistyrenowych płytkach titracyjnych (jeden dysk znajdował się w jednym dołku) (ryciny 1 i 2). Płytki titracyjne inkubowano przez 90 min. w 37°C (faza adhezji). Po zakończeniu inkubacji, zawiesinę inkubacyjną dwukrotnie płukano 1 ml PBS w celu usunięcia grzybów, które nie uległy adhezji. Dyski umieszczano w dołkach 96-dołkowych jałowych polistyrenowych płytek titracyjnych w 250

$\mu\text{l}$  podłoża YNB suplementowanego 100 mM glukozą. Płytki inkubowano przez 48 godzin w  $37^{\circ}\text{C}$  na wytrząsarce płytek titracyjnych (faza tworzenia biofilmu).

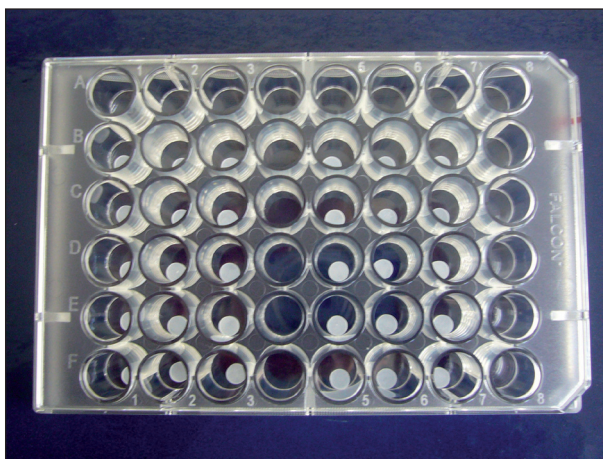
Oceniono wpływ działania azotanu mikonazolu (Sigma-Aldrich, Switzerland) na aktywność metaboliczną badanych szczepów grzybów w strukturze biofilmu. Jako rozpuszczalnika leku użyto jałowego dimetylosulfotlenku (DMSO). Dojrzały 48 godzinny biofilm *Candida* inkubowano z różnymi stężeniami leku w zakresie od  $0,5 \mu\text{g/ml}$  -  $96 \mu\text{g/ml}$  przez 48 godz. w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  (Chandra i wsp., 2001b). Dokonywano odczytu aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu za pomocą metody kolorymetrycznej XTT (Chandra i wsp., 2001b, Kuhn i wsp., 2002a). Zmianę barwy podczas reakcji, będącą wskaźnikiem aktywności metabolicznej komórek grzybów i odpowiadającą wprost proporcjonalnie liczbie żywych komórek w strukturze biofilmu mierzono czytnikiem płytek mikrotitracyjnych (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), przy długości fali 490 nm (rycina 3). Określano redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu i porównywano z analogiczną wartością oznaczaną dla próby kontrolnej bez obecności leku. Oceniano wartość stężenia leku, która powodowała w 50% redukcję aktywności metabolicznej komórek biofilmu (50% RMA, 50% *reduction in metabolic activity*). Oznaczenia wykonywano dwukrotnie w trzech powtórzeniach.

Badania aktywności fungistatycznej mikonazolu przeprowadzono metodą oznaczania wartości najmniejszego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC, *minimal inhibitory concentration*) dla komórek planktoidalnych badanych szczepów grzybów. Oznaczenia wykonano metodą seryjnych rozcieńczeń według CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), dokument M27-A3, w płynnym podłożu Sabourauda (bioMerieux SA), z użyciem jałowych polistyrenowych 96-dołkowych płytek titracyjnych. Przygotowywano zawiesinę szczepów grzybów w stężeniu  $0,5\text{--}2,5 \times 10^3$  komórek grzybów/ml w jałowym fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Macierzysty roztwór leku przygotowano w jałowym DMSO. Wykonano szereg seryjnych rozcieńczeń macierzystego roztworu leku przeciwgrzybiczego w płynnym podłożu Sabourauda w zakresie stężeń  $0,016 \mu\text{g/ml}$  -  $32 \mu\text{g/ml}$ . Do każdego dołka dodawano po  $100 \mu\text{l}$  badanego stężenia preparatu oraz po  $100 \mu\text{l}$  zawiesiny grzybów. Płytki inkubowano w temp.  $35^{\circ}\text{C}$  przez 24-72 godzin. Za wartości MIC uznano najniższe stężenie,

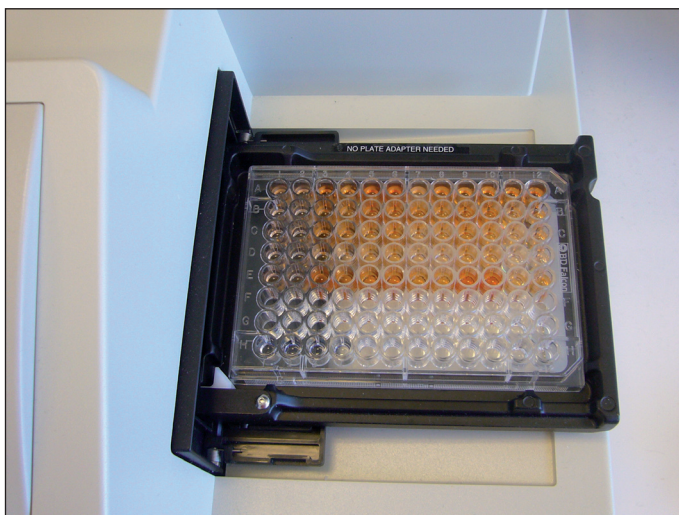
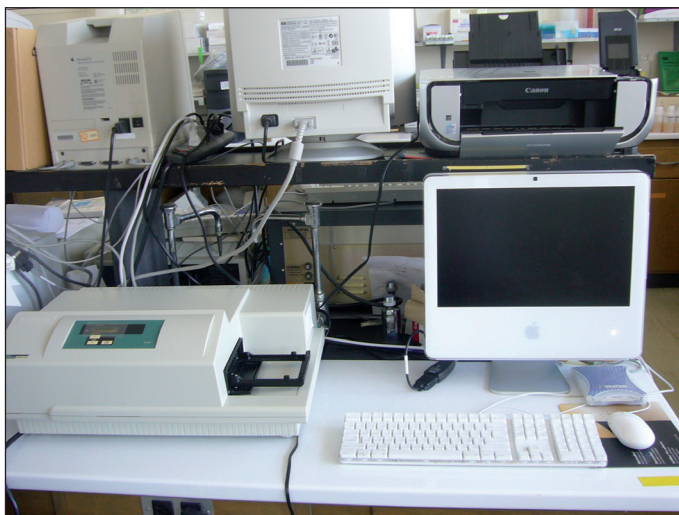
przy którym nie obserwowano wzrostu grzybów. Każdorazowo przeprowadzano kontrole wzrostu szczepów w podłożu Sabourauda bez dodatku leku. Dla każdego szczepu wartość MIC oznaczono w trzykrotnych powtórzeniach.



**Rycina 1.** Dyski akrylowe wykonane z polimetakrylanu metylu, o parametrach 5 mm x 0,5 mm (Hing Lung Engineering Inc., Hong Kong, China) wykorzystywane do wytwarzania struktury biofilmu.



**Rycina 2.** Płytką titracyjną 48 dołkową z umieszczonymi dyskami akrylowymi.



Rycina 3. Czytnik płytek mikrotitracyjnych (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) wykorzystywany do odczytu aktywności metabolicznej komórek grzybów.

### **3.2.5. Analiza statystyczna**

Normalność rozkładu danych oceniano testem Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładu normalnego dla oceny różnic w zakresie badanych parametrów pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 a chorymi grupy kontrolnej zastosowano test t-Studenta. Przy braku normalności rozkładu danych używano nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a.

Do oceny współzależności dwóch cech ilościowych użyto współczynnika korelacji rang Spearmana ( $r_s$ ), a zależności pomiędzy tymi cechami a cechami jakościowymi weryfikowano nieparametrycznym testem Manna-Whitney'a lub Kruskala-Wallisa.

Do weryfikacji różnicy częstości pomiędzy dwiema grupami użyty został test dla różnicy między dwoma wskaźnikami struktury.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe (SD). Wyniki uznawano za istotne statystycznie w przypadku, gdy poziom istotności  $p < 0,05$ . Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica PL 8.0 firmy Statsoft.



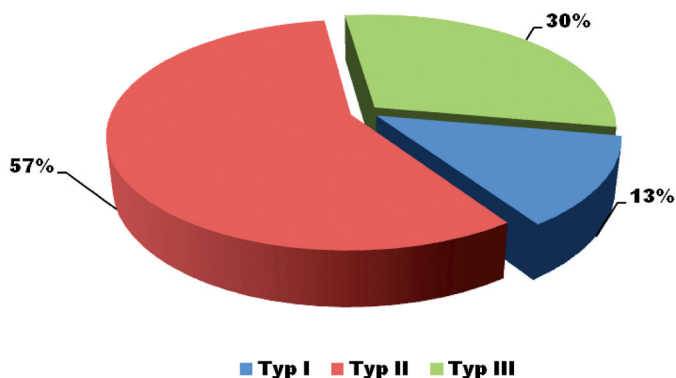
## 4. Wyniki

### 4.1. Wyniki badań klinicznych

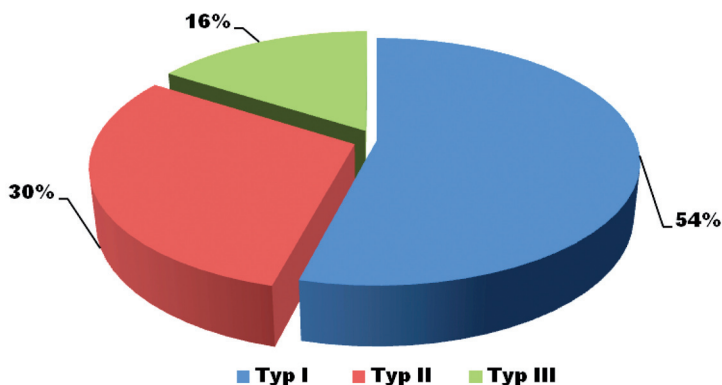
Przedstawione wyniki badań klinicznych zawierają dane odnoszące się do stanu błony śluzowej jamy ustnej oraz użytkowanych uzupełnień protetycznych.

#### 4.1.1. Objawy podmiotowe i stan kliniczny błony śluzowej jamy ustnej

W grupie I (osoby z cukrzycą typu 2) najczęściej obserwowano typ II stomatopatii protetycznej (rozlany stan zapalny), ( $n = 63$ , 57,3%), u chorych grupy II (osoby bez cukrzycy) typ I (ograniczony stan zapalny) stanowił najczęstszy typ schorzenia ( $n = 27$ , 54%). Częstość występowania poszczególnych typów stomatopatii w obu badanych grupach przedstawiono na rycinie 4 i 5. Znacząco więcej przypadków stomatopatii typu II stwierdzono wśród chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą chorych bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (57,3% vs 30%;  $p < 0,002$ ). Stomatopatie typu I występowały znacząco częściej u chorych grupy kontrolnej (54% vs 30%;  $p < 0,004$ ), nie obserwowawa-



Rycina 4. Występowanie różnych typów stomatopatii protetycznej według klasyfikacji Newtona u chorych na cukrzycę typu 2.

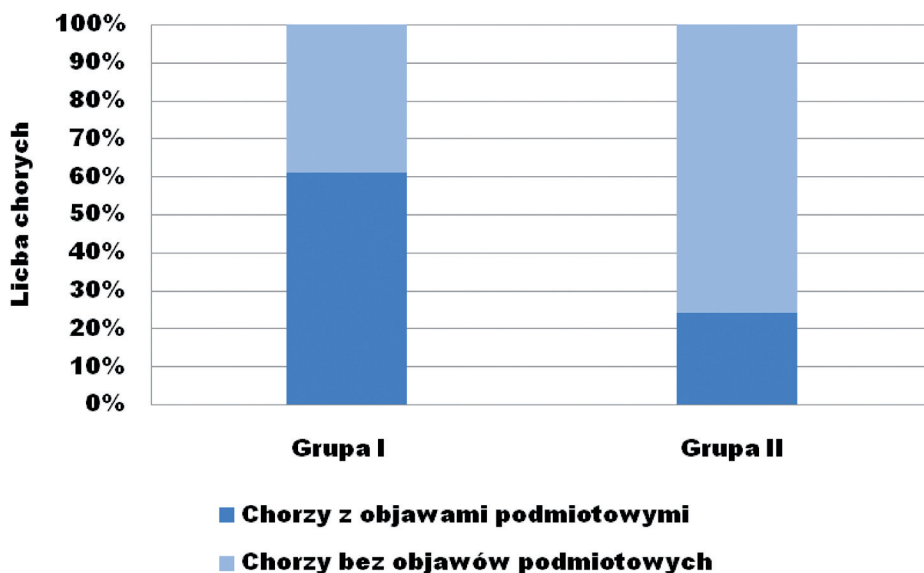


**Rycina 5.** Występowanie różnych typów stomatopatii protetycznej według klasyfikacji Newtona u chorych grupy kontrolnej.

no istotnej różnicy w częstości występowania stomatopatii typu III (zapalenie przerostowe) w obu badanych grupach (12,7% vs 16%; NS. Wszystkie obserwowane przypadki stomatopatii protetycznej u badanych chorych występowały w obrębie błony śluzowej szczęki.

Występowaniu opisanych typów stomatopatii towarzyszyły następujące objawy subiektywne zgłaszane przez pacjenta: pieczenie błony śluzowej jamy ustnej, suchość błony śluzowej, ból oraz zaburzenia smaku. U badanych stwierdzono ponadto obecność objawów towarzyszących stomatopatiom, takich jak: zapalenie kątów ust, zapalenie języka oraz owrzodzenie odleżynowe, zlokalizowane w obrębie błony śluzowej podłoża protetycznego. Stwierdzono znacząco częstsze wyępowanie objawów podmiotowych stomatopatii u chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą pacjentów bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (60,9% vs 24%;  $p < 0,001$ ) (Rycina 6).

Najczęściej zgłaszanym objawem podmiotowym u chorych w obu badanych grupach było pieczenie błony śluzowej jamy ustnej, przy czym objaw ten występował znacząco częściej u chorych na cukrzycę (51,8% vs 24%;  $p < 0,002$ ). W grupie badanej stwierdzono również znacząco więcej przypadków stomatopatii z objawem suchości błony śluzowej jamy ustnej w porównaniu z grupą kontrolną (50,9% vs 6%;  $p < 0,001$ ). Nie stwierdzono istotnej różnicy w częstości występowania samoistnego bólu (4,5% vs 4%; NS) oraz zaburzeń smaku w obu badanych grupach (5,5% vs 6%; NS).

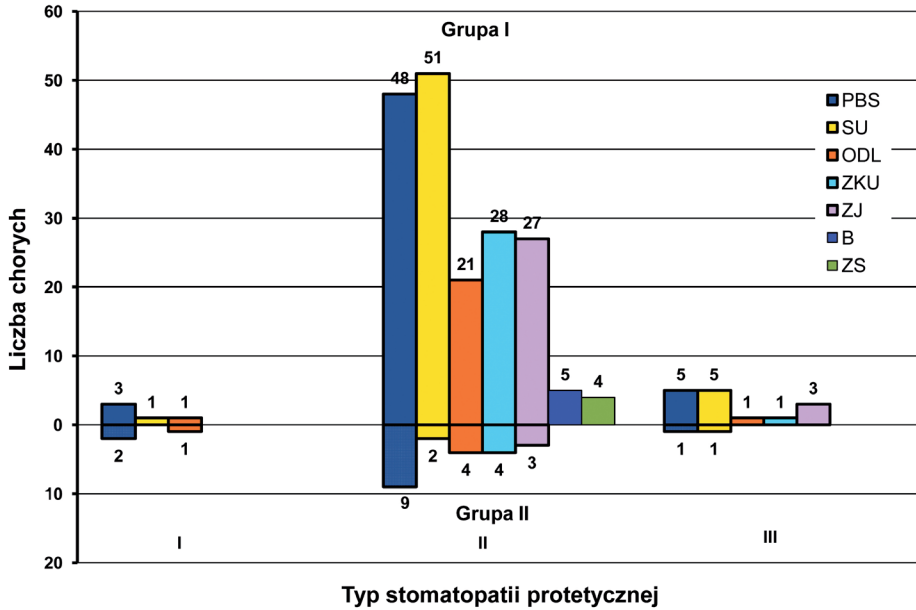


Rycina 6. Częstość występowania objawów podmiotowych i towarzyszących stomatopatiom protetycznym u chorych grupy I i II.

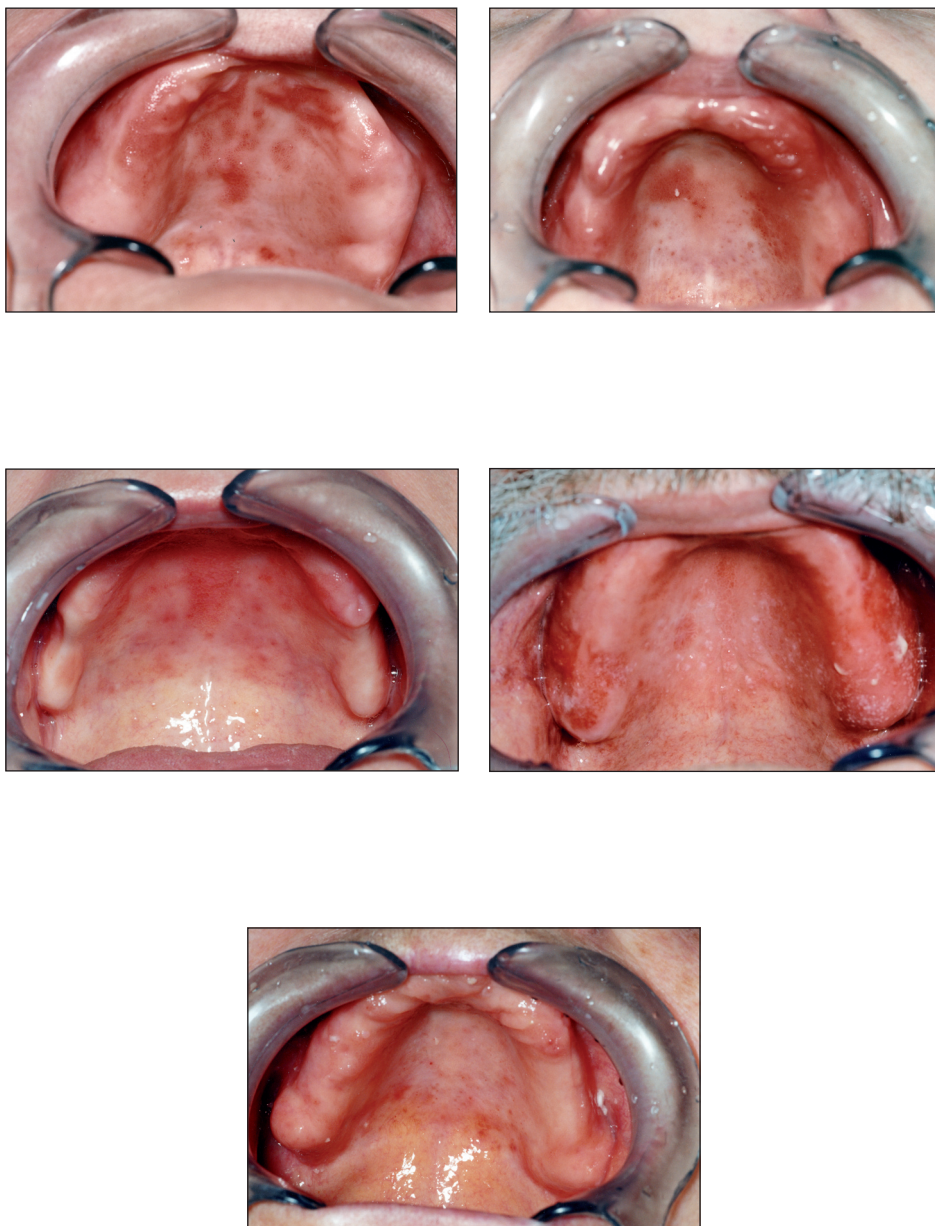
Ponadto na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż u chorych grupy I znacząco częściej obserwuje się występowanie objawów towarzyszących stomatopatii: zapalenie kątów ust (26,4% vs 8%;  $p < 0,01$ ), zapalenie języka (27,3% vs 6%;  $p < 0,003$ ). Nie stwierdzono istotnej różnicy w częstości występowania owrzodzenia odleżynowego w obu grupach (20,9% vs 10%; NS). Porównawcze zestawienie częstości występowania poszczególnych objawów podmiotowych oraz objawów towarzyszących stomatopatiom w obu badanych grupach przedstawia rycina 7.

Wybrane przykłady stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* u badanych chorych przedstawiono na rycinach 8, 9 i 10. Rycina 11 przedstawia współistniejące objawy towarzyszące stomatopatii protetycznej w postaci zapalenia kątów ust i zapalenia języka u chorej na cukrzycę typu 2.

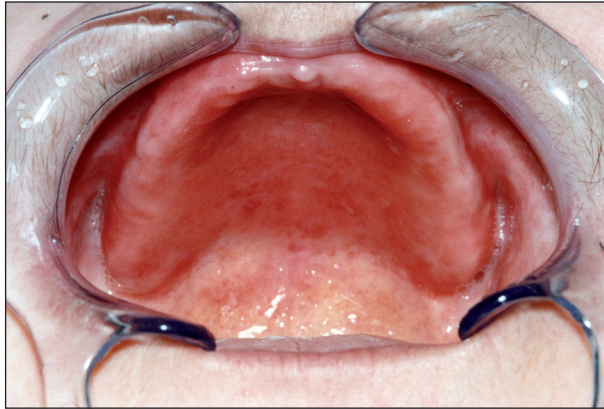




Rycina 7. Objawy podmiotowe i towarzyszące różnym typom stomatopatii protetycznej u chorych grupy I i II (PBS – pieczenie błony śluzowej, SU – suchość, ODL – owrzodzenie odleżynowe, ZKU – zapalenie kątów ust, ZJ – zapalenie języka, B – ból, ZS – zaburzenia smaku).



**Rycina 8.** Obraz kliniczny stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* u chorych na cukrzycę typu 2 – typ I (klasyfikacja Newtona).



**Rycina 9.** Obraz kliniczny stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* u chorej na cukrzycę typu 2 – typ II (klasyfikacja Newtona).



**Rycina 10.** Obraz kliniczny stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* u chorych na cukrzycę typu 2 – typ III (klasyfikacja Newtona).



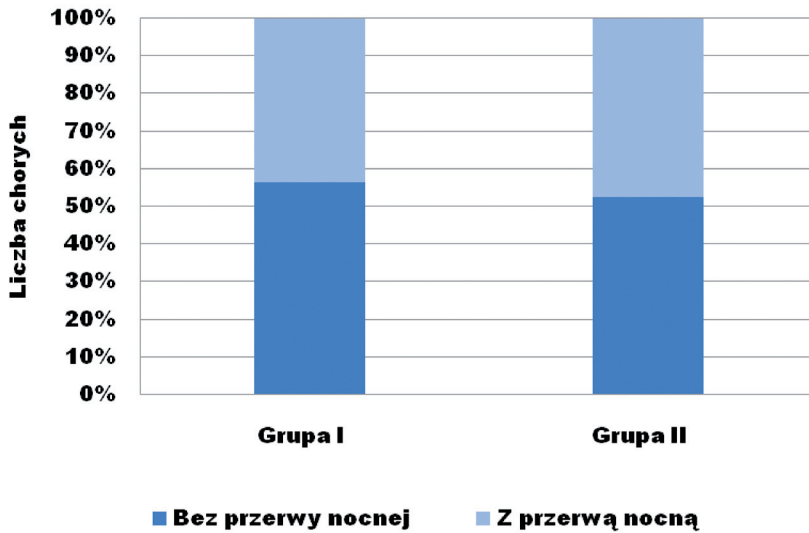


**Rycina 11.** Zapalenie kątów ust i języka jako objawy towarzyszące stomatopatii protetycznej typu II, powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* u chorej na cukrzycę typu 2.

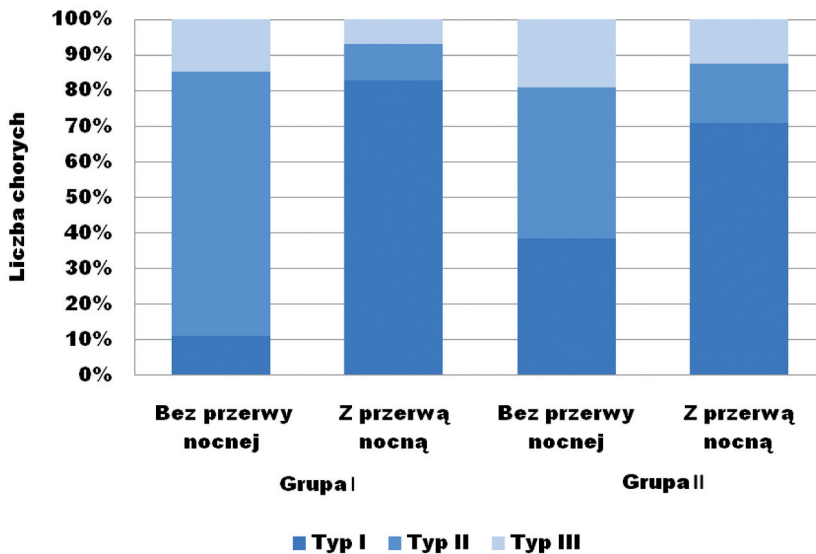
#### **4.1.2. Czas i sposób użytkowania uzupełnień protetycznych**

Czasokres użytkowania protez u chorych grupy I wynosił od 2 do 15 lat (średnia 5,3; SD  $\pm$  2,4), u chorych grupy II od 2 do 14 lat (średnia 6,2; SD  $\pm$  2,1). W grupie chorych na cukrzycę 62 (56,4%) badanych użytkowało uzupełnienia protetyczne całą dobę (bez przerwy nocnej), a 48 (43,6%) chorych stosowało w użytkowaniu protez przerwę nocną. W grupie kontrolnej 21 (52,5%) badanych użytkowało protezy bez przerwy nocnej, zaś 29 (47,5%) badanych stosowało w użytkowaniu protez przerwę nocną (Rycina 12). Nie stwierdzono znaczącej różnicy w sposobie użytkowania protez pomiędzy chorymi grupy I i II ( $p > 0,05$ ).

Uznając całodobowe użytkowanie protez za czynnik sprzyjający powstawaniu stomatopatii protetycznej, oceniono występowanie typów stomatopatii oraz objawów tego schorzenia u chorych użytkujących uzupełnienia protetyczne bez przerwy nocnej. Zarówno w grupie I jak i II najczęściej obserwowano stomatopatię typu II, którą stwierdzono odpowiednio u 60 (74,1%) i 11 (42,3%) chorych użytkujących protezy całodobowo. Stomatopatię typu III stwierdzono u 12 (14,8%) chorych grupy I oraz u 5 (19,2%) pacjentów grupy II. Typ I stomatopatii obserwowano u 9 (11,1%) chorych na cukrzycę i u 10 (38,5%) chorych grupy kontrolnej (Rycina 13).

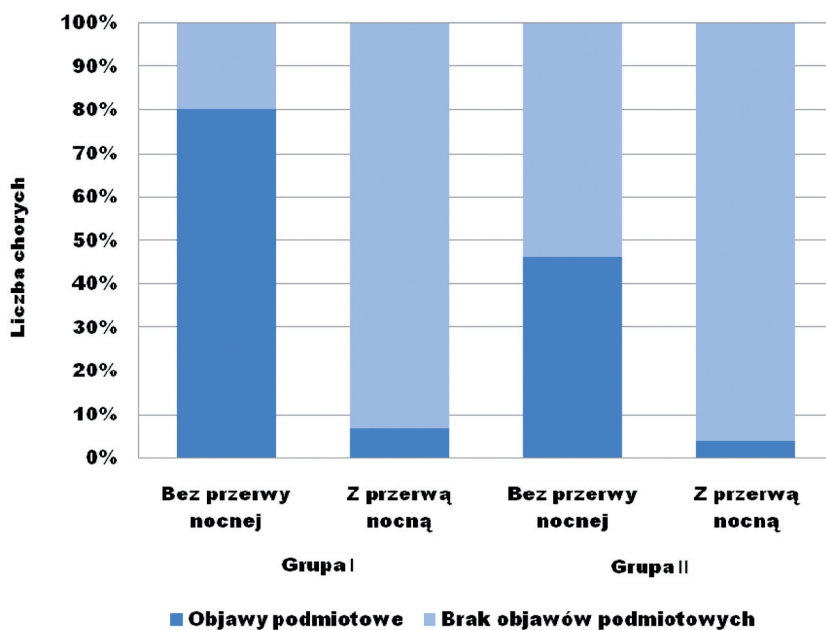


Rycina 12. Użytkowanie uzupełnień protetycznych w ciągu doby przez chorych grupy I i II.



Rycina 13. Występowanie różnych typów stomatopatii protetycznej w zależności od sposobu użytkowania protez w ciągu doby u chorych grupy I i II.

U pacjentów z cukrzycą w podgrupie chorych użytkujących protezy bez przerwy nocnej stwierdzono występowanie objawów podmiotowych stomatopatii u 65 (80,2%) chorych, w podgrupie pacjentów użytkujących protezy z przerwą nocną objawy podmiotowe występowały tylko u 2 (6,9%) badanych; różnica istotna statystycznie ( $p < 0,001$ ). Podobnie w grupie II, objawy podmiotowe występowały znacząco częściej u chorych użytkujących uzupełnienia protetyczne bez przerwy nocnej, w porównaniu z podgrupą chorych stosujących przerwę nocną w użytkowaniu protez – 12 (46,2%) vs 1 (4,2%);  $p < 0,001$  (Rycina 14).



Rycina 14. Występowanie objawów podmiotowych stomatopatii protetycznej w zależności od sposobu użytkowania protez w ciągu doby u chorych grupy I i II.

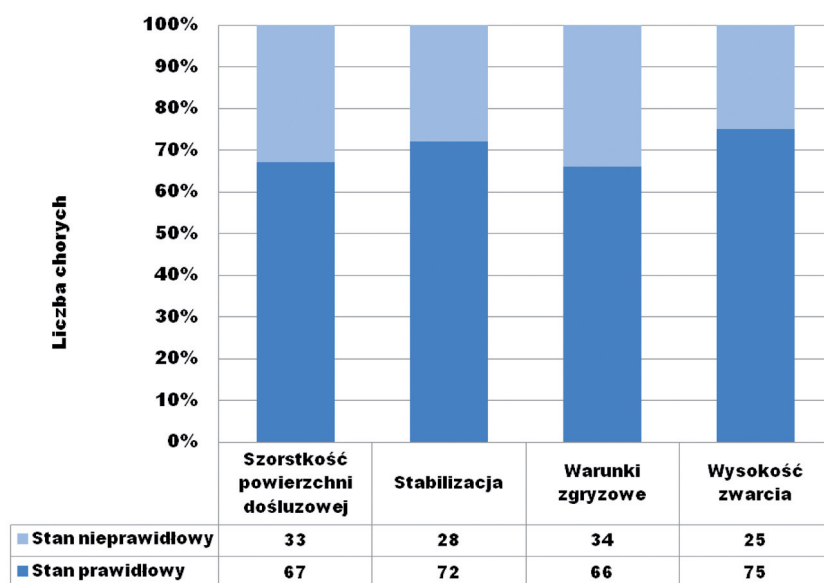
#### 4.1.3. Ocena użytkowanych uzupełnień protetycznych

Oceniając poprawność wykonania użytkowanych przez pacjenta protez oraz ich sprawność funkcjonalną, uwzględniono: stan powierzchni dośluzowej płyty protezy, stabilność protez na podłożu, warunki zgryzowe oraz wysokość zwarcia (Tabela 5).

**Tabela 5.** Ocena użytkowanych uzupełnień protetycznych z uwzględnieniem odchyień od stanu prawidłowego u chorych grupy I i II

|   | Grupa I  | Grupa II | p  |
|---|----------|----------|----|
| Szorstkość powierzchni dośluzowej płyty protezy | 33% (37) | 30% (15) | NS |
| Nieprawidłowa stabilizacja                      | 28% (31) | 32% (16) | NS |
| Nieprawidłowe warunki zgryzowe                  | 34% (38) | 38% (19) | NS |
| Zaburzona wysokość zwarcia                      | 25% (28) | 24% (12) | NS |

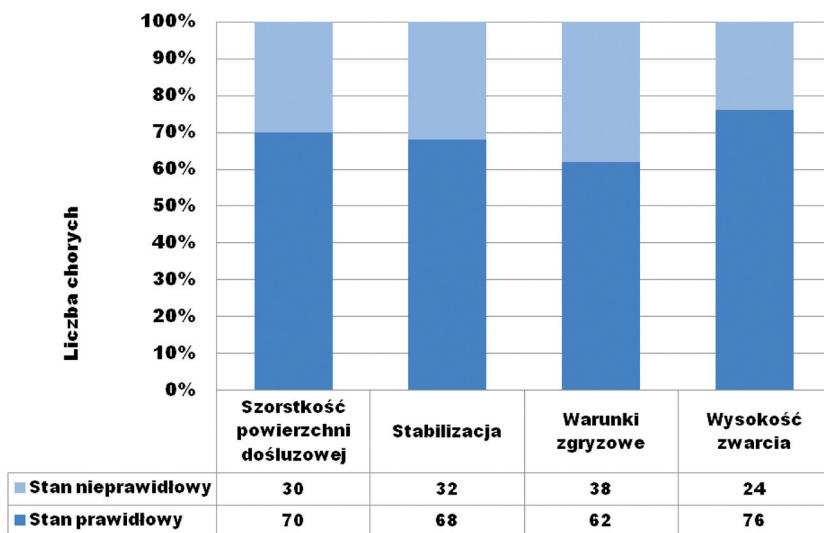
U chorych grupy I wykazano następujące odchylenia: szorstka powierzchnia dośluzowa płyty protezy występowała u 37 (33%) chorych, zła stabilizacja u 31 (28%) chorych, nieprawidłowe warunki zgryzowe u 38 (34%) chorych oraz zaburzona wysokość zwarcia u 28 (25%) chorych (Rycina 15).



Rycina 15. Ocena protez zębowych u chorych grupy I.

U chorych grupy II szorstkość powierzchni dośluzówkowej płyty protezy obserwowano u 15 (30%) chorych, złą stabilizację u 16 (32%) chorych, nieprawidłowe warunki zgryzowe u 19 (38%) oraz zaburzoną wysokość zwarcia u 12 (24%) chorych (Rycina 16).





Rycina 16. Ocena protez zębowych u chorych grupy II.

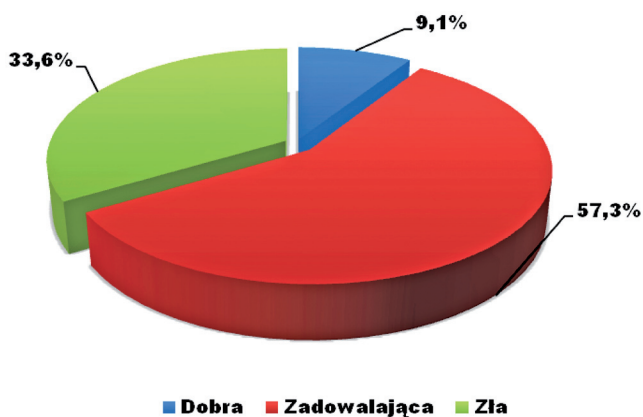
Na podstawie danych zestawionych w tabeli 5 stwierdzono, że poszczególne parametry nie różniły się w obu grupach w sposób statystycznie istotny, zatem badania nad udziałem infekcji grzybiczej mogą być przedmiotem porównań w obu grupach.

#### 4.1.4. Ocena higieny użytkowanych uzupełnień protetycznych

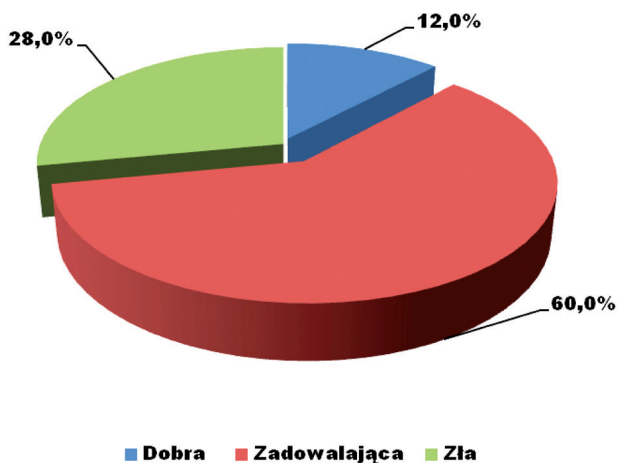
Największe nagromadzenie płytki protez obserwowano na dośluzowej powierzchni płyty protezy całkowitej górnej. W grupie I higienę dobrą stwierdzano u 10 (9,1%) chorych, zadowolającą u 63 (57,3%) i u 37 (33,6%) higienę złą (Rycina 17).

W grupie II higienę jako dobrą oceniono u 6 (12%) badanych, zadowolającą u 30 (60%) oraz higienę złą u 14 (28%) badanych (Rycina 18).

U chorych grupy I, z dobrą higieną użytkowanych protez, typ I stomatopatii występował u 5 (50%) chorych, typ III również u 5 (50%) badanych, nie obserwowano w tej podgrupie stomatopatii typu II. W przypadku chorych ze złą higieną protez, u 36 (97,3%) chorych stwierdzono stomatopatię typu II, u 1 pacjenta (2,7%) obserwowano typ III schorzenia, nie stwierdzono występowania stomatopatii typu I (Rycina 19).

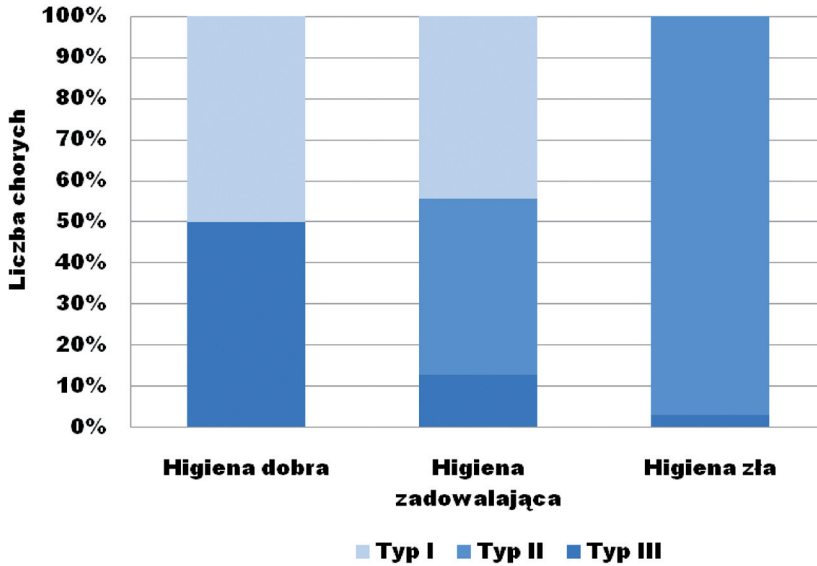


Rycina 17. Higiena użytkowanych protez u chorych grupy I.

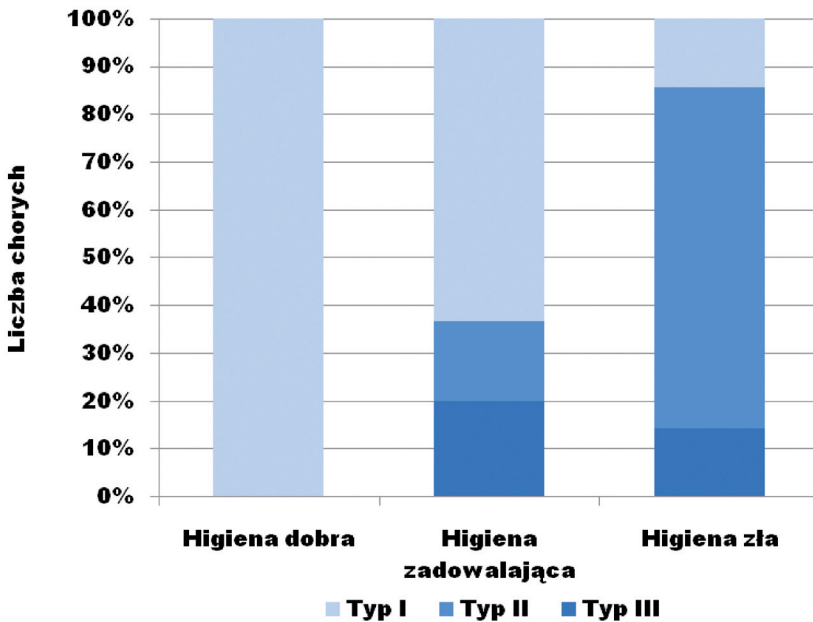


Rycina 18. Higiena użytkowanych protez u chorych grupy II.

U chorych grupy II, u wszystkich badanych z dobrą higieną protez występował typ I stomatopatii. U chorych ze złą higieną użytkowanych protez, typ II stomatopatii występował najczęściej u 10 (71,4%), typ I obserwowano u 2 (14%) badanych, u dalszych 2 (14%) chorych stwierdzono typ III stomatopatii (Rycina 20).



Rycina 19. Występowanie różnych typów stomatopatii protetycznych w zależności od stanu higieny protez u chorych grupy I.



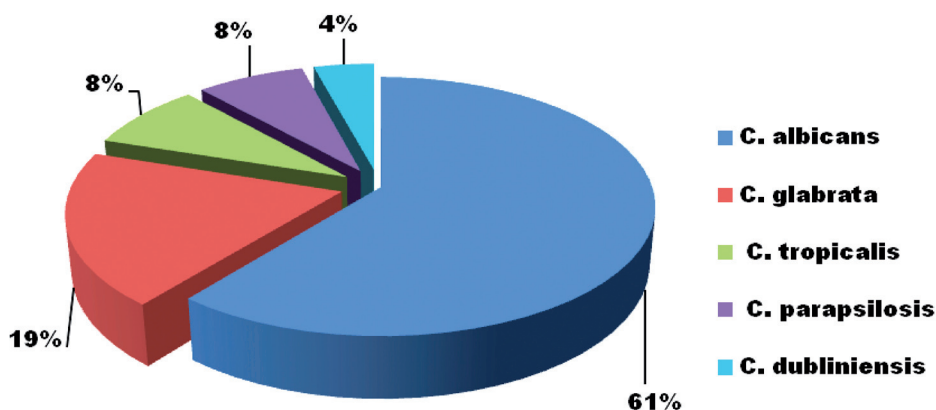
Rycina 20. Występowanie różnych typów stomatopatii protetycznych w zależności od stanu higieny protez u chorych grupy II.

## 4.2. Wyniki badań mikologicznych

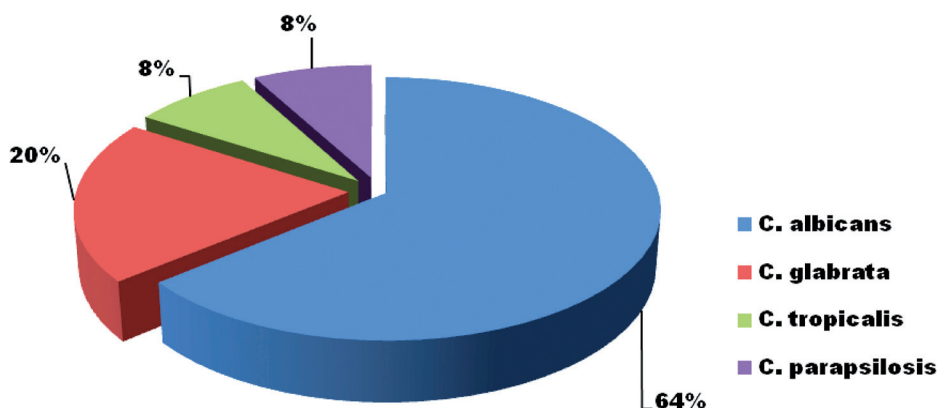
### 4.2.1. Identyfikacja izolowanych grzybów z rodzaju *Candida*

Zakażenie grzybicze występowało znamienne częściej w przebiegu stomatopatii protetycznej u chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą kontrolną (n = 110; 100% vs n = 25; 50%; p < 0,001). Określono rodzaje i gatunki szczepów grzybów wyhodowanych z błony śluzowej podłoża protetycznego. U chorych grupy I wyizolowano łącznie 120 szczepów grzybów drożdżopodobnych. Stwierdzono występowanie następujących gatunków grzybów: dominowały drobnoustroje gatunku *C. albicans* (n = 73; 60,8%) oraz *C. glabrata* (n = 23; 19,2%). Grzyby gatunku *C. tropicalis* oraz z *C. parapsilosis* stanowiły odpowiednio n = 10; 8,3% oraz n = 9; 7,5% izolatów. W pojedynczych przypadkach izolowano grzyby gatunku *C. dubliniensis* (n = 5; 4,2%). Stwierdzono, iż wszystkie badane izolaty gatunku *C. albicans* (n=73; 100%) wykazywały dodatni wynik testu filamentacji, obserwując w preparacie mikroskopowym występowanie formujących się strzępek grzybów. Częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów w ontocenozie jamy ustnej chorych grupy I przedstawiono na rycinie 21.

U chorych grupy kontrolnej izolowano łącznie 25 szczepów grzybów rodzaju *Candida*. Najczęściej izolowano również grzyby gatunku *C. albicans* (n = 16; 64%) oraz *C. glabrata* (n = 5; 20%). Pozostałe izolaty zidentyfikowano jako *C. tropicalis* (n = 2; 8%), i *C. parapsilosis* (n = 2; 8%) (Rycina 22). Wśród grzybów



Rycina 21. Gatunki grzybów z rodzaju *Candida* izolowane z błony śluzowej jamy ustnej u chorych grupy I.



Rycina 22. Gatunki grzybów z rodzaju *Candida* izolowane z błony śluzowej jamy ustnej u chorych grupy II.

gatunku *C. albicans*, 16 szczepów (100%) w badaniu mikroskopowym wykazywało dodatni wynik testu filamentacji.

Przykład hodowli grzybów gatunku *C. albicans* na agarze Sabourauda przedstawiają ryciny 23 i 24.

W preparatach bezpośrednich na podstawie badania mikroskopowego stwierdzono obecność dwóch form morfologicznych grzybów gatunku *C. albicans*: formy blastosporowej (Y) oraz formy mycelialnej (M). U chorych grupy I w 19 (26,1%) przypadkach stwierdzono występowanie wyłącznie formy Y, u pozostałych 54 (73,9%) chorych obserwowano współwystępowanie formy M.



Rycina 23. Kolonie grzybów gatunku *C. albicans* na agarze Sabourauda.



Rycina 24. Powiększenie kolonii grzybów gatunku *C. albicans* na agarze Sabourauda.

W grupie kontrolnej, w przypadku 9 (56,3%) badanych izolatów *C. albicans*, stwierdzono występowanie wyłącznie formy Y, a w przypadku 7 (43,7%) szczepów obserwowano występowanie również formy M. Stwierdzono znacząco częstsze występowanie formy M w przypadkach stomatopatii protetycznych u chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą kontrolną,  $p < 0,001$ .

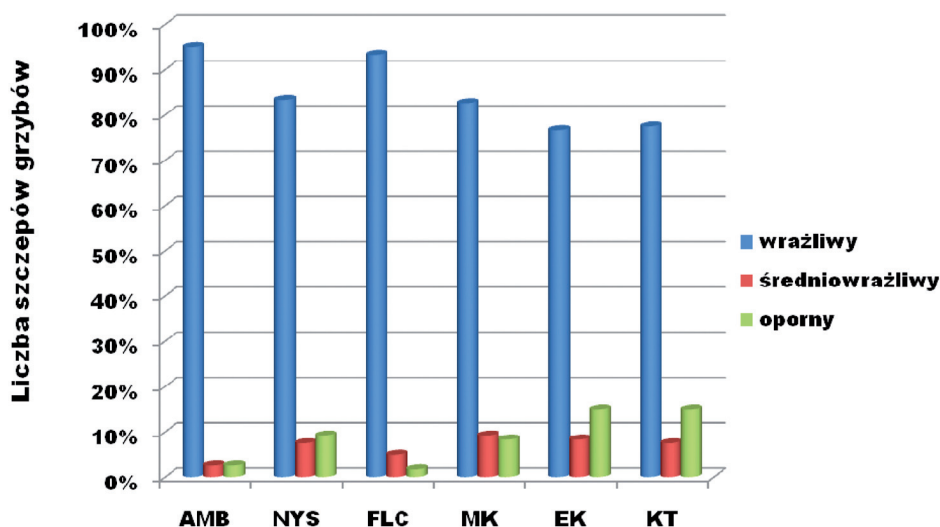
Oceniając intensywność wzrostu grzybów u chorych grupy I najczęściej obserwowano wzrost o charakterze obfitym oraz umiarkowanym, odpowiednio u 53 (48,2%) i 25 (22,7%) chorych. W grupie II obserwowano najczęściej wzrost umiarkowany i obfity, odpowiednio u 15 (60%) oraz 5 (20%) chorych (Tabela 6).

**Tabela 6.** Intensywność wzrostu grzybów z rodzaju *Candida* u chorych grupy I i II

| Intensywność wzrostu grzybów | Grupa I    | Grupa II   | p       |
|------------------------------|------------|------------|---------|
| Wzrost słaby                 | 12 (10,9%) | 4 (16,0%)  | NS      |
| Wzrost umiarkowany           | 25 (22,7%) | 15 (60,0%) | < 0,001 |
| Wzrost obfity                | 53 (48,2%) | 5 (20,0%)  | NS      |
| Wzrost zlewny                | 20 (18,2%) | 1 (4,0%)   | NS      |

#### 4.2.2. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *in vitro*

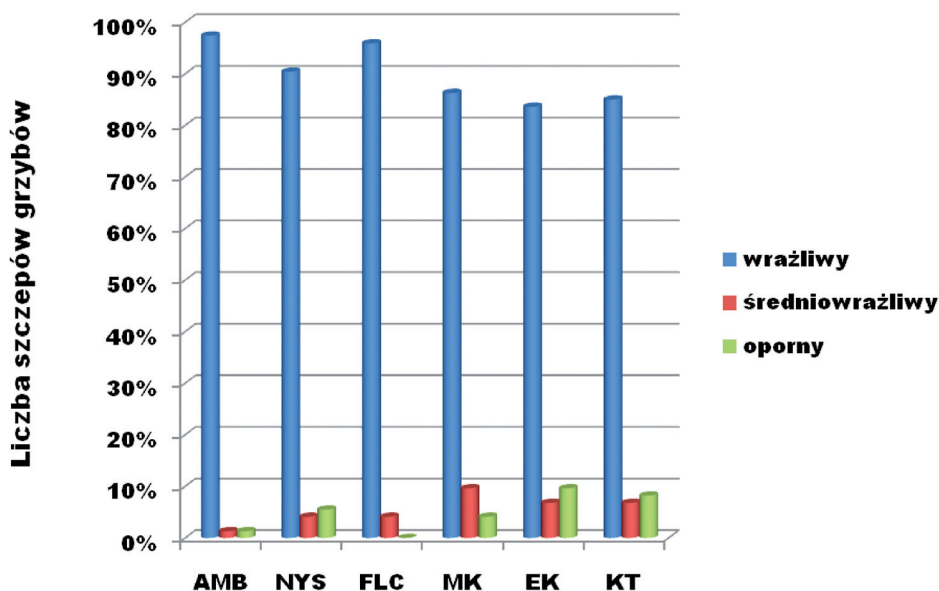
Przeprowadzono ocenę lekowrażliwości izolowanych grzybów rodzaju *Candida* w odniesieniu do 5 leków przeciwgrzybiczych: amfoterycyny B, nystatyny, flucytozyny, mikonazolu, ekonazolu i ketokonazolu. Wyniki testu lekowrażliwości izolowanych grzybów z rodzaju *Candida*, z uwzględnieniem szczepów wrażliwych, średniowrażliwych i opornych dla chorych grupy I przedstawia rycina 25. Najbardziej aktywnym lekiem były: amfoterycyna B, flucytozyna oraz nystatyna, na które wrażliwość wykazało odpowiednio 114 (95%), 112 (93,3%) oraz 100 (83,3%) izolatów *Candida*. Niższą wrażliwość obserwowano wobec pochodnych azolowych: mikonazolu, ekonazolu, ketokonazolu, dla których wynosiła ona odpowiednio 99 (82,6%), 92 (76,7%) i 93 (77,5%) badanych izolatów *Candida*.



Rycina 25. Wrażliwość grzybów z rodzaju *Candida* na leki przeciwgrzybicze u chorych grupy I (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – flucytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).

Analizując wrażliwość szczepów gatunku *C. albicans* u chorych grupy I (Rycina 26), stwierdzono 71 (97,4%) szczepów wrażliwych na amfoterycynę B oraz 66 (90,4%) wrażliwych na nystatynę. Wśród leków syntetycznych





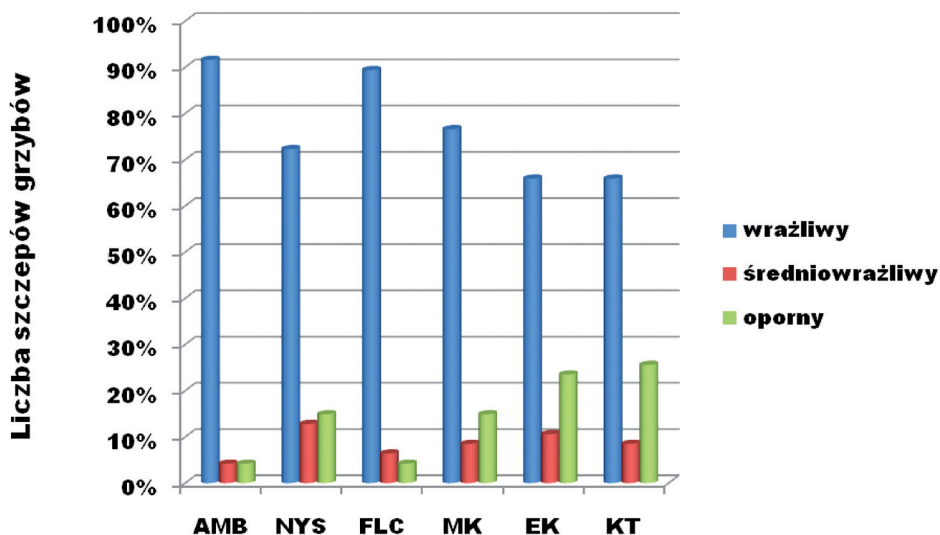
Rycina 26. Wrażliwość grzybów gatunku *C. albicans* na leki przeciwygrzybicze u chorych grupy I (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – flucytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).

najwięcej szczepów *C. albicans* było wrażliwych na flucytozynę – 70 (95,9%). Wrażliwość grzybów *C. albicans* na pochodne azolowe, dla mikonazolu, ekonazolu i ketokonazolu wynosiła odpowiednio: 63 (86,3%), 61 (83,6%) i 62 (85%) szczepów tego gatunku.

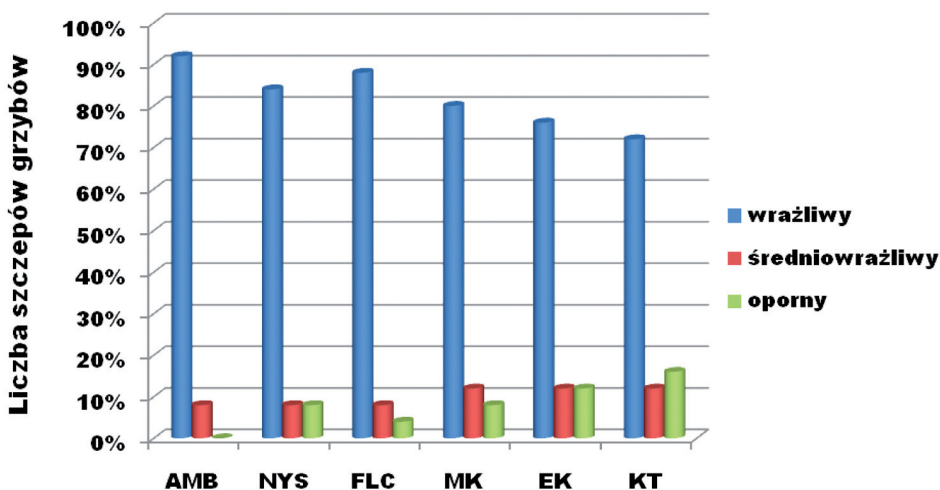
Na rycinie 27 przedstawiono lekowrażliwość grzybów *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* oraz *C. dubliniensis*, określonych jako *non-albicans Candida* (NAC). W tej grupie drobnoustrojów najbardziej skutecznym antymikotykiem okazały się amfoterycyna B – 43 (91,6%) oraz flucytozyna – 42 (89,4%) badanych izolatów. Nystatyna była aktywna wobec 34 (72,3%) szczepów. Wrażliwość szczepów NAC wobec mikonazolu, ekonazolu i ketokonazolu wynosiła odpowiednio 36 (76,6%), 31 (65,9%) oraz 31 (65,9%) badanych izolatów.

Wyniki testu lekowrażliwości grzybów z rodzaju *Candida*, izolowanych od chorych grupy kontrolnej przedstawia rycina 28. Najwyższą aktywność obserwowano dla: amfoterycyny B, flucytozyny oraz nystatyny, na które to leki wrażliwość wykazało odpowiednio 23 (92%), 21 (84%) oraz 22 (88%) izolatów. Podobnie jak w grupie I stwierdzono niższą wrażliwość badanych szczepów





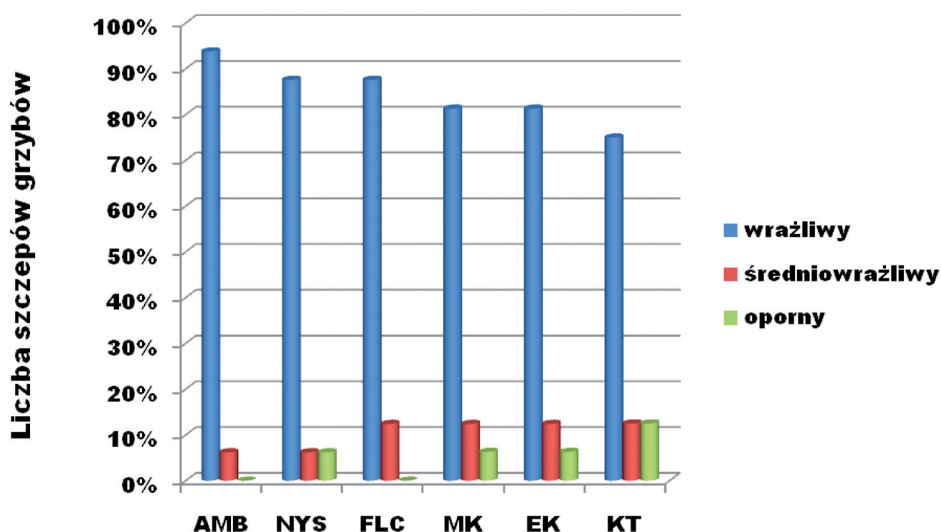
Rycina 27. Wrażliwość grzybów NAC na leki przeciwygrzybicze u chorych grupy I (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – flucytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).



Rycina 28. Wrażliwość grzybów z rodzaju *Candida* na leki przeciwygrzybicze u chorych grupy II (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – licytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).

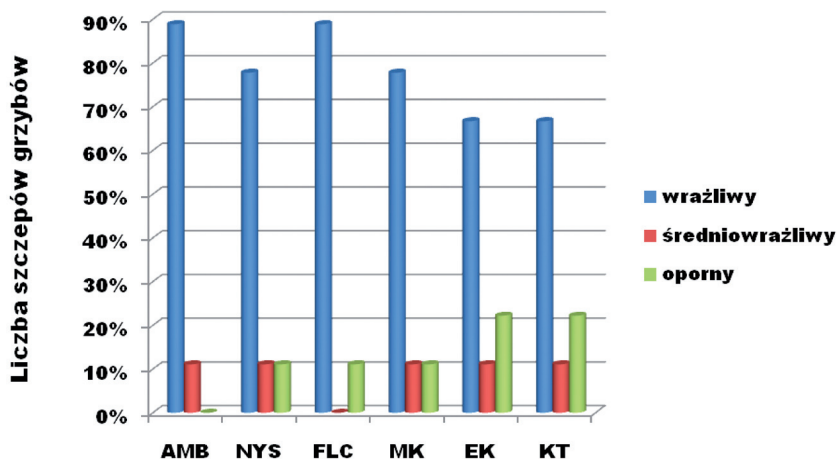
wobec pochodnych azolowych – mikonazolu, ekonazolu, ketokonazolu, dla których wynosiła ona odpowiednio 20 (80%), 19 (76%) i 18 (72%) badanych izolatów *Candida*.

Analizując wrażliwość szczepów gatunku *C. albicans* u chorych grupy II (Rycina 29), stwierdzono 15 (93,8%) szczepów wrażliwych na amfoterycynę B i 14 (87,6%) wrażliwych na nystatynę. Wśród leków syntetycznych najwięcej szczepów *C. albicans* było wrażliwych na flucytozynę – 14 (87,6%). Wrażliwość grzybów *C. albicans* na pochodne azolowe, dla mikonazolu, ekonazolu i ketokonazolu wynosiła odpowiednio: 13 (81,3%), 13 (81,3%) i 12 (75%) szczepów tego gatunku.



Rycina 29. Wrażliwość grzybów gatunku *C. albicans* na leki przeciwgrzybicze u chorych grupy II (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – flucytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).

Na rycinie 30 przedstawiono lekowrażliwość grzybów NAC. Najbardziej skutecznym antymikotykiem dla drobnoustrojów tej grupy okazały się amfoterycyna B – 8 (88,9%) oraz flucytozyna – 8 (88,9%) badanych izolatów było wrażliwych na ten lek. Nystatyna była aktywna wobec 7 (77,8%) szczepów. Wrażliwość NAC wobec mikonazolu, ekonazolu i ketokonazolu wynosiła odpowiednio 7 (77,8%), 6 (66,7%) oraz 6 (66,7%) badanych izolatów.



Rycina 30. Wrażliwość grzybów NAC na leki przeciwgrzybicze u chorych grupy II (AMB – amfoterycyna B, NYS – nystatyna, FLC – flucytozyna, MK – mikonazol, EK – ekonazol, KT – ketokonazol).

Tabela 7. Lekowrażliwość szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych grupy I i II

| Lek przeciwgrzybiczy | Grupa I     | Grupa II | p     |
|----------------------|-------------|----------|-------|
| Amfoterycyna B       |             |          |       |
| wrażliwy             | 114 (95%)   | 23 (92%) | 0,551 |
| średniowrażliwy      | 3 (2,5%)    | 2 (8%)   | 0,173 |
| oporny               | 3 (2,5%)    | 0 (0%)   | 0,426 |
| Nystatyna            |             |          |       |
| wrażliwy             | 100 (83,3%) | 21 (84%) | 0,935 |
| średniowrażliwy      | 9 (7,5%)    | 2 (8%)   | 0,932 |
| oporny               | 11 (9,2%)   | 2 (8%)   | 0,853 |
| Flucytozyna          |             |          |       |
| wrażliwy             | 112 (93,3%) | 22 (88%) | 0,361 |
| średniowrażliwy      | 6 (5%)      | 2 (8%)   | 0,551 |
| oporny               | 2 (1,7%)    | 1 (4%)   | 0,457 |
| Mikonazol            |             |          |       |
| wrażliwy             | 99 (82,5)   | 20 (80%) | 0,767 |
| średniowrażliwy      | 11 (9,2%)   | 3 (12%)  | 0,663 |
| oporny               | 10 (8,3%)   | 2 (8%)   | 0,956 |
| Ekonazol             |             |          |       |
| wrażliwy             | 92 (76,7%)  | 19 (76%) | 0,943 |
| średniowrażliwy      | 10 (8,3%)   | 3 (12%)  | 0,560 |
| oporny               | 18 (15%)    | 3 (12%)  | 0,699 |
| Ketokonazol          |             |          |       |
| wrażliwy             | 93 (77,5%)  | 18 (72%) | 0,556 |
| średniowrażliwy      | 9 (7,5%)    | 3 (12%)  | 0,459 |
| oporny               | 18 (15%)    | 4 (16%)  | 0,899 |

Nie stwierdzono istotnych różnic w lekowrażliwości *in vitro* szczepów grzybów izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych w obu badanych grupach (Tabele 7–9).

**Tabela 8.** Lekowrażliwość szczepów grzybów gatunku *C. albicans*, izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych grupy I i II

| Lek przeciwgrzybiczy | Grupa I    | Grupa II   | p     |
|----------------------|------------|------------|-------|
| Amfoterycyna B       |            |            |       |
| wrażliwy             | 71 (97,4%) | 15 (93,8%) | 0,483 |
| średniowrażliwy      | 1 (1,3%)   | 1 (6,2%)   | 0,236 |
| oporny               | 1 (1,3%)   | 0 (0%)     | 0,639 |
| Nystatyna            |            |            |       |
| wrażliwy             | 66 (90,4%) | 14 (87,6%) | 0,727 |
| średniowrażliwy      | 3 (4,1%)   | 1 (6,2%)   | 0,709 |
| oporny               | 4 (5,5%)   | 1 (6,2%)   | 0,904 |
| Flucytozyna          |            |            |       |
| wrażliwy             | 70 (95,9%) | 14 (87,6%) | 0,190 |
| średniowrażliwy      | 3 (4,1%)   | 2 (12,4%)  | 0,190 |
| oporny               | 0 (0%)     | 0 (0%)     | --    |
| Mikonazol            |            |            |       |
| wrażliwy             | 63 (86,3%) | 13 (81,3%) | 0,606 |
| średniowrażliwy      | 7 (9,6%)   | 2 (12,4%)  | 0,727 |
| oporny               | 3 (4,1%)   | 1 (6,3%)   | 0,709 |
| Ekonazol             |            |            |       |
| wrażliwy             | 61 (83,6%) | 13 (81,3%) | 0,824 |
| średniowrażliwy      | 5 (6,8%)   | 2 (12,4%)  | 0,449 |
| oporny               | 7 (9,6%)   | 1 (6,3%)   | 0,673 |
| Ketokonazol          |            |            |       |
| wrażliwy             | 62 (85%)   | 12 (75%)   | 0,339 |
| średniowrażliwy      | 5 (6,8%)   | 2 (12,5%)  | 0,449 |
| oporny               | 6 (8,2%)   | 2 (12,5%)  | 0,589 |

**Tabela 9.** Lekowrażliwość szczepów grzybów NAC, izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych grupy I i II

| Lek przeciwgrzybiczy | Grupa I    | Grupa II  | p     |
|----------------------|------------|-----------|-------|
| Amfoterycyna B       |            |           |       |
| wrażliwy             | 43 (91,6%) | 8 (88,9%) | 0,803 |
| średniowrażliwy      | 2 (4,2%)   | 1 (11,1%) | 0,406 |
| oporny               | 2 (4,2%)   | 0 (0%)    | 0,531 |
| Nystatyna            |            |           |       |
| wrażliwy             | 34 (72,3%) | 7 (77,8%) | 0,737 |
| średniowrażliwy      | 6 (12,8%)  | 1 (11,1%) | 0,891 |
| oporny               | 7 (14,9%)  | 1 (11,1%) | 0,768 |
| Flucytozyna          |            |           |       |
| wrażliwy             | 42 (89,4%) | 8 (88,9%) | 0,967 |
| średniowrażliwy      | 3 (6,4%)   | 0 (0%)    | 0,439 |
| oporny               | 2 (4,2%)   | 1 (11,1%) | 0,406 |
| Mikonazol            |            |           |       |
| wrażliwy             | 36 (76,6%) | 7 (77,8%) | 0,939 |
| średniowrażliwy      | 4 (8,5%)   | 1 (11,1%) | 0,803 |
| oporny               | 7 (14,9%)  | 1 (11,1%) | 0,768 |
| Ekonazol             |            |           |       |
| wrażliwy             | 31 (65,9%) | 6 (66,7%) | 0,967 |
| średniowrażliwy      | 5 (10,6%)  | 1 (11,1%) | 0,967 |
| oporny               | 11 (23,5%) | 2 (22,2%) | 0,939 |
| Ketokonazol          |            |           |       |
| wrażliwy             | 31 (65,9%) | 6 (66,7%) | 0,967 |
| średniowrażliwy      | 4 (8,5%)   | 1 (11,1%) | 0,803 |
| oporny               | 12 (25,6%) | 2 (22,2%) | 0,834 |

### 4.3. Ocena parametrów wyrównania glikemii

U chorych grupy I średni czas trwania jawnej klinicznie cukrzycy wynosił  $10,6 \pm 5,1$  lat. Średnia wartość HbA1c u tych chorych wynosiła  $8,6 \pm 1,9\%$ , średnia wartość glikemii na czczo –  $9,8 \pm 2,6$  mmol/l. W tabeli 10 przedstawiono rozkład wartości HbA1c u chorych grupy I.

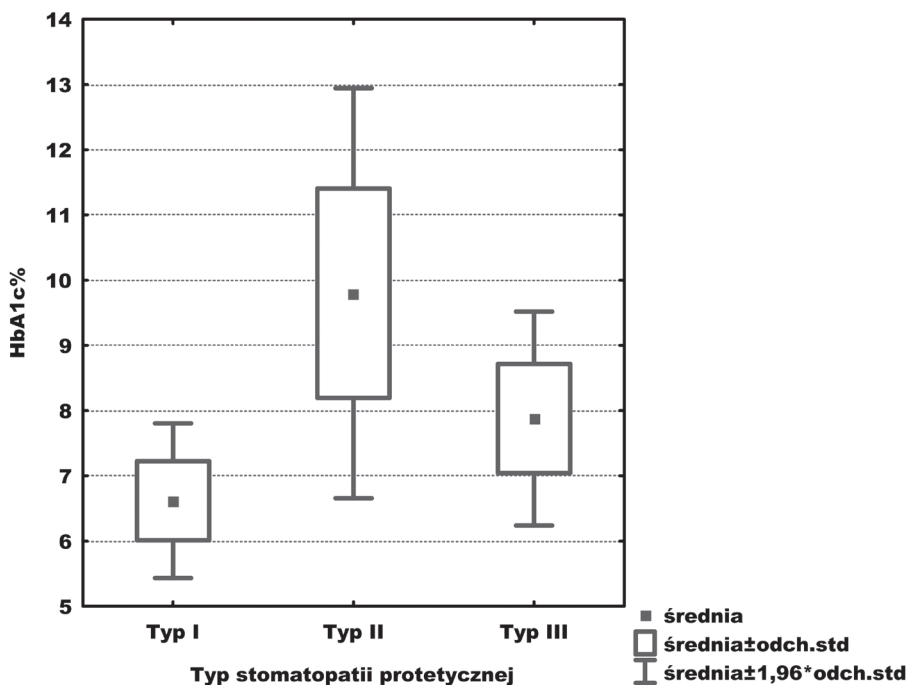
**Tabela 10.** Rozkład wartości hemoglobiny glikowanej (HbA1c) u chorych grupy I

| Wartości HbA1c (%) | Liczba chorych (%) |
|--------------------|--------------------|
| < 7%               | 29 (26,4)          |
| ≥ 7%               | 81 (73,6)          |

Uwzględniając główne założenia niniejszej pracy, szczególną uwagę poświęcono analizie zależności wskazujących na istnienie powiązania wykrytej infekcji *Candida* błony śluzowej jamy ustnej z wyrównaniem glikemii w cukrzycy, mierzonym na podstawie odsetka HbA1c oraz wartości glikemii na czczo.

Porównanie wyników pomiaru HbA1c w grupie chorych na cukrzycę w różnych typach stomatopatii wykazało, iż odsetek HbA1c jest najniższy u chorych z typem I ( $6,62\% \pm 0,61$ ), istotnie wzrasta u chorych z typem III schorzenia ( $7,88\% \pm 0,84$ ), osiągając najwyższą wartość w grupie chorych z typem II stomatopatii ( $9,8\% \pm 1,6$ ); zróżnicowanie między grupami jest istotne statystycznie,  $p < 0,001$  (Rycina 31).

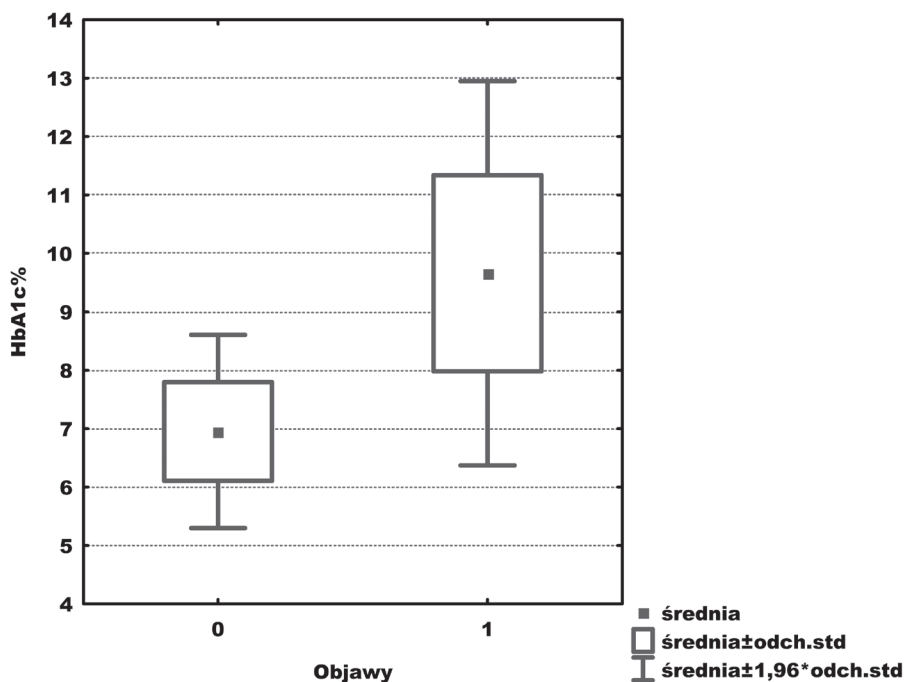
U chorych grupy I, u których obserwowano obecność choćby jednego z objawów podmiotowych stomatopatii protetycznej, stwierdzono znacząco wyższy odsetek HbA1c w porównaniu z grupą chorych, którzy nie zgłaszali objawów podmiotowych schorzenia ( $9,66\% \pm 1,68$  vs  $6,95\% \pm 0,84$ ),  $p < 0,001$  (Rycina 32).



Rycina 31. Wartość HbA1c w różnych typach stomatopatii protetycznej według klasyfikacji Newtona u chorych grupy I.

**Tabela 11.** Parametry statystyki opisowej wartości HbA1c w różnych typach stomatopatii protetycznej u chorych grupy I

| Typ SP | n  | HbA1c (%) |         |         |          |      |
|--------|----|-----------|---------|---------|----------|------|
|        |    | Średnia   | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| I      | 33 | 6,62      | 6,50    | 6,00    | 8,10     | 0,61 |
| II     | 63 | 9,80      | 9,40    | 7,30    | 13,60    | 1,60 |
| III    | 14 | 7,88      | 8,00    | 6,10    | 9,30     | 0,84 |

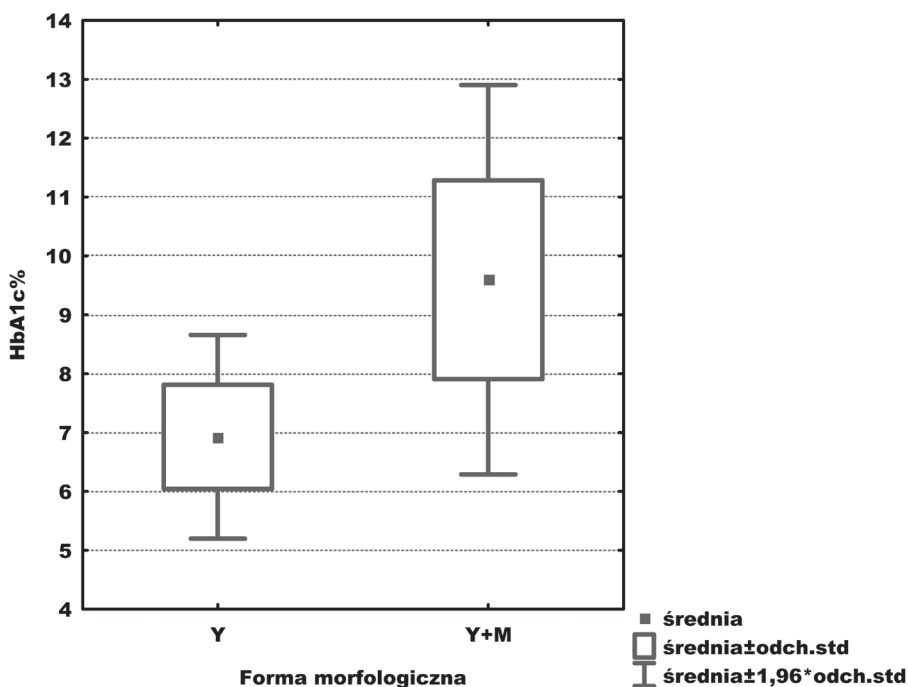


**Rycina 32.** Wartość HbA1c u chorych grupy I; 0 – chorzy nie zgłaszający objawów podmiotowych, 1 – chorzy zgłaszający obecność objawów podmiotowych.

**Tabela 12.** Parametry statystyki opisowej wartości HbA1c u chorych grupy I w podgrupach bez objawów podmiotowych i zgłaszających objawy podmiotowe

| Objawy podmiotowe stomatopatii protetycznej | n  | HbA1c (%) |         |         |          |      |
|---|----|-----------|---------|---------|----------|------|
|   |    | Średnia   | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Brak objawów podmiotowych                   | 43 | 6,95      | 6,60    | 6,00    | 8,90     | 0,84 |
| Objawy podmiotowe                           | 67 | 9,66      | 9,30    | 6,10    | 13,60    | 1,68 |

Uznając, iż zmienność morfologiczna jest jednym z ważnych czynników wirulencji grzybów gatunku *C. albicans*, oceniono poziom HbA1c w podgrupie chorych z infekcją *C. albicans*, w zależności od formy morfologicznej drobnoustroju. W grupie chorych na cukrzycę, u których stwierdzono występowanie wyłącznie formy morfologicznej Y, średnia wartość HbA1c wynosiła  $6,93\% \pm 0,88$  i była niższa w porównaniu z wartością HbA1c ( $9,6\% \pm 1,69$ ) w grupie chorych, u których stwierdzono występowanie również formy M,  $p < 0,001$  (Rycina 33).



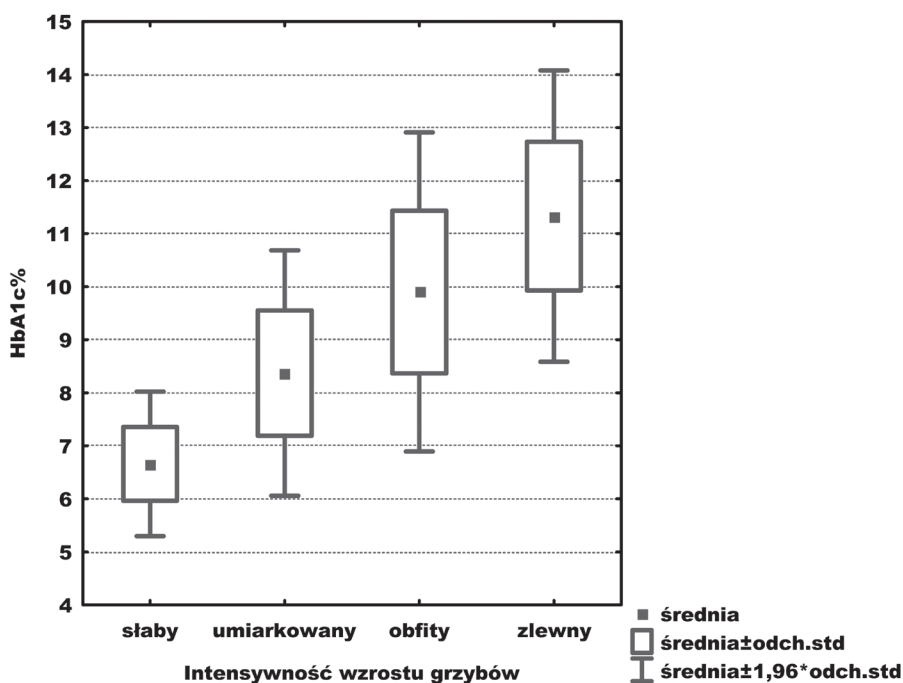
Rycina 33. Wartość HbA1c w zależności od występowania form morfologicznych grzybów gatunku *C. albicans* u chorych grupy I.

Tabela 13. Parametry statystyki opisowej wartości HbA1c u chorych grupy I w przypadkach stomatopatii protetycznej z formą morfologiczną grzybów Y i M

| Forma morfologiczna | n  | HbA1c (%) |         |         |          |      |
|---------------------|----|-----------|---------|---------|----------|------|
|                     |    | Średnia   | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Y                   | 19 | 6,93      | 6,60    | 6,00    | 9,60     | 0,88 |
| Y + M               | 54 | 9,60      | 9,20    | 6,20    | 13,60    | 1,69 |



Dokonano porównania wartości HbA1c w podgrupach chorych w zależności od intensywności wzrostu grzybów izolowanych z błony śluzowej podłoża protetycznego. Najwyższy odsetek HbA1c stwierdzono w przypadku hodowli o wzroście zlewnym oraz obfitym; wartości liczbowe HbA1c wynosiły odpowiednio  $11,33\% \pm 1,4$  i  $9,9\% \pm 1,53$ . W przypadku hodowli o wzroście umiarkowanym i słabym odsetek HbA1c był niższy i wynosił odpowiednio  $8,37\% \pm 1,18$  oraz  $6,66\% \pm 0,7$  (Rycina 34). Zróznicowanie rozkładów wartości HbA1c pomiędzy grupami jest istotne statystycznie;  $p < 0,001$ .



Rycina 34. Wartość HbA1c w zależności od intensywności wzrostu grzybów u chorych grupy I.

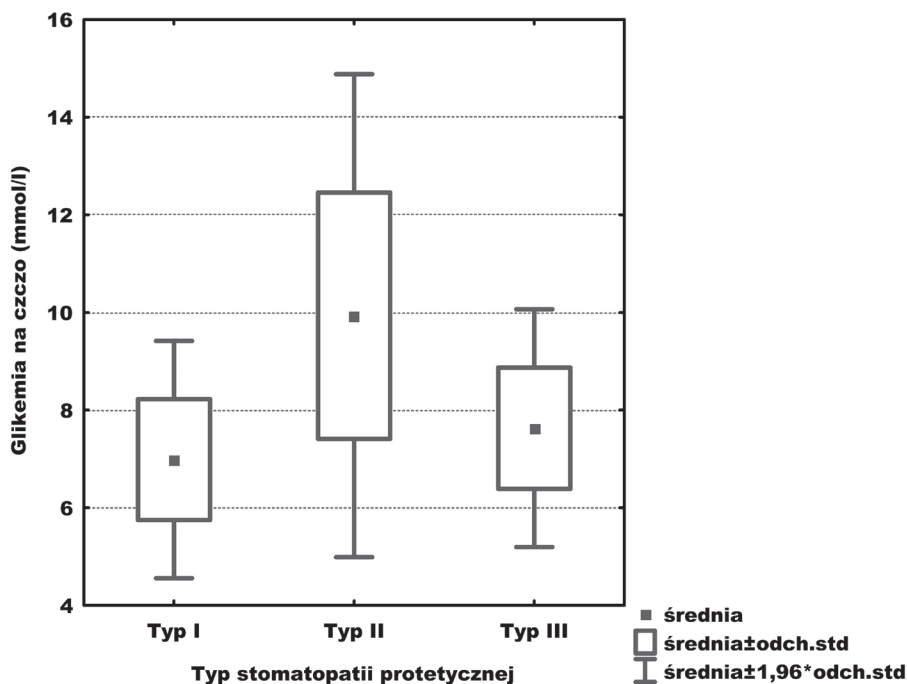
Podobnej analizy dokonano dla oceny zależności powyższych parametrów w odniesieniu do poziomu glikemii na czczo. Porównanie wyników glikemii na czczo w różnych typach stomatopatii protetycznej u chorych na cukrzycę wykazało, iż jest on najniższy u chorych z typem I ( $6,98 \pm 1,24 \text{ mmol/l}$ ), istotnie wzrasta u chorych z typem III schorzenia ( $7,63 \pm 1,24 \text{ mmol/l}$ ), osiągając naj-

**Tabela 14.** Parametry statystyki opisowej wartości HbA1c u chorych grupy I w podgrupach o różnej intensywności wzrostu grzybów

| Wzrost grzybów<br>(intensywność) | n  | HbA1c (%) |         |         |          |      |
|----------------------------------|----|-----------|---------|---------|----------|------|
|                                  |    | Średnia   | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Słaby                            | 32 | 6,66      | 6,50    | 6,00    | 8,20     | 0,70 |
| Umiarkowany                      | 35 | 8,37      | 8,10    | 6,00    | 11,40    | 1,18 |
| Obfity                           | 33 | 9,90      | 9,20    | 7,80    | 13,00    | 1,53 |
| Zlewny                           | 10 | 11,33     | 11,05   | 10,00   | 13,60    | 1,40 |

wyższą wartość w grupie chorych z typem II stomatopatii ( $9,93 \pm 2,52$  mmol/l), zróżnicowanie między grupami jest istotne statystycznie,  $p < 0,001$  (Rycina 35).

U chorych grupy I, u których obserwowano obecność choćby jednego z objawów podmiotowych stomatopatii protetycznej, stwierdzono wyższy poziom



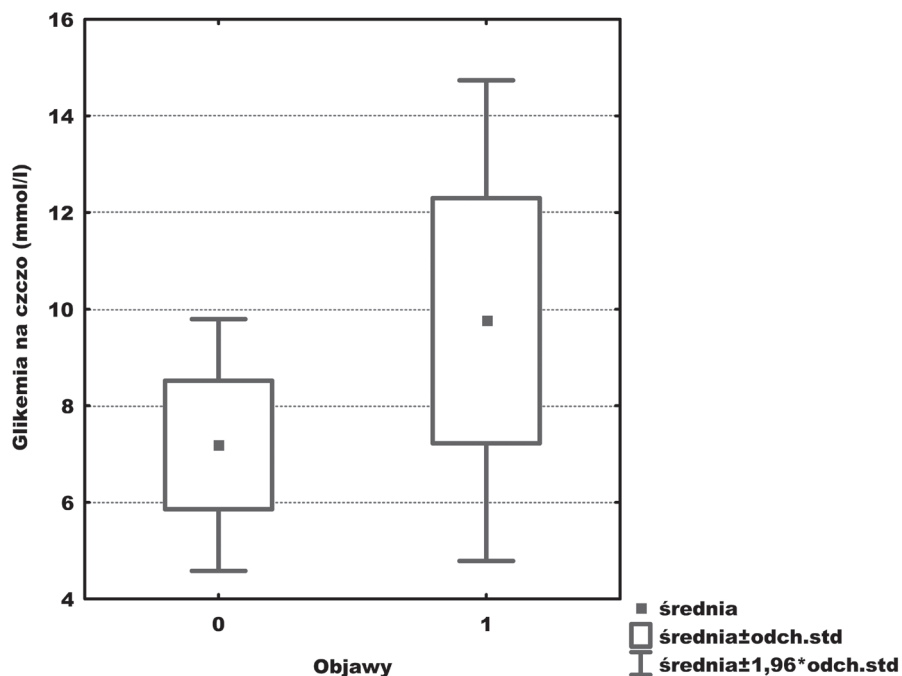
**Rycina 35.** Wartości glikemii na czczo w różnych typach stomatopatii protetycznej według klasyfikacji Newtona u chorych grupy I.

**Tabela 15.** Parametry statystyki opisowej wartości glikemii na czczo w różnych typach stomatopatii protetycznej u chorych grupy I

| Typ stomatopatii protetycznej | n  | Glikemia na czczo (mmol/l) |         |         |          |      |
|-------------------------------|----|----------------------------|---------|---------|----------|------|
|                               |    | Średnia                    | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| I                             | 33 | 6,98                       | 6,60    | 5,90    | 11,00    | 1,24 |
| II                            | 63 | 9,93                       | 9,90    | 5,70    | 14,70    | 2,52 |
| III                           | 14 | 7,63                       | 7,90    | 5,50    | 9,70     | 1,24 |

glikemii na czczo w porównaniu z grupą chorych, którzy nie zgłaszali objawów podmiotowych stomatopatii ( $9,76 \pm 2,54$  vs  $7,19 \pm 1,33$  mmol/l),  $p < 0,001$  (Rycina 36).

Porównano poziom glikemii na czczo w podgrupie chorych na cukrzycę z infekcją *C. albicans*, w zależności od formy morfologicznej drobnoustroju. U chorych, u których stwierdzono występowanie wyłącznie formy morfologicz-



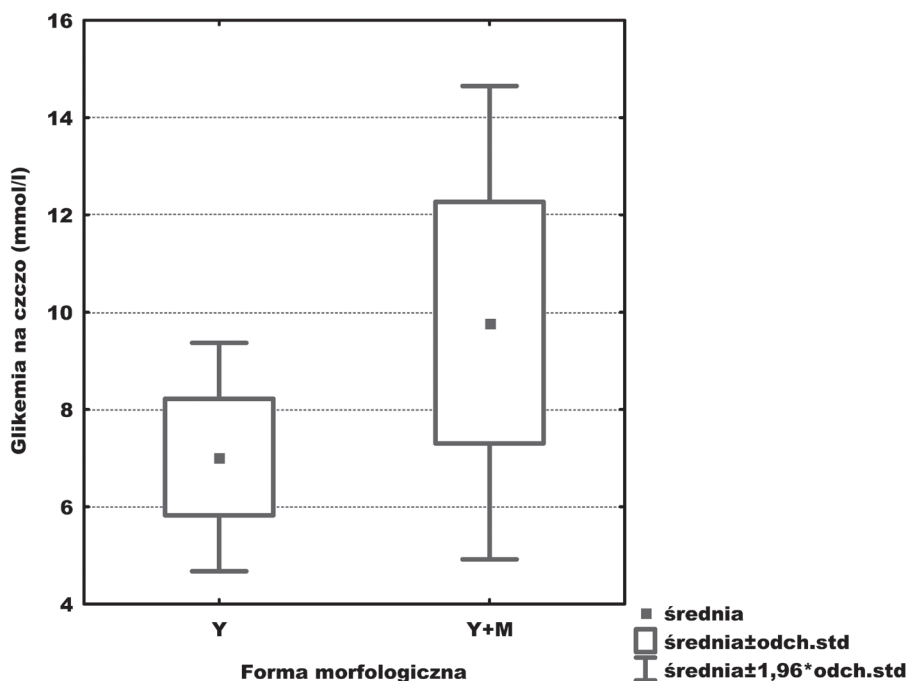
**Rycina 36.** Wartości glikemii na czczo u chorych grupy I; 0 – chorzy nie zgłaszający objawów podmiotowych, 1 – chorzy zgłaszający obecność objawów podmiotowych.

**Tabela 16.** Parametry statystyki opisowej wartości glikemii na czczo w podgrupach bez objawów podmiotowych i zgłaszających objawy podmiotowe u chorych grupy I

| Objawy podmiotowe         | n  | Glikemia na czczo (mmol/l) |         |         |          |      |
|---------------------------|----|----------------------------|---------|---------|----------|------|
|                           |    | Średnia                    | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Brak objawów podmiotowych | 43 | 7,19                       | 6,90    | 5,90    | 11,00    | 1,33 |
| Objawy podmiotowe         | 67 | 9,76                       | 9,10    | 5,50    | 14,70    | 2,54 |

nej Y, średnia wartość glikemii na czczo wynosiła  $7,02 \pm 1,2$  mmol/l i była niższa w porównaniu z wartością glikemii na czczo ( $9,79 \pm 2,48$  mmol/l) w grupie chorych, u których stwierdzono występowanie również formy mycelialnej M,  $p < 0,001$  (Rycina 37).

Dokonano porównania poziomu glikemii na czczo w podgrupach chorych w zależności od intensywności wzrostu grzybów izolowanych z błony śluzowej podłoża protetycznego. Najwyższy poziom glikemii na czczo stwierdzono

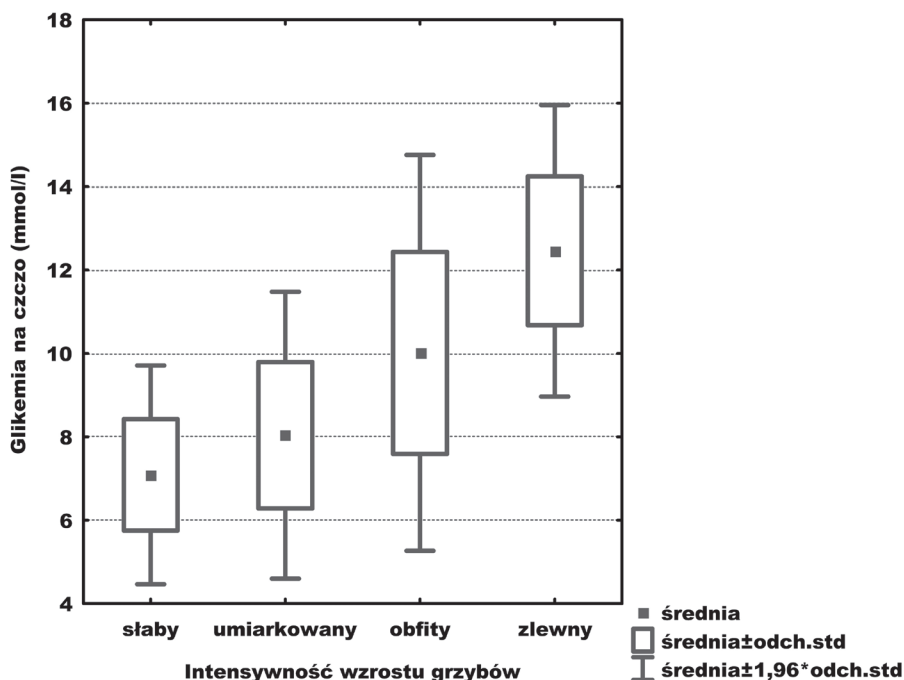


Rycina 37. Wartości glikemii na czczo w zależności od występowania form morfologicznych grzybów gatunku *C. albicans* u chorych grupy I.

**Tabela 17.** Parametry statystyki opisowej wartości glikemii na czczo u chorych grupy I w przypadkach stomatopatii protetycznej z formą morfologiczną grzybów Y i M

| Forma morfologiczna | n  | Glikemia na czczo (mmol/l) |         |         |          |      |
|---------------------|----|----------------------------|---------|---------|----------|------|
|                     |    | Średnia                    | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Y                   | 19 | 7,02                       | 6,70    | 5,70    | 11,00    | 1,20 |
| Y + M               | 54 | 9,79                       | 9,10    | 5,50    | 14,70    | 2,48 |

w przypadku hodowli o wzroście zlewnym oraz obfitym, wartości liczbowe wynosiły odpowiednio  $12,46 \pm 1,78$  mmol/l i  $10,01 \pm 2,42$  mmol/l. W przypadku hodowli o wzroście umiarkowanym i słabym poziom glikemii na czczo był niższy i wynosił odpowiednio  $8,04 \pm 1,76$  mmol/l oraz  $7,09 \pm 1,34$  mmol/l. Zróżnicowanie rozkładów wartości glikemii na czczo pomiędzy grupami jest istotne statystycznie:  $p < 0,001$  (Rycina 38).



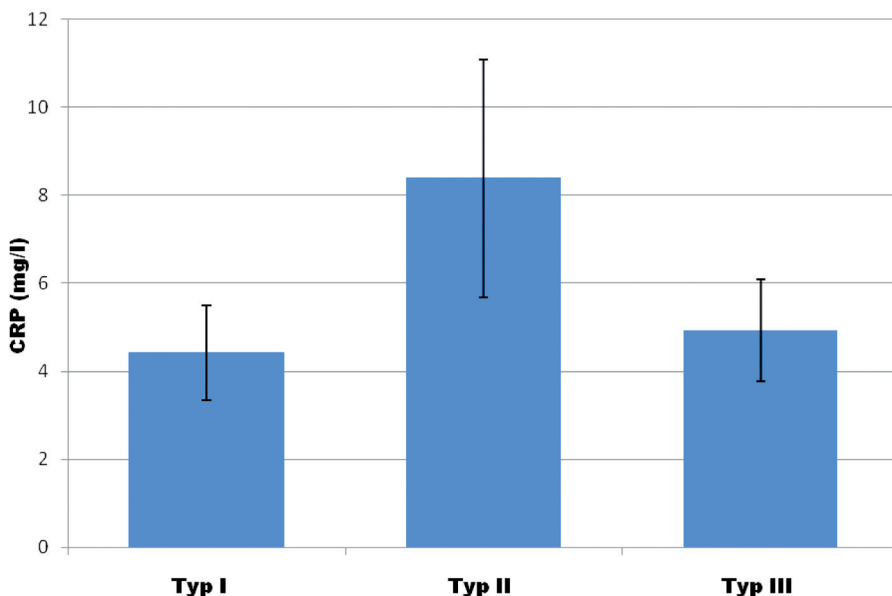
**Rycina 38.** Wartości glikemii na czczo w zależności od intensywności wzrostu grzybów u chorych grupy I.

**Tabela 18.** Parametry statystyki opisowej wartości glikemii na czczo u chorych grupy I w podgrupach o różnej intensywności wzrostu grzybów

| Wzrost grzybów (intensywność) | n  | Glikemia na czczo (mmol/l) |         |         |          |      |
|-------------------------------|----|----------------------------|---------|---------|----------|------|
|                               |    | Średnia                    | Mediana | Minimum | Maksimum | SD   |
| Słaby                         | 32 | 7,09                       | 6,65    | 5,90    | 11,00    | 1,34 |
| Umiarkowany                   | 35 | 8,04                       | 7,90    | 5,70    | 12,10    | 1,76 |
| Obfity                        | 33 | 10,01                      | 9,90    | 5,50    | 14,70    | 2,42 |
| Zlewny                        | 10 | 12,46                      | 12,50   | 9,00    | 14,60    | 1,78 |

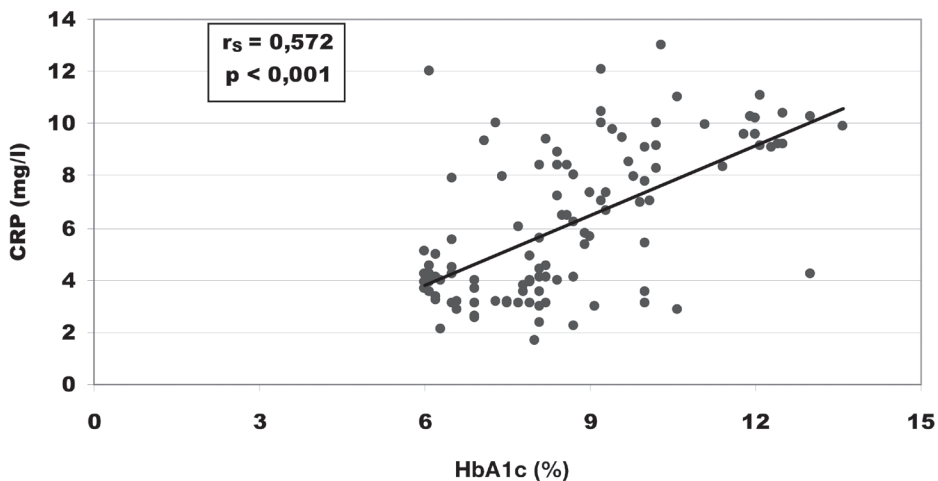
#### 4.4. Stężenie białka C-reaktywnego w surowicy krwi

Średnie stężenie CRP u chorych na cukrzycę typu 2 ze współistniejącą infekcją grzybiczą wynosiło  $7,31 \pm 2,79$  mg/l. Najwyższe wartości stężenia CRP występowały w typie II, średnia wartość wynosiła  $8,39 \pm 2,70$  mg/l, u chorych z typem III oraz I średnie stężenie CRP wynosiło odpowiednio  $4,93 \pm 1,15$  mg/l oraz  $4,42 \pm 1,07$  mg/l;  $p < 0,001$  (Rycina 39).

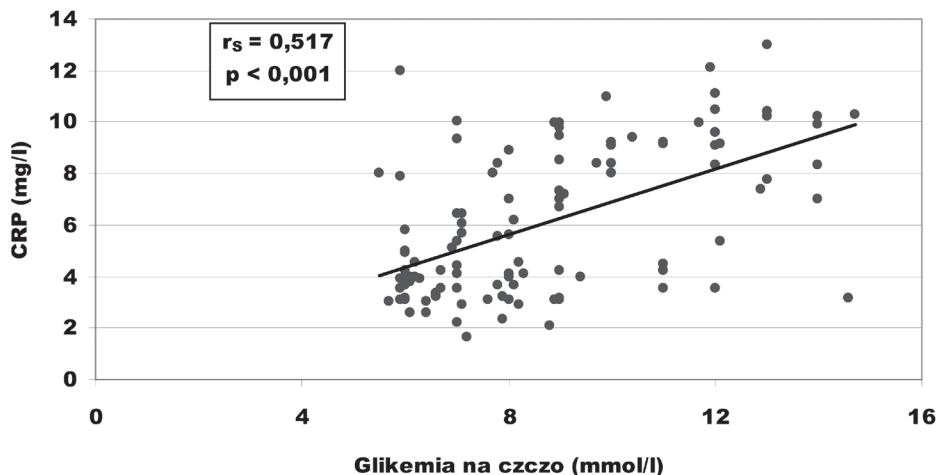


**Rycina 39.** Stężenie CRP w surowicy krwi u chorych grupy I w różnych typach stomatoprotekcji według klasyfikacji Newtona;  $p < 0,01$ .

Stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem w surowicy CRP a odsetkiem HbA1c ( $r_s = 0,572$ ,  $p < 0,001$ ) (Rycina 40), oraz między stężeniem CRP a glikemią na czczo ( $r_s = 0,517$ ,  $p < 0,001$ ) (Rycina 41).



Rycina 40. Zależność między stężeniem CRP w surowicy krwi a odsetkiem HbA1c u chorych grupy I; ( $r = 0,572$ ,  $p < 0,001$ ).



Rycina 41. Zależność między stężeniem CRP w surowicy krwi a glikemią na czczo u chorych grupy I; ( $r = 0,517$ ,  $p < 0,001$ ).

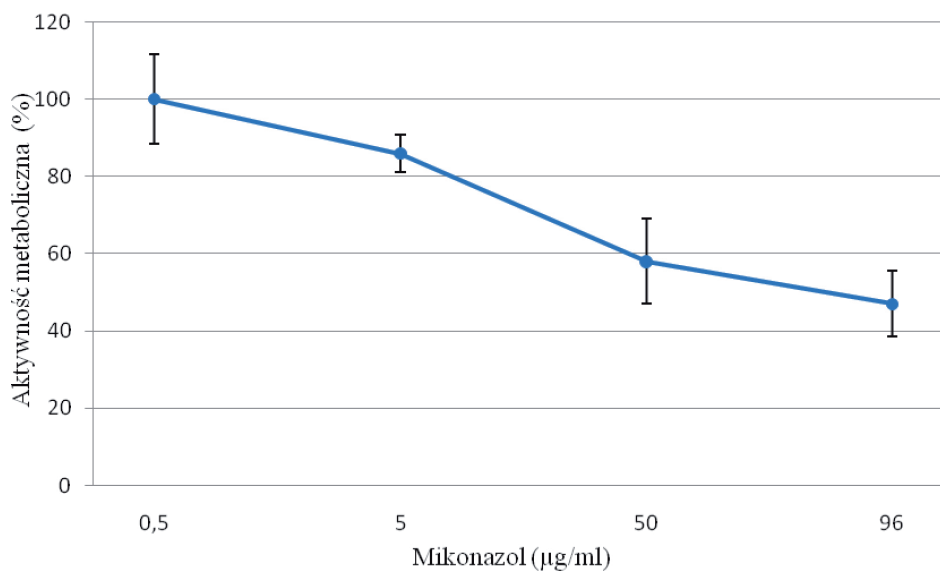
#### 4.6. Wyniki badań doświadczalnych nad biofilmem *Candida*

Badane szczepy grzybów były zdolne do tworzenia biofilmu po 48 godzinach inkubacji i wytwarzały struktury biofilmu na powierzchni PMMA. Dane uzyskane za pomocą metody kolorymetrycznej XTT wykazały, iż mikonazol w stężeniu 0,5 µg/ml nie hamuje aktywności metabolicznej biofilmu grzybów: *C. albicans* MYA-2732 (ATCC) (rycina 42), *C. glabrata* 7531/06 (rycina 45) oraz *C. parapsilosis* 11375/07 (rycina 47). W powyższym stężeniu mikonazol hamuje aktywność metaboliczną biofilmu grzybów *C. albicans* 6122/06 (rycina 43), *C. glabrata* MYA-275 (ATCC) (rycina 44) oraz *C. tropicalis* 8122/06 (rycina 46), odpowiednio o 14,5%, 47,1% i 46%. Mikonazol w stężeniu 5 µg/ml wykazywał zdolność hamowania aktywności metabolicznej grzybów biofilmu wszystkich badanych szczepów. Najwyższą skuteczność zanotowano dla szczepów *C. glabrata* MYA-275 (ATCC) – 37,1% (rycina 44) oraz *C. tropicalis* 8122/06 – 33% (rycina 46). Dla grzybów *C. albicans* MYA-2732 (ATCC) oraz *C. albicans* 6122/06 zdolność hamowania aktywności metabolicznej wynosiła odpowiednio 14,1% i 16,8% (ryciny 42 i 43). Najniższą skuteczność mikonazolu w powyższym stężeniu wykazano dla szczepów *C. parapsilosis* 11375/07 oraz *C. glabrata* 7531/06, odpowiednio 11,3% i 9% (ryciny 47 i 45). Mikonazol w stężeniu 50 µg/ml redukował aktywność metaboliczną biofilmu grzybów szczepów *C. glabrata* MYA-275 (ATCC) – 68,6% (rycina 44), oraz *C. tropicalis* 8122/06 – 58,4% (rycina 46). Niższą skuteczność obserwowano dla grzybów *C. glabrata* 7531/06 – 50,2% (rycina 45), *C. albicans* MYA-2732 (ATCC) – 42,2% (rycina 42), *C. albicans* 6122/06 – 50,1% (rycina 43) oraz *C. parapsilosis* 11375/07 – 20,7% (rycina 47),

Najwyższą zdolność hamowania aktywności metabolicznej grzybów w strukturze biofilmu dla wszystkich badanych szczepów wykazano dla mikonazolu w stężeniu 96 µg/ml. Dla grzybów *C. glabrata* MYA-275 (ATCC) oraz *C. tropicalis* 8122/06 wynosiła odpowiednio 83,7% i 75,4% (ryciny 44 i 46). Niższą skuteczność obserwowano dla grzybów *C. glabrata* 7531/06, *C. albicans* 6122/06 oraz *C. albicans* MYA-2732 (ATCC), odpowiednio 59,8%, 59,4% i 53% (ryciny 45, 43 oraz 42). Najniższą zdolność hamowania aktywności metabolicznej w powyższym stężeniu mikonazolu obserwowano wobec grzybów *C. parapsilosis* 11375/07 – 46,1% (rycina 47).

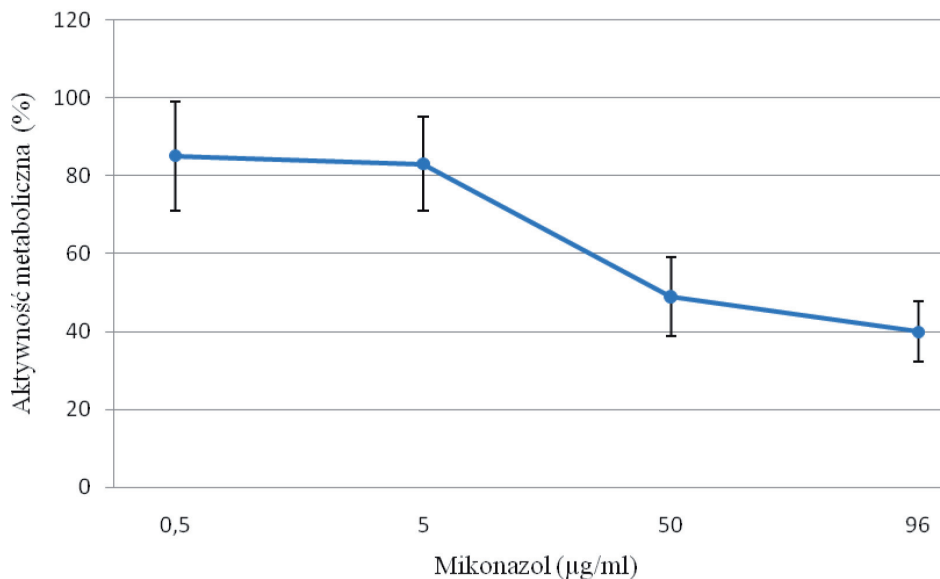


### **C. albicans MYA-2732 (ATCC)**

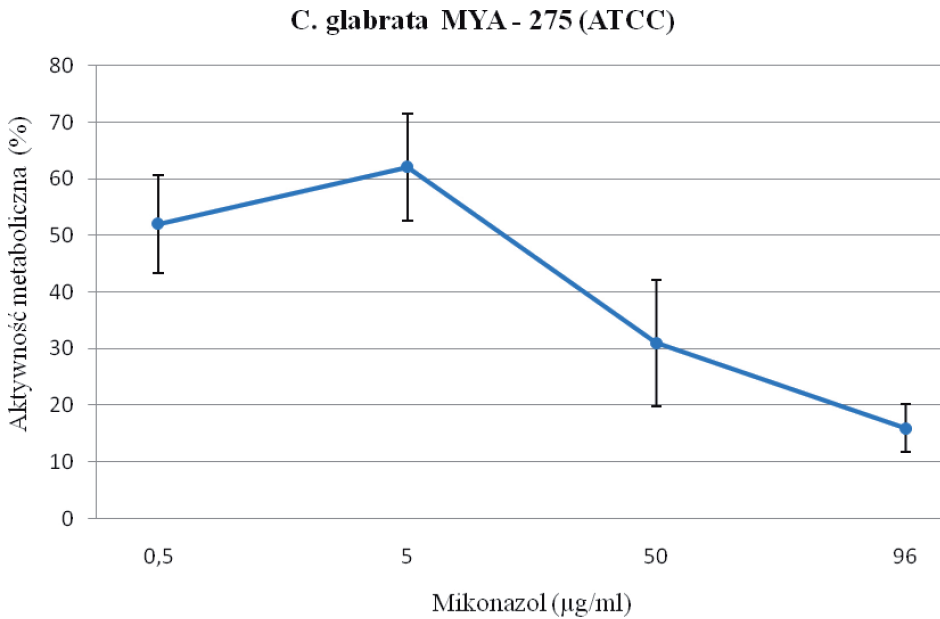


**Rycina 42.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. albicans* MYA – 2732 (ATCC); wartości średnie ± SD.

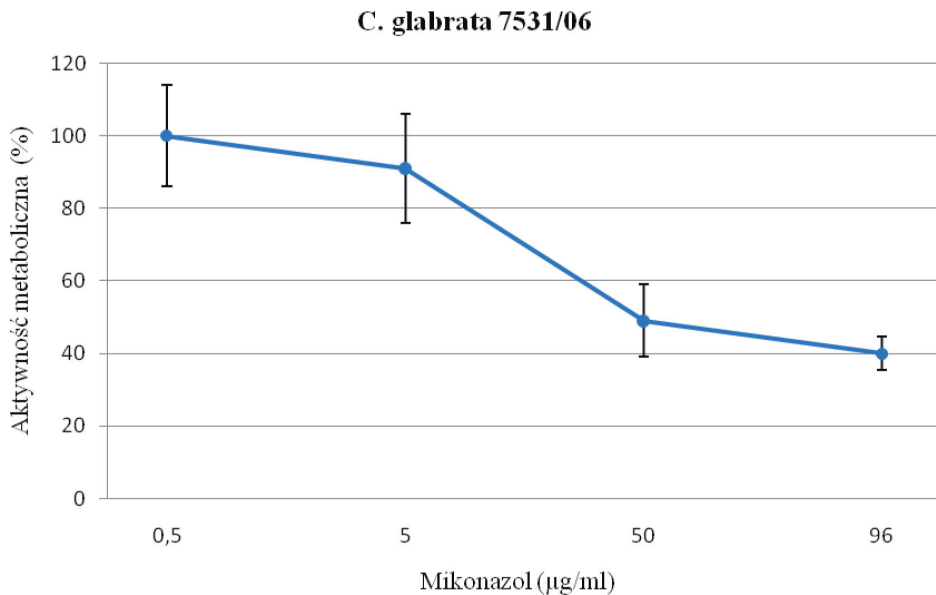
### **C. albicans 6122/06**



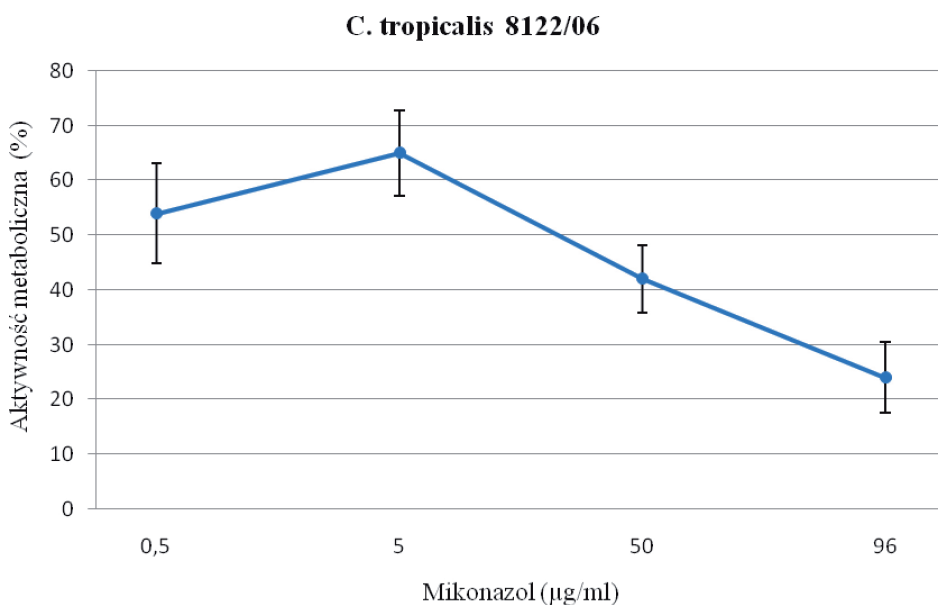
**Rycina 43.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. albicans* 6122/06; wartości średnie ± SD.



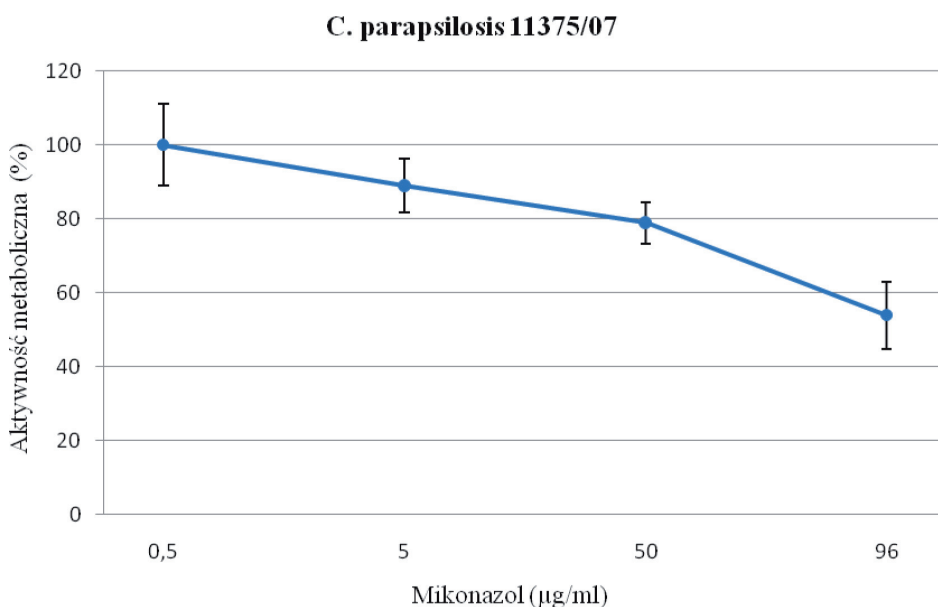
**Rycina 44.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. glabrata* MYA – 275 (ATCC); wartości średnie ± SD.



**Rycina 45.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. glabrata* 7531/06; wartości średnie ± SD.



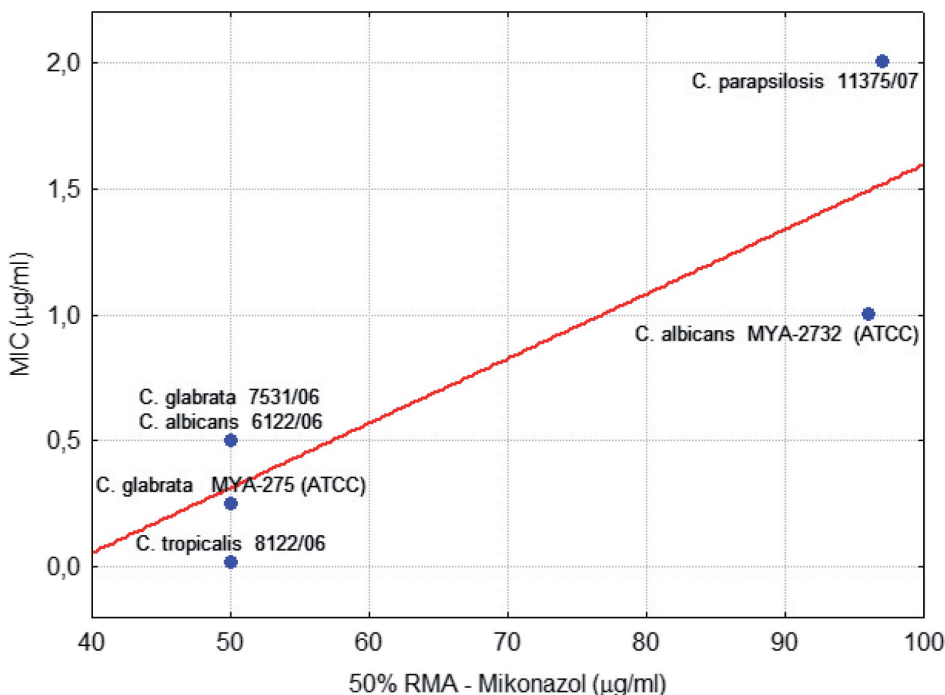
**Rycina 46.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. tropicalis* 8122/06; wartości średnie ± SD.



**Rycina 47.** Wpływ mikonazolu na redukcję aktywności metabolicznej komórek grzybów w strukturze biofilmu szczepu *C. parapsilosis* 11375/07; wartości średnie ± SD.

W zakresie badanych stężeń mikonazolu, stężenie leku powodujące 50% RMA wobec biofilmu grzybów *C. albicans* 6122/06, *C. glabrata* MYA-275 (ATCC), *C. glabrata* 7531/06 oraz *C. tropicalis* 8122/06 wynosiło 50  $\mu\text{g/ml}$ . Dla grzybów *C. albicans* MYA-2732 (ATCC) wartość stężenia mikonazolu powodującego 50% RMA wynosiła 96  $\mu\text{g/ml}$ , a dla *C. parapsilosis* 11375/07 była wyższa od  $>96 \mu\text{g/ml}$ .

Wartości liczbowe MIC dla mikonazolu wobec badanych szczepów grzybów kształtowały się następująco: *C. albicans* MYA-2732 (ATCC) – 1  $\mu\text{g/ml}$ , *C. albicans* 6122/06 – 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , *C. glabrata* MYA-275 (ATCC) – 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , *C. glabrata* 7531/06 – 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , *C. tropicalis* 8122/06 – 0,016  $\mu\text{g/ml}$ , *C. parapsilosis* 11375/07 – 2  $\mu\text{g/ml}$ . Dla badanych szczepów grzybów stwierdzono silną dodatnią korelację między wartością MIC a stężeniem mikonazolu powodującym 50% RMA grzybów w strukturze biofilmu,  $r_s=0,857$ ,  $p=0,029$  (rycina 48).



Rycina 48. Korelacja między wartościami MIC a stężeniem mikonazolu powodującym 50% RMA grzybów w strukturze biofilmu na powierzchni PMMA;  $r_s=0,857$ ,  $p=0,029$ .

## 5. Dyskusja

Występowanie stomatopatii protetycznej powikłanej infekcją grzybiczą zostało opisane w 1936 roku przez Cahna (wg Budtz-Jørgensen, 1974), który jako pierwszy zwrócił uwagę na rolę grzybów w etiopatogenezie tego schorzenia, a Lyon i Chick (1957) opisali serię przypadków stomatopatii leczonych antymikotykami oraz rezultaty tej terapii. Nyquist (1952) jako pierwszy opisał znaczenie urazu mechanicznego w etiopatogenezie stomatopatii protetycznych. Obecnie wielu autorów eksponuje rolę infekcji grzybiczej, uważając ją za główny czynnik etiopatogenetyczny tego schorzenia (Abaci, 2011; Mierzwińska-Nastalska, 2002; Pereira-Cenci i wsp., 2008).

Grupą chorych szczególnie narażonych na ryzyko wystąpienia stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym są pacjenci ze schorzeniami nowotworowymi i chorzy na cukrzycę (Challacombe i Naglik, 2006; Herman i wsp., 2001; Spiechowicz i wsp., 1994b; Yao i wsp., 2011). Spiechowicz i wsp. (1995) oraz Jainkittivong i wsp. (2010) wykazali, iż pacjenci geriatryczni, w miarę pogarszania stanu zdrowia, stanowią grupę ryzyka występowania stomatopatii protetycznych powikłanych zakażeniem grzybiczym. Wraz z wiekiem dochodzi do osłabienia naturalnych mechanizmów stymulacji układu odpornościowego do produkcji i wydzielania immunoglobulin (Shimizu i wsp., 2007; Yao i wsp., 2011). W obecnej pracy w obu badanych grupach chorych największy odsetek stanowili pacjenci po 60. roku życia. W tej grupie wiekowej obserwuje się też znaczący wzrost zachorowań na cukrzycę typu 2 (Wierusz-Wysocka, 2001). Według najnowszych badań aż 13,5% populacji stanowią ludzie po 65. roku życia. Dane epidemiologiczne wskazują, iż w Polsce przewidywany jest dalszy wzrost liczby osób w wieku starszym (Koczorowski, 2009). Wraz z wiekiem w strukturach układu stomatognatycznego dochodzi do przewagi procesów katabolicznych nad anabolicznymi, i w efekcie do postępującego zaniku kostnego podłoża protetycznego, głównie wyrostka zębodołowego trzonu żuchwy oraz wyrostka zębodołowego szczęki. Wykazano, że istnieje korelacja między czasem trwania cukrzycy a stopniem utraty kości wyrostka zębodołowego (Felton, 2009; Cleary i Hutton, 1995). Prowadzi to do wzrostu liczby bezzębnych osób w populacji chorych na cukrzycę typu 2.

Przeprowadzona w badaniach własnych analiza porównawcza obrazu klinicznego stomatopatii wykazała, iż u chorych na cukrzycę najczęściej stwierdza się II typ schorzenia, który występował jako silny rumień zapalny, ze skłonnością do krwawień oraz z obrzękiem błony śluzowej. Zmiany obserwowano w obrębie błony śluzowej szczęki, pokrytej płytą protezy. Należy podkreślić, iż ten typ zapalenia występował najczęściej u chorych użytkujących protezy bez przerwy nocnej, towarzyszyły mu objawy podmiotowe, wśród których najczęściej zgłaszano pieczenie błony śluzowej jamy ustnej. U pacjentów grupy kontrolnej najczęściej obserwowano typ I stomatopatii. Ten typ schorzenia u chorych na cukrzycę występował w postaci bardziej zaawansowanej, tj. widoczne były plamiste rumieniowe pola, obejmujące swym zasięgiem błonę śluzową całego podłoża protetycznego. Nie obserwowano znaczącej różnicy w częstości występowania typu III stomatopatii w obu badanych grupach. Typ III stanowi najczęściej zapalenie o charakterze przewlekłym, przyczynowo związane z przedłużającym się w czasie, traumatyzującym oddziaływaniem nieprawidłowo wykonanego odciążenia na powierzchni dośluzowej protezy. Powstają zmiany o charakterze przerostowym, zlokalizowane na błonie śluzowej podłoża protetycznego w okolicy wału podniebiennego i w jego bezpośrednim sąsiedztwie (Infante-Cossio i wsp., 2007; Piotrowski, 2005). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, iż u chorych w obu grupach zmianom tym najczęściej nie towarzyszyły objawy subiektywne zgłaszane przez pacjenta.

Występowanie zmian niedokrwiennych w obrębie błony śluzowej z następowym niedotlenieniem tkanek sprzyjać może nasileniu objawów klinicznych stanu zapalnego w przebiegu stomatopatii protetycznych u chorych na cukrzycę. Przewlekłe powikłania cukrzycy dotyczą bowiem wszystkich tkanek i narządów, w tym również naczyń błony śluzowej podłoża protetycznego, co czyni ją bardziej podatną na działanie urazowego czynnika mechanicznego ze strony protezy, prowadząc do krwawień i przyczyniając się do utrudnienia w gojeniu powstałych uszkodzeń (Banach, 2009; Guggenheimer i wsp., 2000a). Opisano, iż w naczyniach skóry i błon śluzowych w przebiegu cukrzycy można stwierdzić zmiany polegające na odkładaniu się w błonie podstawnej substancji glikoproteinowych oraz na rozplemie śródbłonek określanymi jako *microangiopathia diabetorum* (Janket, 2008; Vitkov i wsp., 2003).

Stomatopatie protetyczne często przebiegają bez objawów podmiotowych (Budtz-Jørgensen, 1977; Dorocka-Bobkowska i wsp., 2010; Shulman i wsp. 2005). Wyniki niniejszej pracy wskazują na znacząco częstsze występowanie objawów podmiotowych stomatopatii u chorych na cukrzycę. Wśród skarg, zgłaszanych przez chorych, głównym objawem było pieczenie błony śluzowej jamy ustnej. U chorych na cukrzycę dolegliwość ta występowała cały czas, bez przerw i remisji, osiągając największe nasilenie wieczorem. Uzyskane wyniki wskazują również, iż w obu badanych grupach dolegliwość ta była obserwowana znacząco częściej w grupie chorych użytkujących protezy bez przerwy nocnej. Podobny objaw pieczenia błony śluzowej jamy ustnej chorzy mogą zgłaszać w przebiegu zespołu pieczenia jamy ustnej (BMS, *burning mouth syndrome*), którego występowanie nie jest związane ze stanem patologicznym błony śluzowej. Stwierdzono, iż schorzenie to jest częstym powikłaniem u chorych na cukrzycę typu 2 (Moore, 2007; Scala i wsp., 2003). Obecnie uważa się, że BMS jest odmianą neuropatii czuciowej włókien nerwu trójdzielnego i jego powstawanie wiąże się z zaburzeniami w odbieraniu i analizowaniu informacji czuciowych na różnych poziomach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego (Budrewicz i wsp., 2006; Mendak, 2008). Według najnowszych doniesień u chorych z BMS dochodzi do dysfunkcji układu nigrostriatalnego i w konsekwencji do obniżenia poziomu synaptycznej dopaminy (Budrewicz i wsp., 2006). Cechą różnicującą opisane powyżej stany chorobowe jest fakt, iż usunięcie protezy z jamy ustnej przynosi choremu zdecydowaną ulgę, podczas gdy w przebiegu BMS objaw pieczenia błony śluzowej jest odczuwany w sposób ciągły i jest bardziej nasilony.

Wyniki badań własnych wskazują, że chorzy na cukrzycę częściej niż osoby w grupie kontrolnej zgłaszają uczucie suchości błony śluzowej jamy ustnej, co może wynikać z faktu istnienia choroby podstawowej. Udowodniono, że w gruczołach ślinowych w miarę postępujących procesów starzenia organizmu, dochodzi do zmian wstecznych o charakterze zwłóknienia, którym towarzyszy spadek wydzielania śliny, zarówno stymulowanej jak i niestymulowanej (Collin i wsp., 2000; Madejczyk i Bachanek, 2001; Pires i wsp., 2002). Naturalną implikacją tego stanu jest także obniżenie wydzielania sekrecyjnych immunoglobulin. Osłabienie funkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych wraz ze zmniejszeniem ilości wydzielanej śliny oraz obniżenie poziomu białek ukła-

du odpornościowego, obserwowane u pacjentów w wieku starszym, stanowiącą jedną z najistotniejszych przyczyn zwiększonej zapadalności tych chorych na kandydozę jamy ustnej oraz stomatopatie protetyczne powikłane infekcją grzybiczą (Bachrach i wsp., 2008; Nagler i Hershkovich, 2005). Sugeruje się, że spośród organicznych składników śliny, uczestniczących w procesach obronnych, sIgA pełni główną rolę (Eliasson i wsp., 2006; Tanida i wsp. 2001). Wykazano ujemną korelację między wiekiem badanych a poziomem sIgA w ślinie stymulowanej (Dorocka-Bobkowska i wsp., 2009; Tanida i wsp., 2001). San Millán i wsp. (2000) donoszą, że sIgA, poprzez blokowanie adhezyn na powierzchni wypustek filamentacyjnych grzybów, obniża ich zdolność adhezji, nie hamuje ona jednak procesu filamentacji *C. albicans*. Wilson i wsp. (2007) obserwowali obniżenie stężenia sIgA w wydzielinie podniebiennych gruczołów śluzowych u chorych z II typem stomatopatii. Inni autorzy obserwowali dodatnią korelację między poziomem sIgA a stomatopatią protetyczną (Dorocka-Bobkowska i wsp., 2009) oraz między poziomem sIgA oraz liczbą kolonii *C. albicans* w próbkach śliny u chorych z zakażeniem grzybiczym jamy ustnej. Podwyższenie miana przeciwciał u tych chorych dotyczyło głównie izotypu sIgA1. Po przeprowadzeniu terapii przeciwgrzybiczej dochodziło do spadku poziomu przeciwciał klasy sIgA1 (Jeganathan i wsp., 1987).

Zmniejszone wydzielanie śliny oraz zmiany w jej składzie u tych chorych mogą również przyczyniać się do zwiększonej podatności na zakażenia grzybicze oraz utrudniać gojenie zmian zapalnych na błonie śluzowej jamy ustnej powstałych w trakcie użytkowania protez płytowych (Gasparoto i wsp., 2011; Guggenheimer i wsp., 2000b; Hibino i wsp., 2009; Pedersen, 2004). Rola śliny w rozwoju infekcji grzybiczej została potwierdzona również w licznych badaniach *in vivo*. Wykazano, iż w przebiegu grzybicy doświadczalnej u szczurów, wywołanie kserostomii za pomocą środków farmakologicznych lub drogą chirurgicznego usunięcia gruczołów ślinowych zdecydowanie nasila objawy choroby (Jorge i wsp., 1993).

Zaburzenia smaku były stosunkowo rzadko obserwowanym objawem stomatopatii w obu badanych grupach. Stwierdzono, iż cukrzyca, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, stany zapalne jamy ustnej w sposób istotny wpływają na odczuwanie smaku w jamie ustnej. Zaburzenia w odczuwaniu bodźców smakowych dotyczą zarówno zaburzeń jakościowych, jak i ilościowych (Glazar



i wsp., 2010). Pomimo, iż płytkowe uzupełnienia protetyczne nie pokrywają obszarów receptorowych smaku, to jednak mogą wpływać na osłabienie jego czucia. W przypadku protezy całkowitej może dochodzić do upośledzenia działania receptorów odczuwania ciepła, zimna i dotyku, zlokalizowanych w okolicy podniebienia twardego (Kasperski i wsp., 2010)

Do obrazu klinicznego stomatopatii protetycznej dołączają się często objawy towarzyszące. U chorych na cukrzycę obserwowano częściej zapalenie kątów ust i języka, świadczące o rozprzestrzenianiu się procesu chorobowego. U chorych w wieku podeszłym zwiotczenie mięśni i maceracja kącików ust przez ślinę dodatkowo sprzyjają stanom zapalnym tej okolicy. Obserwacje te potwierdzają inni autorzy (Carrington i wsp., 2001; Hoshi i wsp., 2011; Lu, 2007; Madejczyk i Bachanek, 2001).

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują, że u chorych, użytkujących uzupełnienia protetyczne bez przerwy nocnej, najczęściej stwierdzano stomatopatie protetyczne typu II. Ten typ schorzenia również był najczęściej obserwowany u chorych ze złą higieną protez. Ponadto znacząco częściej u tych chorych obserwowano obecność objawów podmiotowych stomatopatii. Liczne badania wykazały, iż proteza akrylowa jest bogatym i najbardziej stałym rezerwuarem drobnoustrojów, które gromadzą się na jej powierzchni dośluzowej w formie płytki protez (*denture plaque*) (Holmes i wsp., 2002; Nikawa i wsp., 2005). Protezy całkowite jako protezy osiadające wywierają dodatkowo działanie traumatyzujące na błonę śluzową podłoża protetycznego, stąd duże znaczenie ma poprawność wykonania protez ruchomych, w szczególności gładkość powierzchni dośluzowej oraz poprawne wyrównanie powierzchni okluzyjnej (Hędzelek, 1994; Emami i wsp., 2008).

Badania wielu autorów wskazują, iż użytkowanie protez z przerwą nocną, w połączeniu z ich prawidłową higieną, może znacząco zredukować częstość występowania stomatopatii protetycznych, stanowiąc najbardziej efektywną metodę profilaktyki tego schorzenia (Budtz-Jørgensen i wsp., 2000; Shulman i wsp., 2005; Webb i wsp., 1999). Ponadto wykazano, iż przechowywanie protez w środowisku suchym przez okres 8 godzin w ciągu doby zmniejsza ilość kolonii grzybów na powierzchni protezy. Usuwanie protez z jamy ustnej w porze nocnej znacząco redukuje częstość zmian zapalnych błony śluzowej, zaś w kombinacji ze stymulacją tkanek podłoża protetycznego poprzez szczotkowa-

nie, może nawet je wyeliminować (Budtz-Jørgensen i wsp., 2000; Ewren i wsp., 2011; Stafford i wsp., 1986). Wśród zabiegów higienicznych w profilaktyce i leczeniu stomatopatii największe znaczenie ma mechaniczne usuwanie płytki protez, który to zabieg powinien być prowadzony systematycznie i dokładnie (Jose i wsp., 2010; 2000, Muzyka, 2005; Spiechowicz i wsp., 1995a). Wielu autorów zaleca jednocześnie dezynfekcję protez za pomocą różnego rodzaju antyseptyków (0,2% roztwór chlorheksydyny, 0,5% roztwór podchlorynu sodu), w których protezy powinny być zanurzane na okres kilku godzin. Ten sposób postępowania zaleca się pacjentom, którzy są szczególnie predysponowani do infekcji grzybiczych oraz jako uzupełnienie terapii stomatopatii za pomocą środków antymikotycznych (Barnabé i wsp., 2004; Srinivasan i wsp., 2010; Webb i wsp., 2005).

Liczne badania wskazują na istotną zależność pomiędzy parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy a rozwojem przewlekłych powikłań o charakterze mikroangiopatii i makroangiopatii (Piłaciński i wsp., 2005; Stolar, 2010; Zozulińska, 2001). Wykazano, iż ścisła kontrola glikemii w cukrzycy zmniejsza ryzyko rozwoju jej powikłań, redukcja HbA1c o 1% zmniejsza zagrożenie wystąpienia mikroangiopatii aż o 37%. Częstość powikłań w cukrzycy zaczyna narastać, gdy HbA1c przekracza wartość 6,5% (Sieradzki i wsp., 2008; Saydah i wsp., 2004). Pomiar odsetka HbA1c wykorzystuje się jako najważniejszy parametr wyrównania glikemii, choć warto pamiętać o jego niedoskonałościach. Wartości stężeń HbA1c uzależnione są przede wszystkim od poziomu glikemii na czczo. Implikacją tego jest fakt, iż w przypadku niestabilnych stężeń glukozy, podlegających znacznym wahaniom dobowym, odsetek HbA1c może nie odzwierciedlać stanów znacznej hiperglikemii poposiłkowej, a także epizodów hipoglikemii (Kilpatrick, 2008). Wynika to z faktu, iż tworzenie HbA1c przebiega dwuetapowo, przy czym pierwsza z zachodzących reakcji ma charakter odwracalny, a ilość powstałego produktu, jakim jest aldymina, zależy ściśle od czasu trwania hiperglikemii. Reakcja wytwarzania aldyminy przebiega powoli, reakcja w kierunku odwrotnym przebiega znacznie szybciej, aldymina jest więc labilnym produktem procesu glikacji. Dopiero kolejna reakcja, zwana przekształceniem Amadori, jest nieodwracalnym i szybko przebiegającym procesem, który prowadzi do powstawania właściwego produktu, stabilnej ketoaminy – HbA1c (wg Dworacka, 2006). Dlatego też epizody ostrej,

krótkotrwałej hiperglikemii, najczęściej poposiłkowej, nie są rejestrowane poprzez zmiany odsetka HbA1c. Pomimo tych ograniczeń HbA1c pozostaje klinicznym jak i epidemiologicznym parametrem wyrównania glikemii u chorych na cukrzycę (Nakagami i wsp., 2010; Saudek i wsp., 2008).

Średni odsetek HbA1c u badanych chorych wynosił  $8,6 \pm 1,9\%$ , a średnia wartość glikemii na czczo –  $9,8 \pm 2,6$  mmol/l. U 26,5% chorych na cukrzycę poziom HbA1c był niższy od 7%. Wskazuje to na fakt, że u większości chorych nie osiągnięto zadowalającego stanu wyrównania glikemii. Wyniki badań innych autorów również wskazują, że u większości chorych na cukrzycę typu 2 nie osiąga się zalecanych kryteriów wyrównania metabolicznego. Nawet w krajach wysoko rozwiniętych, takich jak Szwecja, średnie stężenie HbA1c wynosi 7,2%, a więc powyżej wartości zalecanej przez zdecydowaną większość naukowych towarzystw diabetologicznych (Sieradzki i wsp., 2008). Wykazano, że w Polsce wśród chorych na cukrzycę typu 2, trwającą co najmniej 5 lat średnia wartość HbA1c wynosi 7,7% (Sieradzki i wsp., 2008).

Mimo wprowadzanych nowych leków i modeli terapeutycznych trendy są niekorzystne i odsetek chorych z niewyrównaną cukrzycą wciąż wzrasta (Chan i wsp., 2009). Analiza Szymborskiej-Kajaneck i wsp. (2009) przeprowadzona w Polsce u 5812 chorych na cukrzycę typu 2, wykazała niedostateczną kontrolę glikemii, profilu lipidowego i ciśnienia tętniczego u badanych. Autorzy podkreślają również fakt, że u chorych na cukrzycę typu 2, niezależnie od rodzaju terapii hipoglikemizującej, w miarę upływu czasu trwania choroby, dochodzi do sukcesywnego pogarszania kontroli glikemii.

Wyniki badań własnych wskazują, iż zarówno odsetek HbA1c jak i poziom glikemii na czczo osiągały najwyższą wartość w grupie chorych z typem II stomatopatii. Powyższe wykładniki były znacząco niższe u chorych z typem I i III. Ponadto stwierdzono, że wartości obu powyższych wskaźników wyrównania glikemii były znacząco wyższe w grupie chorych zgłaszających objawy podmiotowe stomatopatii, w tym najczęściej uczucie pieczenia błony śluzowej jamy ustnej. Pomimo trendu, obowiązującego w medycynie, stosowania zasad opartych na faktach (EBM, *evidence-based medicine*), nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie doniesień opisujących w jakim stopniu poszczególne parametry wyrównania metabolicznego cukrzyca hamują progresję czy też zapobiegają powstawaniu schorzeń błony śluzowej jamy ustnej u chorych leczonych prote-

tycznie. Wykazano natomiast związek między niewyrównaną cukrzycą typu 2 a występowaniem zmian zapalnych w przyzębiu o charakterze *gingivitis* i *periodontitis* (Górska, 2009; Chen i wsp., 2010). Ponadto stwierdzono korelację między czasem trwania cukrzycy a zaawansowaniem choroby przyzębia oraz stopniem utraty kości wyrostka zębodołowego (Banach, 2009; Frączak i wsp., 2002; Madejczyk i Bachanek, 2001).

W obecnej pracy pozytywny wynik badania mikologicznego uzyskano u wszystkich badanych na cukrzycę, stwierdzając iż stomatopatie protetyczne u tych chorych są częściej powikłane zakażeniem grzybiczym w porównaniu z grupą kontrolną. We wcześniej przeprowadzonych badaniach własnych wykazano znaczący w warunkach *in vitro* wzrost adhezji grzybów *C. albicans* do nabłonka błony śluzowej u chorych na cukrzycę typu 2 (Dorocka-Bobkowska i wsp., 1996). Stwierdzono dominację grzybów gatunku *C. albicans*, w dalszej kolejności izolowano grzyby NAC (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* oraz *C. dubliniensis*). Dane te zgodne są z doniesieniami innych autorów, które wskazują na wzrost znaczenia w stomatopatiach protetycznych gatunków NAC; w tym najczęściej stwierdza się zakażenia wywołane przez *C. glabrata* (Dorocka-Bobkowska i Konopka, 2007; Gasparoto i wsp., 2009; Li i wsp., 2007; Ruhnke, 2006). Warto podkreślić fakt, iż w ostatnich latach, od chorych ze stomatopatią powikłaną zakażeniem grzybiczym, częściej izoluje się grzyby *C. dubliniensis* (Meurman i wsp., 2010; Zomorodian i wsp., 2011).

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują, iż u chorych na cukrzycę częściej obserwowano występowanie formy mycelialnej *C. albicans*. U chorych tych stwierdzono wyższy poziom HbA1c oraz glikemii na czczo w porównaniu z grupą chorych, u których występowała wyłącznie forma Y. Ponadto zaobserwowano, że u chorych z wysokim poziomem HbA1c oraz glikemii na czczo występował obfity lub i zlewny charakter wzrostu grzybów *Candida*. Forma mycelialna grzybów uznawana jest za bardziej patogenną ze względu na większą powierzchnię przylegania, wyższą zdolność adhezji i penetracji do komórek nabłonka (Emami i wsp., 2007; Biswas i wsp., 2007; Whiteway i Bachewich, 2007). Nie ma zgodności wśród badaczy na temat wpływu zjawiska filamentacji grzybów na występowanie objawów zapalnych błony śluzowej u chorych ze stomatopatią protetyczną, powikłaną zakażeniem grzybiczym. Zdaniem niektórych autorów, u nosicieli *C. albicans* z klinicznie zdrową błoną

śluzową drobnoustrój ten bytuje w formie Y, natomiast forma M jest formą patogenną, która dominuje w stomatopatiach protetycznych (Challacombe, 1994; Budtz-Jørgensen, 1974). Badania Emami i wsp. (2007) oraz Majewskiego (1982), nie potwierdzają zależności między występowaniem stomatopatii a zdolnością filamentacji *C. albicans*. Badacze ci nie wykazali istnienia formy mycelialnej nawet w przypadkach stomatopatii o silnie zaznaczonych objawach klinicznych. Natomiast Arendorf i Walker (1980) wykryli zarówno formę drożdżową, jak i mycelialną u trzech zdrowych nosicieli gatunku *C. albicans*, poddając w wątpliwość, czy transformacja formy Y w formę M może być rzeczywistym wskaźnikiem infekcji. Spiechowicz i wsp. (1994a) obserwowali nasilenie zjawiska filamentacji grzybów w przypadkach stomatopatii o silniej zaznaczonych objawach klinicznych (klasa II i III wg Newtona). Ta hipoteza znajduje swoje uzasadnienie w wynikach doświadczeń przeprowadzonych przez Ramage i wsp. (2002b), którzy badali, czy tworzenie mycelium przez *C. albicans* ma wpływ na powstawanie struktury biofilmu. Autorzy wykazali, że szczepy *C. albicans* pozbawione genów odpowiedzialnych za proces filamentacji ( $\Delta efg1$  i  $\Delta cph1/\Delta efg1$ ) nie syntetyzują białka EFG1 i nie są zdolne do utworzenia złożonej struktury biofilmu, tworząc jedynie warstwę luźno ułożonych, wydłużonych komórek. Baillie i Douglas (1999) na podstawie badań mikroskopowych stwierdzili, że jedynie szczepy dimorficzne *C. albicans* wytwarzają biofilm złożony z dwóch warstw – podstawowej, zawierającej głównie blastosporę i warstwy zewnętrznej, zawierającej strzępki lub pseudostrzępki. Wyniki powyższych badań sugerują zatem, że tworzenie wypustek filamentacyjnych przez blastosporę *C. albicans*, umożliwiające tworzenie mycelium, jest warunkiem powstawania struktury dojrzałego biofilmu. Obserwowane w badaniach własnych nasilenie procesu filamentacji grzybów u chorych na cukrzycę może wynikać z faktu osłabienia mechanizmów obronnych ustroju w przebiegu cukrzycy i ujawnienia cech patogennych *C. albicans*, który należy do drobnoustrójów oportunistycznych. Obserwowane w cukrzycy zaburzenia metaboliczne prowadzą bowiem do upośledzenia nieswoistych jak i swoistych mechanizmów obrony, zarówno komórkowej jak i humoralnej (Zozulińska i Wierusz Wysocka, 2004a). Badania ostatnich lat dowiodły, iż komórki *C. albicans* posiadają unikalną strukturę, która w warunkach hiperglikemii wzmacnia zjadliwość tych szczepów. Wykazano, że na powierzchni komórki *C. albicans* znajdują się anty-

geny białkowe podobne do receptorów  $C_3$  dopełniacza, znajdujących się na fagocytach ssaków. W środowisku hiperglikemicznym dochodzi do 4–6-krotnego wzrostu ekspresji tych białek (Fidel, 2002; Leigh i wsp., 2002).

Nieodłącznym elementem reakcji zapalnej jest nasilenie produkcji białek ostrej fazy. Wiadomo dotychczas, że hiperglikemia indukuje szereg procesów biochemicznych, prowadzących do uszkodzenia śródbłonna, aktywacji komórek zapalnych, uwolnienia aktywnych rodników tlenowych, proteaz i cytokin (Janket i wsp., 2008; Zozulińska, 2001; Zozulińska i Wierusz-Wysocka, 2004b). Efektem działania cytokin jest między innymi produkcja białek ostrej fazy. U chorych na cukrzycę typu 2 obserwuje się wzrost stężenia CRP w surowicy krwi, najwyższe wartości CRP występują u chorych z długim wywiadem choroby i obecnością przewlekłych powikłań (Lund i wsp., 2009; Pisarczyk-Wiza i wsp., 2002; Skowronski i wsp., 2005; Tan i wsp., 2004). W grupie chorych na cukrzycę typu 1 było to jedyne białko ostrej fazy, którego stężenie w surowicy wzrastało, nie obserwowano wzrostu stężenia innych białek ostrej fazy, takich jak kwaśna  $\alpha 1$  glikoproteina i  $\alpha 1$  antychymotrypsyna, ceruloplazmina i  $\alpha 2$  makroglobulina (Zozulińska, 2001). Kilpatrick i wsp. (2000) wykazali, że czynnikami determinującymi podwyższenie stężenia CRP u chorych na cukrzycę są wiek, płeć żeńska, wskaźnik masy ciała oraz wartość HbA1c. Wyniki badań własnych wskazują na istotną dodatnią korelację między stężeniem CRP a wartościami HbA1c w grupie chorych na cukrzycę typu 2, co potwierdza wcześniejsze badania innych autorów (Fukuhara i wsp., 2007; King i wsp., 2003). Związek CRP z metabolizmem glukozy potwierdza również zaobserwowana dodatnia korelacja tego białka ostrej fazy z wartością glikemii na czczo. W warunkach hiperglikemii dochodzi do nasilenia nieenzymatycznej glikozylacji białek, zarówno błonowych jak i wydzielniczych, stąd odsetek HbA1c oraz glikozylacja innych protein w błonach podstawnych komórek w przebiegu cukrzycy są również podwyższone (Wu i wsp., 2002; Zozulińska i Wierusz-Wysocka, 2005). W konsekwencji prowadzi to do powstania końcowych produktów glikozylacji białek (AGEs, *advanced glycation end products*) (Janket i wsp., 2008; Tan i wsp., 2004). W regulacji syntezy jak i glikozylacji tych białek uczestniczą cytokiny, a ich wzajemne relacje określa się mianem sieci cytokinowej. Udowodniony został wpływ IL-6, transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  i  $TNF\alpha$  na syntezę



i glikozylację CRP oraz innych białek ostrej fazy (Naruszewicz, 2009; Piłaciński i wsp., 2005; Tan i wsp., 2004; Zozulińska i Wierusz-Wysocka, 2004b).

W badaniach własnych wykazano podwyższenie poziomu CRP u chorych ze stomatopatią powikłaną infekcją grzybiczą. Wartości CRP kształtowały się odmiennie w grupach pacjentów z różnym typem stomatopatii; najwyższe wartości obserwowano dla typu II schorzenia. Mierzwińska-Nastalska i wsp. (2006) wykazali, że u chorych ze stomatopatią dochodzi do podwyższenia poziomu innego markera ostrej fazy,  $\alpha$ -1 antyantytrypsyny (AAT); najwyższy poziom AAT odnotowano również w surowicy krwi chorych z typem II stomatopatii protekcyjnej, powikłanej zakażeniem grzybiczym.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki nie wykazały istotnych różnic w lekowrażliwości szczepów grzybów izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych w obu badanych grupach. Obserwacje te są zgodne z badaniami Manfredi i wsp. (2006) oraz Meuramn i wsp. (2010). Odnotowano wysoką wrażliwość *in vitro* izolowanych grzybów *Candida* na badane leki przeciwgrzybicze. Najbardziej skuteczne okazały się amfoterycyna B, flucytozyna oraz nystatyna, co potwierdzają badania Meurman i wsp. (2010). Analiza wrażliwości grzybów *Candida* u chorych na cukrzycę typu 1 oraz 2 wykazała najwyższą skuteczność amfoterycyny B i flucytozyny, nie stwierdzano szczepów opornych na powyższe leki (Bremenkamp i wsp., 2010). W badaniach innych autorów antybiotyki polienowe również wykazywały wysoką skuteczność *in vitro* (Batura-Gabriel i wsp., 2001). Pięcioletnia obserwacja lekowrażliwości szczepów grzybów *C. albicans*, izolowanych z ontocenozy jamy ustnej chorych ze schorzeniem nowotworowym, wykazała jednak narastanie oporności *C. albicans* na amfoterycynę B z 23,1% do 31,9%, natomiast dla szczepów NAC oporność na ten lek spadła z 39,6% do 20% (Łukaszuk i wsp., 2000). W badaniach klinicznych wykazano skuteczność amfoterycyny B stosowanej miejscowo w postaci tabletek do ssania oraz kremu na powierzchnię protezy przez okres 4 tygodni w leczeniu stomatopatii protetycznych, powikłanych infekcją grzybiczą (Bissel i wsp., 1993). Amfoterycyna B oraz nystatyna hamują adhezję *in vitro* grzybów *Candida* do powierzchni akrylu (Egusa i wsp., 2010) oraz nabłonka bony śluzowej policzka i komórek *HeLa* (Ellepola i wsp., 1998, Dorocka-Bobkowska i wsp., 2010). Wykazano również, że amfoterycyna B hamuje transformację mycelialną *C. albicans* w stężeniu odpowiadającym wartości MIC lub niższym (Hawser

i wsp., 1996). W niniejszej pracy aktywność *in vitro* flucytozyny była wysoka, zarówno w odniesieniu do szczepów *C. albicans*, jak i NAC, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (Bremenkamp i wsp., 2010; Meuramn i wsp., 2010). Ostatnio obserwuje się wzrastającą oporność *C. glabrata*, zarówno na flucytozynę jak i pochodne azolowe (Edlind i Katiyar, 2010; Konopka i wsp., 2010). Mimo częstego i wieloletniego stosowania nystatyny, lek ten okazuje się skuteczny zarówno w leczeniu, jak i w profilaktyce zakażeń grzybiczych. Nystatyna jest lekiem powszechnie stosowanym w leczeniu stomatopatii powikłanej zakażeniem grzybiczym (Budtz-Jørgensen i Lombardi, 2000; Ellepola i Samaranyake, 2000). Według własnych obserwacji klinicznych, prowadzonych u chorych ze stomatopatią, lek ten jest również skuteczny w warunkach *in vivo*, pod warunkiem prawidłowego stosowania.

W ostatnich latach wielu autorów obserwuje wzrost oporności grzybów na azolowe leki przeciwgrzybicze (Lamfon i wsp., 2005; Pinto i wsp., 2008). Przeprowadzone przez autorkę badania wykazały wyższą oporność szczepów NAC na pochodne azolowe w porównaniu z amfoterycyną B, flucytozyną i nystatyną. Dla szczepów *C. albicans* również stwierdzono niższą aktywność *in vitro* pochodnych azolowych w porównaniu z aktywnością antybiotyków polienowych i flucytozyny. W grupie pochodnych azolowych najbardziej skutecznym lekiem *in vitro* wobec grzybów z rodzaju *Candida* był mikonazol, co jest zgodne z badaniami innych autorów (Isham i Ghannoum, 2010; Szponar i wsp., 2005). Stwierdzono, iż mikonazol wykazuje wysoką skuteczność w leczeniu infekcji miejscowych, przy jednoczesnym braku skuteczności przy stosowaniu doustnym, co wynika z faktu, iż stymuluje on aktywność komórek wątroby, prowadząc do inaktywacji leku. Badania kliniczne potwierdziły również jego wysoką skuteczność *in vivo*, szczególnie w leczeniu grzybic miejscowych. Mikonazol należy do najczęściej stosowanych antymikotyków u chorych ze stomatopatią (Martínez-Beneyto i wsp., 2010). Podstawowy mechanizm działania mikonazolu polega na hamowaniu biosyntezy ergosterolu, który jest podstawowym składnikiem błony komórkowej grzybów. Łącząc się z cytochromem P-450 mikonazol selektywnie hamuje proces demetylacji lanosterolu, co w konsekwencji prowadzi do kumulacji lanosterolu w błonie komórkowej grzyba, zaburzeń jej funkcjonowania i rozpadu komórki. Opracowano wiele postaci mikonazolu do stosowania miejscowego. Stał się on lekiem z wyboru w leczeniu stomatopa-



tii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym. Może być stosowany zarówno w postaci żelu lub lakieru, aplikowanego na powierzchnię dośluzową płyty protezy, oraz jako lek dodawany do materiałów służących do podścielenia protez (Budtz-Jørgensen i Carlino, 1994; Ellepola i Samaranyake, 2000; Khozeimeh i wsp., 2010). Wykazano, że mikonazol w formie żelu dodany do preparatu Visco-gel, jednego z powszechnie stosowanych materiałów do biologicznej odnowy tkanek, utrzymuje swoją aktywność przeciwgrzybiczą i jest z powodzeniem stosowany w leczeniu stomatopatii z towarzyszącą infekcją grzybiczą (Radnai i wsp., 2010). Podobne obserwacje poczynili inni autorzy wobec nystatyny, natamycyny i klotrimazolu (Niesłuchowska, 1986) oraz itraconazolu (Chow i wsp., 1999).

Oporność drobnoustroju uznaje się za częstą przyczynę obserwowanego często niepowodzenia w leczeniu stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybiczym. Stąd uzyskanie danych o aktywności *in vitro* leków przeciwgrzybiczych stanowić może cenną informację, która pozwoli przewidzieć skuteczność leczenia, w większości bowiem przypadków leki o dużej aktywności *in vitro* wykazują skuteczność terapeutyczną w warunkach *in vivo*. Warto podkreślić, że sukces kliniczny prowadzonej terapii stomatopatii protetycznej z towarzyszącą infekcją grzybiczą jest uwarunkowany złożonym procesem interakcji między czynnikiem patogennym a gospodarzem. Parametrem możliwym do oznaczenia w codziennej praktyce jest określenie wrażliwości *in vitro* izolowanego od chorego drobnoustroju, co umożliwi wybór skutecznego leku i zapobiega rozprzestrzenianiu się szczepów opornych.

Trudny i niepoznany do końca jest problem korelacji skuteczności leku w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Jedną z przyczyn wyjaśniających oporność szczepu na zastosowany lek w terapii przeciwgrzybiczej może być fakt, że w przebiegu przewlekłych zakażeń grzybiczych komórki grzybów zasiedlają organizm gospodarza w postaci wysoce zorganizowanych struktur biofilmu. Szczególnie obfity biofilm *Candida* powstaje na powierzchni dośluzowej płyty protezy. Wykazano ponadto, że obecność śliny ułatwia powstawanie biofilmu *Candida* na powierzchni akrylu (Samaranyake i wsp., 2009; Sun i Fang, 2002). Dowiedziono również, iż komórki grzybów tworzące struktury biofilmu charakteryzują się wyższą opornością na działanie leków przeciwgrzybiczych aniżeli komórki wolnożyjące. Stężenia leków przeciwgrzybiczych niezbędne do

eradykacji biofilmu *C. albicans* przekraczają wielokrotnie dostępne stężenia terapeutyczne (Chandra i wsp., 2005; Li i wsp., 2010).

Wyniki badań własnych wskazują na zwiększoną oporność na mikonazol badanych szczepów grzybów *Candida*, rosnących w populacji biofilmu na powierzchni PMMA. Przy wyborze powyższego leku do badań, kierowano się jego szerokim zastosowaniem klinicznym oraz wysoką skutecznością w leczeniu stomatopatii protetycznej z towarzyszącą infekcją *Candida*, potwierdzoną w badaniach innych autorów (Budtz-Jørgensen i Carlino, 1994; Ellepola i Samaranyake, 2000; Radnai i wsp., 2010). Posługując się metodą kolorymetryczną XTT w niniejszej pracy wykazano, iż stężenia mikonazolu powodujące 50% RMA komórek tworzących strukturę biofilmu są znacznie wyższe w porównaniu z wartością MIC dla badanego leku. Stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem mikonazolu powodującym 50% RMA i wartością MIC. Najwyższą oporność biofilmu obserwowano dla szczepu *C. parapsilosis*, stężenie mikonazolu potrzebne do uzyskania 50% RMA komórek tworzących biofilm przekraczało wartość 96 µg/ml. Wykazano, że stężenia leków wymagane do redukcji aktywności metabolicznej komórek grzybów o 50% były o 5–8 razy wyższe dla komórek w strukturze biofilmu aniżeli dla organizmów wolnożyjących (Michowska-Polanowska i wsp., 2009b). Dojrzały biofilm *Candida* ma heterogenną strukturę, w której mikrokolonie komórek grzybów o określonej aktywności metabolicznej otoczone są cząsteczkami polisachrydowej substancji pozakomórkowej. Wykazano, iż wraz z dojrzewaniem biofilmu wzrasta aktywność metaboliczna komórek, co wpływa na zwiększoną oporność tych drobnoustrojów na leki przeciwgrzybicze (Chandra i wsp., 2001a). We wcześniejszych obserwacjach własnych stwierdzono wysoką oporność komórek struktury biofilmu *C. albicans* oraz *C. glabrata* na flukonazol (Konopka i wsp., 2010). Do podobnych wniosków doszedł również Kuhn i wsp. (2002b), wykazując zwiększoną oporność *C. albicans* i *C. parapsilosis* rosnących w populacji biofilmu na flukonazol, nystatynę, terbinafinę, amfoterycynę B, oraz pochodne azolowe – vorikonazol i ravukonazol. Chandra i wsp. (2001b) badali korelację między stopniem dojrzałości biofilmu *C. albicans* a wartością MIC w odniesieniu do amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu i chlorheksydy. W fazie początkowej wartości MIC są niskie, wraz z dojrzewaniem biofilmu wartości te wzrastają, a w strukturze dojrzałego biofilmu komórki *C. albicans* wykazują oporność na badane leki.

Proces dojrzewania drobnoustrojów w strukturze biofilmu polega na indukcji lub supresji specyficznych genów oraz zmianie cech fenotypowych komórek osiadłych w cechy charakterystyczne dla komórek populacji dojrzalego biofilmu. Badania przeprowadzone nad strukturą biofilmu *Candida* z zastosowaniem skaningowej mikroskopii konfokalnej wykazały, że struktura biofilmu na powierzchni biomateriałów zależna jest od gatunku grzybów drożdżopodobnych go tworzących (Nett i wsp., 2010; Ramage i wsp., 2009). Kuhn i wsp. (2002a) porównali zdolność tworzenia biofilmu przez różne gatunki grzybów rodzaju *Candida*. Posługując się testem pomiaru suchej masy biofilmu oraz badaniami mikroskopowymi, wykazano, że grzyby gatunku *C. albicans* tworzą biofilm o większej masie w porównaniu z grzybami gatunku *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Aktywność metaboliczna biofilmu *C. albicans* jest znacznie wyższa aniżeli aktywność biofilmu utworzonego przez gatunki *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. pseudotropicalis* (Hawser i Douglas, 1994). Również struktura biofilmu grzybów NAC jest odmienna. Tworzy go pojedyncza warstwa komórek, zawierająca nieregularne skupiska blastospor, zawieszonych w niewielkiej ilości macierzy zewnątrzkomórkowej (Kuhn i wsp., 2002a). Badania biofilmu *C. dubliniensis* na powierzchniach akrylu i polistyrenu wykazały, że struktura tego biofilmu jest podobna do struktury biofilmu *C. albicans* (Ramage, 2001).

Ramage i wsp. (2002) badali molekularne mechanizmy oporności komórek planktonalnych *C. albicans* na pochodne azolowe. Oporność grzybów na leki z tej grupy jest związana między innymi z obecnością aktywnych białek, posiadających właściwości pompy (ang. *drug efflux pumps*). Białka te rozpoznają różnego typu leki i usuwają je z cytoplazmy, wykorzystując energię zawartą w ATP. W przypadku komórek grzybów pompy te należą do dwóch klas: ABC (ang. *ATP-binding cassette*) oraz MFS (ang. *major facilitator superfamily*). Wykazano, że mutanty *C. albicans*, niezawierające genów odpowiedzialnych za proces aktywnego usuwania leków z komórki ( $\Delta cdr1$ ,  $\Delta cdr2$ ,  $\Delta mdr1$ ,  $\Delta cdr1/\Delta cdr2$ ,  $\Delta mdr1/\Delta cdr1$ ), są zdolne do wytworzenia złożonej struktury biofilmu. Komórki planktonowe tych mutantów wykazują zwiększoną wrażliwość na flukonazol, natomiast w strukturze biofilmu są one odporne na ten lek. Wynika z tego, iż patomechanizm oporności biofilmu *C. albicans* na pochodne azolowe jest zjawiskiem złożonym, jak również różne są mechanizmy odpowiedzialne za zjawisko oporności na leki formy planktonowej i biofilmu *C. albicans*.

Z klinicznego punktu widzenia bardzo istotnym problemem jest oporność grzybów *Candida* w populacji biofilmu na antymikotyki. Mechanizmy fizyczne oraz biologiczne, które obniżają wrażliwość drobnoustrojów w populacji biofilmu na dostępne leki przeciwgrzybicze nie zostały, jak dotąd, dostatecznie poznane. Istnieje hipoteza, iż oporność ta powstaje na skutek zmian w metabolizmie komórki grzyba w populacji biofilmu, w odpowiedzi na ograniczenie dostępu do składników odżywczych. Istotne znaczenie może mieć również fakt utrudnionej dyfuzji leku do komórek grzybów znajdujących się w strukturze biofilmu, poprzez warstwę zewnątrzkomórkowej macierzy oraz zjawisko aktywacji genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów rozkładających cząsteczki leków w osiadłych populacjach drobnoustrojów (Kumamoto, 2002; Mah i wsp., 2001). Ponadto opisane wcześniej zróżnicowanie morfologiczne grzybów oraz wytwarzanie przez *C. albicans* chlamydospor (zarodników przetrwalnikowych) może dodatkowo chronić drobnoustrój przed działaniem leku, stanowiąc jedną z przyczyn oporności drobnoustroju.

## 6. Podsumowanie

Powyższe obserwacje zasługują na podsumowanie w kontekście opieki klinicznej nad chorym. W świetle doniesień innych autorów, a także wieloletnich badań własnych, należy przyjąć, iż stomatopatie protetyczne z towarzyszącym zakażeniem *Candida* stanowią powszechną dolegliwość u chorych na cukrzycę typu 2 i charakteryzują się cięższym klinicznie przebiegiem. Wyniki obecnej pracy wskazują, że u chorych tych stwierdza się również nasilenie dolegliwości subiektywnych stomatopatii protetycznej, oraz na fakt, iż schorzenie to u chorych na cukrzycę przebiega z towarzyszącą infekcją wywołaną grzybami rodzaju *Candida*. Stąd poprawność wykonania uzupełnień protetycznych, zarówno pod względem klinicznym jak i laboratoryjnym, ma u tych chorych szczególnie istotne znaczenie. Edukacja pacjenta odnośnie właściwego użytkowania uzupełnień protetycznych, przestrzegania zasad higieny jamy ustnej i protez, oraz konieczność prowadzenia systematycznej opieki następowej, jest również istotna w aspekcie profilaktyki stomatopatii protetycznych. Szczególnie ważnym aspektem działań profilaktycznych u chorych na cukrzycę jest zalecenie użytkowania protez z przerwą nocną i utrzymywanie ich w środowisku suchym. Pozwoli to na regenerację błony śluzowej podłoża protetycznego, która jest szczególnie podatna na działanie czynnika urazowego u chorych z cukrzycą i przewlekłą suchością błony śluzowej jamy ustnej. Ponadto w przypadku stomatopatii protetycznej u chorych na cukrzycę, wskazane jest wykonanie badań mikologicznych, zmierzających do rozpoznania rodzaju i gatunku mikroorganizmu wraz z oznaczeniem jego lekowrażliwości.

Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają również sugestie o ścisłym związku pomiędzy hiperglikemią a procesem zapalnym błony śluzowej podłoża protetycznego. Wskazuje to na fakt, iż osiągnięcie optymalnych parametrów wyrównania metabolicznego u chorych na cukrzycę typu 2 może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka powikłań o charakterze stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybiczym u użytkowników protez całkowitych.

Problem stomatopatii protetycznych u chorych na cukrzycę typu 2 nie jest tematem szeroko opisywanym w literaturze polskiej i światowej. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania kliniczne, dotyczące problemu stomatopatii

protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym stanowią pierwszą tego typu analizę przeprowadzoną u chorych na cukrzycę typu 2. Uzyskane w części klinicznej wyniki, wskazujące na wzrost występowania stomatopatii protetycznej powikłanej zakażeniem grzybami z rodzaju *Candida* oraz nasilenie objawów klinicznych stomatopatii u chorych na cukrzycę typu 2, skłoniły autorkę do przeprowadzenia dalszych badań, zmierzających do oceny zależności wykładników zakażenia grzybiczego w przebiegu stomatopatii protetycznej i wybranych parametrów wyrównania metabolicznego cukrzycy typu 2. W szeroko analizowanym piśmiennictwie nie znaleziono danych opisujących tę zależność. Szeroki zakres badań mikologicznych uzupełniono badaniami nad biofilmem *Candida* z zastosowaniem modelu badawczego w warunkach *in vitro* w aspekcie oceny wrażliwości komórek grzybów z rodzaju *Candida* tworzących strukturę biofilmu na mikonazol, który jest stosowany w terapii stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym. Poszukiwanie i modyfikowanie technologii mających na celu przeciwdziałanie tworzenia biofilmu i ograniczenie jego rozwoju na powierzchni płyty protezy wydaje się zagadnieniem priorytetowym w terapii stomatopatii protetycznej u pacjentów użytkujących akrylowe protezy płytowe.

Wydaje się również uzasadnione i niezbędne prowadzenie dalszych interdyscyplinarnych badań nad problemem stomatopatii protetycznych u chorych na cukrzycę typu 2, opartych na badaniach klinicznych i mikrobiologicznych. Stworzenie i realizacja zasad wzajemnej współpracy między lekarzem diabetologiem i stomatologiem pozwoli, aby lekarz stomatolog włączył się do zintegrowanego zespołu opieki nad chorymi na cukrzycę, co przyczyni się do intensyfikacji procesu leczenia tych chorych oraz wcześniejszego rozpoznania schorzenia. Prowadzić to może do podjęcia wcześniejszej i bardziej intensywnej interwencji terapeutycznej i w efekcie do obniżenia ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy.

## 7. Wnioski

1. Stomatopatie protetyczne u chorych na cukrzycę typu 2 charakteryzują się cięższym klinicznie przebiegiem i są częściej powikłane zakażeniem grzybiczym. Stwierdza się nasilenie dolegliwości subiektywnych stomatopatii, a pieczenie błony śluzowej jamy ustnej stanowi najczęstszą skargę pacjentów.
2. Całodobowe użytkowanie protez ruchomych nasila częstość występowania objawów subiektywnych stomatopatii protetycznej oraz sprzyja występowaniu zapalenia o ostrym przebiegu.
3. Niedostateczny stan kontroli wyrównania metabolicznego u chorych na cukrzycę typu 2 prowadzi do zwiększenia ryzyka powikłań o charakterze stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym u użytkowników akrylowych protez całkowitych.
4. U chorych na cukrzycę typu 2 w przypadku stwierdzenia stomatopatii protetycznej wskazane jest wykonanie kompleksowych badań mikologicznych, zmierzających do rozpoznania rodzaju i gatunku drobnoustroju oraz oznaczenie jego wrażliwości na leki przeciwgrzybicze.
5. Wartości stężeń azotanu mikonazolu odpowiedzialne za redukcję aktywności metabolicznej grzybów *Candida* w strukturze biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu przekraczają wielokrotnie wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost tych drobnoustrojów w formie planktoidalnej.
6. Badane szczepy grzybów rodzaju *Candida* po utworzeniu struktury biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu w warunkach *in vitro* wykazują oporność na działanie azotanu mikonazolu, co może mieć istotny wpływ na skuteczność leczenia stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym.



## 8. Streszczenie

Stomatopatia protetyczna jest procesem zapalnym błony śluzowej podłoża protetycznego o różnym nasileniu i złożonej etiologii z dominującym udziałem urazu mechanicznego ze strony protezy oraz infekcji grzybiczej. Wysoka i ciągle narastająca częstotliwość występowania stomatopatii protetycznych oraz ich wieloczynnikowa etiologia czyni je problemem, zarówno w aspekcie społecznym jak i medycznym. Wobec faktu starzenia się populacji w Polsce obserwuje się rosnącą grupę chorych na cukrzycę typu 2, której często towarzyszą liczne powikłania. Cukrzyca typu 2 jest najczęstszym typem cukrzycy, stanowi 90% wszystkich przypadków zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Stomatopatie protetyczne z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym (SPIG) należą do przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2, stwierdzanych u około 58% pacjentów, użytkowników protez całkowitych.

Mimo wprowadzanych nowych leków i modeli terapeutycznych, wzrasta odsetek chorych z niewyrównaną cukrzycą. Liczne badania wskazują na istotną zależność pomiędzy parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy a rozwojem przewlekłych powikłań o charakterze mikroangiopatii i makroangiopatii. Pomiar odsetka hemoglobiny glikowanej (HbA1c) jest parametrem długoterminowego wyrównania glikemii u chorych na cukrzycę. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień wskazujących, w jakim stopniu parametry wyrównania metabolicznego cukrzycy hamują progresję czy też zapobiegają powstawaniu odległych powikłań związanych z leczeniem protetycznym u chorych na cukrzycę typu 2.

Powstawanie struktury biofilmu *Candida* na powierzchni tworzywa akrylowego płyty protezy odgrywa kluczowe znaczenie w patogenezie SPIG. Z punktu widzenia zjawiska narastającej lekooporności szczepów *Candida* na leki przeciwgrzybicze stosowane w terapii SPIG, istotna jest ocena wrażliwości komórek biofilmu wobec stosowanych leków przeciwgrzybiczych.

Uwzględniając powyższe przesłanki, przeprowadzono badania, których celem było:

1. Określenie występowania i nasilenia objawów klinicznych SPIG u chorych na cukrzycę typu 2.



2. Ocena wpływu czynników związanych z użytkowaniem uzupełnień protetycznych na powstawanie objawów stomatopatii protetycznej.
3. Analiza zależności pomiędzy parametrami wyrównania glikemii a wykładnikami zakażenia grzybiczego u chorych na cukrzycę typu 2 z objawami stomatopatii protetycznej.
4. Ocena wpływu działania azotanu mikonazolu na aktywność metaboliczną komórek grzybów rodzaju *Candida* tworzących strukturę biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu (PMMA) w warunkach *in vitro*.

Badaniami objęto 110 chorych na cukrzycę typu 2 skojarzoną z otyłością, z objawami SPIG, (63 kobiety i 47 mężczyzn), średnia wieku  $\pm$  SD:  $63,2 \pm 10,5$  (grupa I). Średni czas trwania jawnej klinicznie cukrzycy wynosił  $10,6 \pm 5,1$  lat. Grupę kontrolną (II) stanowiło 50 pacjentów (29 kobiet i 21 mężczyzn), ze stwierdzoną stomatopatią protetyczną; średnia wieku  $\pm$  SD:  $66,9 \pm 8,8$ , bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Pacjenci użytkowali akrylowe protezy całkowite szczęki i żuchwy. Przeprowadzono badanie kliniczne jamy ustnej, stwierdzając nasilenie zmian chorobowych według kryteriów klasyfikacji Newtona. Oceniano stan higieny użytkowanych uzupełnień protetycznych, stosując zmodyfikowany indeks płytki protez według Ambjörnsena. Przeprowadzono badania mikologiczne, materiałem do badań był wymaz z błony śluzowej podniebienia, który posiewano na płynne podłoże Sabourauda i stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem gentamycyny i chloramfenikolu (bioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, France). Identyfikację wyizolowanych szczepów grzybów przeprowadzono przy użyciu testu ID 32C (bioMerieux SA). Formy morfologiczne izolatów oceniano w preparacie mikroskopowym, określono intensywność wzrostu grzybów w hodowli. Wrażliwość grzybów na antymiotyki oznaczono za pomocą testu ATB Fungus (bioMerieux SA). U chorych na cukrzycę typu 2 wyrównanie glikemii określano na podstawie stężenia glukozy w osoczu krwi żyłnej na czczo, oznaczanego metodą standardową oraz odsetka HbA1c, oznaczanego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Oznaczono poziom białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi za pomocą wysoce czułej metody immunoturbidymetrycznej. Oceniono w warunkach *in vitro* wpływ działania mikonazolu (Sigma-Aldrich, Switzerland) na aktywność metaboliczną grzybów rodzaju *Candida* w strukturze biofilmu wytwarzanego na powierzchni

PMMA. W analizie wykorzystano metodę kolorymetryczną XTT, określającą aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy, enzymu będącego wskaźnikiem aktywności metabolicznej komórek grzybów.

W grupie I częściej obserwowano typ II SPIG (rozlany stan zapalny) w porównaniu z grupą kontrolną (57,3% vs 30%;  $p < 0,002$ ). Nie obserwowano znaczącej różnicy w występowaniu stomatopatii typu I i III w obu badanych grupach. Stwierdzono znacząco częstsze występowanie objawów podmiotowych stomatopatii u chorych na cukrzycę typu 2 (60,9% vs 24%;  $p < 0,001$ ). Najczęściej zgłaszanym objawem u chorych w obu grupach było pieczenie błony śluzowej jamy ustnej (51,8% vs 24%;  $p < 0,002$ ). W grupie I częściej obserwowano suchość błony śluzowej jamy ustnej w porównaniu z grupą kontrolną (50,9% vs 6%;  $p < 0,001$ ), zapalenie kątów ust (26,4% vs 8%;  $p < 0,01$ ) i zapalenie języka (27,3% vs 6%;  $p < 0,003$ ). U chorych użytkujących uzupełnienia protetyczne bez przerwy nocnej w obu grupach najczęściej obserwowano stomatopatię typu II.

U chorych grupy I we wszystkich przypadkach stwierdzono obecność grzybów *Candida*. Dominowały drobnoustroje gatunku *C. albicans* (60,8%). Wśród gatunków *non-albicans Candida* (NAC) izolowano grzyby *C. glabrata* (19,2%), *C. tropicalis* (8,3%), *C. parapsilosis* (7,5%) oraz *C. dubliniensis* (4,2%). Stwierdzono znacząco częstsze występowanie formy mycelialnej *C. albicans* w przypadkach SPIG u chorych na cukrzycę typu 2, w porównaniu z grupą kontrolną (73,9% vs 43,7%;  $p < 0,001$ ). U chorych grupy I najczęściej obserwowano wzrost grzybów o charakterze obfitym oraz umiarkowanym. Najbardziej aktywnym lekiem *in vitro* była amfoterycyna B, flucytozyna oraz nystatyna; niższą wrażliwość obserwowano wobec pochodnych azolowych: mikonazolu, ekonazolu, ketokonazolu. Badane szczepy *Candida* były zdolne do tworzenia biofilmu po 48 godzinach inkubacji i wytwarzały struktury biofilmu na powierzchni PMMA. Badane szczepy grzybów po wytworzeniu struktury biofilmu wykazywały oporność na działanie mikonazolu. Stwierdzono silną dodatnią korelację między wartością MIC a stężeniem mikonazolu powodującym 50% RMA grzybów w strukturze biofilmu.

Uwzględniając główne założenia niniejszej pracy, szczególną uwagę poświęcono analizie zależności wskazujących na istnienie powiązania wykrytej infekcji *Candida* z wyrównaniem glikemii u chorych grupy I. Średnia wartość

HbA1c u badanych wynosiła  $8,6 \pm 1,9\%$ ; średnia wartość glikemii na czczo  $9,8 \pm 2,6$  mmol/l. Przeprowadzone badania pozwoliły zauważyć silny związek pomiędzy parametrami wyrównania glikemii a nasileniem stanu zapalnego błony śluzowej. U chorych z typem II SPIG stwierdzono najwyższy odsetek HbA1c ( $9,8\% \pm 1,6$ ) oraz najwyższy poziom glikemii na czczo ( $9,93 \pm 2,52$  mmol/l). U chorych zgłaszających objawy podmiotowe SPIG odnotowano znaczący wzrost wartości HbA1c w porównaniu z grupą chorych niezgłaszających objawów subiektywnych SPIG ( $9,66\% \pm 1,68$  vs  $6,95\% \pm 0,84$ ;  $p < 0,001$ ). Wykazano wyższe wartości HbA1c u chorych, u których występowała forma M grzybów *C. albicans* w porównaniu z grupą chorych, u których występowała wyłącznie forma Y ( $9,60\% \pm 1,69$  vs  $6,93\% \pm 0,88$ ;  $p < 0,001$ ). Najwyższą wartość HbA1c obserwowano u chorych ze wzrostem zlewnym *Candida*. Podobną zależność obserwowano dla wartości glikemii na czczo, obserwując najwyższy poziom u chorych z występowaniem formy M ( $9,79 \pm 2,48$  mmol/l) oraz w grupie pacjentów, u których wykazano wzrost zlewny *Candida*.

Stwierdzono znacząco wyższe stężenia CRP w typie II SPIG ( $8,39 \pm 2,70$  mg/l) oraz wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CRP w surowicy a odsetkiem HbA1c ( $r_s = 0,572$ ,  $p < 0,001$ ), oraz między stężeniem CRP a glikemią na czczo ( $r_s = 0,517$ ,  $p < 0,001$ ).

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Stomatopatie protetyczne u chorych na cukrzycę typu 2 charakteryzują się cięższym klinicznie przebiegiem i są częściej powikłane zakażeniem grzybiczym. Stwierdza się nasilenie dolegliwości subiektywnych stomatopatii, a pieczenie błony śluzowej jamy ustnej stanowi najczęstszą skargę pacjentów.
2. Całodobowe użytkowanie protez ruchomych nasila częstość występowania objawów subiektywnych stomatopatii protetycznej oraz sprzyja występowaniu zapalenia o ostrym przebiegu.
3. Niedostateczny stan kontroli wyrównania metabolicznego u chorych na cukrzycę typu 2 prowadzi do zwiększenia ryzyka powikłań o charakterze stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym u użytkowników akrylowych protez całkowitych.
4. U chorych na cukrzycę typu 2 w przypadku stwierdzenia stomatopatii protetycznej wskazane jest wykonanie kompleksowych badań mikro-

logicznych, zmierzających do rozpoznania rodzaju i gatunku drobnoustroju oraz oznaczenie jego wrażliwości na leki przeciwgrzybicze.

5. Wartości stężeń azotanu mikonazolu odpowiedzialne za redukcję aktywności metabolicznej grzybów *Candida* w strukturze biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu przekraczają wielokrotnie wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost tych drobnoustrojów w formie planktoidalnej.
6. Badane szczepy grzybów rodzaju *Candida* po utworzeniu struktury biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu w warunkach *in vitro* wykazują oporność na działanie azotanu mikonazolu, co może mieć istotny wpływ na skuteczność leczenia stomatopatii protetycznej z towarzyszącym zakażeniem grzybiczym.

## 9. Summary

Denture stomatitis is an inflammatory process with a multifactorial etiology, which to various degrees affects the denture-covered oral mucosa. Denture trauma and *Candida* infection are regarded as the most important factors in the pathogenesis of this disease. With the increase in the ageing population in Poland there has been an increase in the prevalence of type 2 diabetes often accompanied by complications. Type 2 diabetes is the most common form of the disease, constituting 90% of all cases of the abnormalities of carbohydrate metabolism. *Candida*-associated denture stomatitis (*CaDS*) is one of the chronic diabetes-related complications, observed in approximately 58% of edentulous acrylic complete denture wearers with type 2 diabetes.

Despite the introduction of new drugs and therapies the number of patients with poorly controlled diabetes is increasing. Clinical studies indicate an association between persistent poor glycemic control and chronic complications which may develop microvascular and macrovascular conditions. The glycated haemoglobin level (HbA1c) is widely used to assess long-term glycemic control. HbA1c levels have been shown to correlate with the risk of diabetic complications. However, the open scientific literature is devoid of data indicating the degree to which metabolic control of diabetes is associated with the incidence and progression of diabetes-related complications in the prosthetic treatment of patients with type 2 diabetes.

*Candida* biofilm plays a key role in pathogenesis of *CaDS*. In view of the occurrence of increased mild resistance of *Candida* strains to antifungal agents used in therapy of *CaDS*, it is essential to determine the susceptibility of the biofilm cells to antifungal agents.

Taking into consideration all of the above, the aims of this study were:

1. To describe the occurrence and intensity of clinical symptoms of *CaDS* in patients with type 2 diabetes.
2. To assess the influence of factors related to the use of complete acrylic dentures on oral complaints of *CaDS* patients.

3. To determine the relationships between glycemic control and expression of *Candida* infection in patients with type 2 diabetes suffering from CaDS.
4. To evaluate *in vitro* effect of miconazole nitrate on the metabolic activity of *Candida* biofilms on a moulded polymethyl-methacrylate (PMMA) surface.

The study was carried out on a cohort of 110 patients with type 2 diabetes associated with obesity and suffering from CaDS (47 males and 63 females, mean age  $63.2 \pm 10.5$  years), (group I). The control group comprised of 50 non-diabetic patients with denture stomatitis (29 males and 21 females, mean age  $66.9 \pm 8.8$  years), (group II). All patients had worn complete acrylic resin dentures. The study population was examined clinically for oral mucosal conditions and denture stomatitis was categorized according to the Newton classification. An examination of denture cleanliness was made by using the Ambjörnsen Index of denture plaque. The prevalence of yeasts on the oral mucosa was estimated by a culture method. Samples were inoculated onto Sabouraud's medium with chloramphenicol (bioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, France) and identified using test ID 32 C (bioMerieux SA). Morphological forms of yeasts were determined by microscopic examination. Intensity of culture growth was assessed. The *in vitro* activity of two polyenes (amphotericin B and nystatin) and three azoles (miconazole, econazole and ketoconazole), along with a nucleoside analogue, flucytosine, were examined. Susceptibility of *Candida* species to antifungal agents was determined using the ATB-fungus test (bioMerieux SA). Glycemic control in diabetic patients was evaluated by measuring fasting plasma glucose level (FPG) in venous blood using a standard method and HbA1c levels were measured using high-performance liquid chromatography (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Serum concentrations of C-reactive protein (CRP) were determined by a high sensitivity immunoturbidimetric immunoassay.

The effect of miconazole (Sigma-Aldrich, Switzerland), was evaluated on mature biofilms formed by *Candida* strains on PMMA surfaces. The effect on metabolic activity of the biofilm was established using the XTT colorimetric assay.

Type II (diffuse type) of CaDS was found most frequently amongst patients with diabetes compared with the controls, (57.3% vs 30%;  $p < 0.002$ ). The in-

cidence of type I and type III of denture stomatitis was statistically similar for both groups. It was observed that the patients with diabetes were more likely to report oral complaints of CaDS compared with the controls (60.9% vs 24%;  $p < 0.001$ ). Burning sensation of the mouth was observed as the most frequent complaint of denture stomatitis in both groups, (51.8% vs 24%;  $p < 0.001$ ). Dryness of the oral mucosa was found to be more frequent in subjects with diabetes (50.9% vs 6%;  $p < 0.001$ ). Additionally, the diabetic subjects manifested a significantly greater prevalence of angular cheilitis, (26.4% vs 8%;  $p < 0.01$ ) and glossitis, (27.3% vs 6%;  $p < 0.003$ ). In both groups, type II of CaDS was found most common amongst the patients who wore their dentures at night.

This study indicates that in all diabetic patients denture stomatitis was associated with *Candida* colonization. The most commonly isolated yeasts in diabetic patients were *C. albicans* (60.8%); the remaining isolates included the species of *non-albicans Candida* (NAC): *C. glabrata* (19.2%), *C. tropicalis* (8.3%), *C. parapsilosis* (7.5%) and *C. dubliniensis* (4.2%). The mycelial form of *C. albicans* was found more frequently in diabetic patients with CaDS compared with controls, (73.9% vs 43.7%;  $p < 0.001$ ). Abundant and moderate *Candida* growth was found to be most prevalent in diabetic patients. The highest *in vitro* antifungal activity was observed for amphotericin B, flucytosine and nystatin. Lower antifungal activity was observed for azole derivatives: miconazole, econazole and ketoconazole.

The studies showed that *Candida* strains were able to form biofilms after 48 hour incubation on a PMMA surface. Biofilm-associated *Candida* cells showed high resistance to miconazole. It has been shown that there is a strong positive correlation between MIC values and the concentration of miconazole which produces 50% of RMA of *Candida* biofilm

Of all the factors considered in this study particular attention was paid to the relationships between glycemic control and expression of the *Candida* infection in diabetic patients with CaDS. The mean HbA1c and FPG levels in diabetic patients were  $8.6 \pm 1.9\%$  and  $9.8 \pm 2.6$  mmol/l, respectively. The experiments clearly illustrated the relationship between glycemic control and severity of inflammation of the oral mucosa. In diabetic patients with extensive type of CaDS (type II) the highest value of HbA1c ( $9.8\% \pm 1.6$ ) and FPG level ( $9.93 \pm 2.52$ mmol/l) were observed. The mean value of HbA1c in subjects with



oral complaint-associated condition of CaDS was significantly higher compared to asymptomatic subjects, ( $9.66\% \pm 1.68$  vs  $6.95\% \pm 0.84$ ;  $p < 0.001$ ). Higher HbA1c levels were found in patients with the mycelial form of *C. albicans* compared with subjects with yeast form ( $9.60\% \pm 1.69$  vs  $6.93\% \pm 0.88$ ;  $p < 0.001$ ). The highest value of HbA1c was observed in patients with confluent *Candida* growth. The patients with the mycelial form also had higher FPG levels compared with subjects with yeast form ( $9.79 \pm 2.48$  mmol/l vs  $7.02 \pm 1.2$  mmol/l;  $p < 0.001$ ). Confluent *Candida* growth was associated with highest FPG level.

The highest CRP levels were observed in diabetics with type II CaDS ( $8.39 \pm 2.70$  mg/l). A positive correlation was found between the concentrations of CRP, and HbA1c levels ( $r_s = 0.572$ ;  $p < 0.001$ ), and FPG levels ( $r_s = 0.517$ ;  $p < 0.001$ ).

In view of these results it was concluded that:

1. In patients with type 2 diabetes denture stomatitis is more severe and is more frequently associated with *Candida* infection. In diabetic patients an increased severity of subjective oral complaints is observed, of which burning mouth sensation is most common.
2. Overnight dentures wearing increases the frequency of subjective oral complaints of denture stomatitis and favours the occurrence of an acute type of inflammation.
3. Inadequate metabolic control in patients with type 2 diabetes results in an increased risk of complications such as CaDS stomatitis in acrylic complete denture wearers.
4. In patients with type 2 diabetes where denture stomatitis has been identified, mycological analyses are necessary, to identify the microorganism and determine its *in vitro* susceptibility to antifungal agents.
5. The miconazole nitrate concentration reduces the metabolic activity of *in vitro Candida* biofilm developed on the polymethylmethacrylate surface and exceeds many times the minimal inhibitory concentration of this agent against the planctonic form.
6. Biofilm-associated *Candida* strains were found to be resistant to miconazole nitrate which may have important implications in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis.



## 10. Piśmiennictwo

- [1] Abaci O.: Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. *Curr. Microbiol.*, 2011; 62(4): 1308-1314.
- [2] Ambjørnsen E., Valderhaug J., Norheim P.W., Fløystrand F.: Assessment of an additive index for plaque accumulation on complete maxillary dentures. *Acta Odontol. Scand.*, 1982; 40: 203-208.
- [3] Arendorf T.M., Walker D.M.: The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch. Oral. Biol.*, 1980; 25: 1-10.
- [4] Bachmann S.P., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T.F., Wickes B.L., Graybill J.R., Lopez-Ribot J.L.: *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002; 46: 3591-3596.
- [5] Bachrach G., Muster Z., Raz I., Chaushu G., Stabholz A., Nussbaum G., Gnter M., Chaushu S.: Assessing the levels of immunoglobulin's in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkboard immunodetection. *Oral Dis.*, 2008; 14: 51-59.
- [6] Bader M.S., Lai S.M., Kumar V., Hinthorn D.: Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2004; 12: 860-864.
- [7] Baillie G.S., Douglas L.J.: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.*, 1999; 48: 671-679.
- [8] Baillie G.S., Douglas L.J.: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46: 397-403.
- [9] Banach J.: Mechanizmy wpływu cukrzycy na choroby przyzębia i gojenie się ran – przegląd piśmiennictwa. *Czas. Stomatol.*, 2009; 62: 578-587.
- [10] Barnabé W., de Mendonça Neto T., Pimenta F.C., Pegoraro L.F., Scolaro J.M.: Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agents in the reduction of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *J. Oral Rehabil.*, 2004; 31; 5: 453-459.

- [11] Batura-Gabryel H., Wieczorek U., Adamski Z.: Występowanie i wrażliwość na leki przeciwgrzybicze *in vitro* szczepów *Candida* wyizolowanych od chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) i raka płuca (RP), oceniana za pomocą mikrotestu ATB Fungus. *Post. Derm. Alerg.*, 2001; 18: 125-129.
- [12] Bilhan H., Sulun T., Erkose G., Kurt H., Erturan Z., Kutay O., Bilgin T.: The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin. Oral Investig.*, 2009; 13(4): 363-368.
- [13] Bissel V., Felix D.H., Wray D.: Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1993; 76: 35-39.
- [14] Biswas S., Van Dijck P., Datta A.: Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007; 71(2): 348-376.
- [15] Braga-Silva L.A., Santos A.L.: Aspartic protease inhibitors as potential anti-*Candida albicans* drugs: impact on fungal biology, virulence and pathogenesis. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18(16): 2401-2419.
- [16] Bremenkamp R.M., Caris A.R., Jorge A.O., Back-Brito G.N., Mota A.J., Balducci I., Brighenti F.L., Koga-Ito C.Y.: Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch. Oral Biol.*, 2010; 21: 221-225.
- [17] Budrewicz S., Koziarowska-Gawron E., Koszewicz M.: Etiopatogeneza, diagnostyka i leczenie zespołu pieczenia jamy ustnej w ujęciu neurologicznym. *Dent. Med. Probl.*, 2006; 43; 1: 109-113.
- [18] Budtz-Jørgensen E.: Denture stomatitis III. Histopathology of trauma and *Candida*-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odont. Scand.*, 1970; 28: 551-579.
- [19] Budtz-Jørgensen E.: Denture stomatitis IV. An experimental model in monkeys. *Acta Odont. Scand.*, 1971; 29: 513-526.
- [20] Budtz-Jørgensen E.: The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 1974; 82: 151-190.
- [21] Budtz-Jørgensen E.: Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *JADA*, 1977; 96: 474-479.
- [22] Budtz-Jørgensen E.: Histopathology, immunology and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. *Acta Odont. Scand.*, 1990; 48: 37-43.

- [23] Budtz-Jørgensen E., Carlino P.: A miconazole lacquer in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Mycoses*, 1994; 37(3): 131-135.
- [24] Budtz-Jørgensen E., Lombardi T.: Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontol. 2000*, 1996; 10: 89-106.
- [25] Budtz-Jørgensen E., Mojon P., Rentsch A., Deslauriers N.: Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 2000; 28(2): 141-149.
- [26] Carrington J., Getter L., Brown R.S.: Diabetic neuropathy masquerading as glossodynia. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2001; 132: 1549-1551.
- [27] Challacombe S.J.: Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1994; 78: 202-210.
- [28] Challacombe S.J., Naglik J.R.: The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv. Dent. Res.*, 2006; 19(1): 29-35.
- [29] Chan J.C., Gagliardino J.J., Baik S.H., Chantelot J.M., Ferreira S.R., Hancu N., Ilkova H., Ramachandran A., Aschner P.: Multifaceted determinants for achieving glycemic control: the International Diabetes Management Practice Study (IDMPS). *Diabetes Care*, 2009; 32(2): 227-233.
- [30] Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum M.A.: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.*, 2001a; 183: 5385-5394.
- [31] Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A.: Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J. Dent. Res.*, 2001b; 80: 903-908.
- [32] Chandra J., Zhou G., Ghannoum M. A.: Fungal biofilms and antimycotics. *Curr. Drug Targets*, 2005; 6: 887-894.
- [33] Chen L., Wei B., Li J., Liu F., Xuan D., Xie B., Zhang J.: Association of periodontal parameters with metabolic level and systemic inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *J. Periodontol.*, 2010; 81; 3: 364-371.
- [34] Chow C.K., Matear D.W., Lawrence H.P.: Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology*, 1999; 16(2): 110-118.
- [35] Ciurus M.J.: Zapobieganie zakażeniom w gabinetach zabiegowych a jakość usług medycznych. Wydawnictwo Adi, 1999.

- [36] Cleary T.J., Hutton J.E.: An assessment of the association between functional edentulism, obesity, and NIDDM. *Diabetes Care*, 1995; 18(7): 1007-1009.
- [37] Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3<sup>rd</sup> ed. CLSI document M27-A3. Wayne: CLSI; 2008.
- [38] Coco B.J., Bagg J., Cross L.J., Jose A., Cross J., Ramage G.: Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2008; 23(5): 377-383.
- [39] Collin H.L., Niskanen L., Uusitupa M., Toyry J., Collin P., Koivisto A.M.: Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 2000; 90: 299-305.
- [40] Darwazeh A.M., Al-Refai S., Al-Mojaiwel S.: Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J. Prosthet. Dent.*, 2001; 86(4): 420-423.
- [41] Davey M.E., O'Toole G.A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 847-867.
- [42] Donlan R.M.: Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *CID*, 2001; 33: 1387-1392.
- [43] Dorocka-Bobkowska B., Budtz-Jørgensen E., Włoch S.: Non-insulin-dependent diabetes mellitus as risk factor for denture stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.*, 1996; 25: 411-415.
- [44] Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.*, 2003; 40: 405-410.
- [45] Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Susceptibility of *Candida* isolates from denture-related stomatitis to antifungal agents *in vitro*. *Intern. J. Prosthodont.*, 2007; 20: 504-506.
- [46] Dorocka-Bobkowska B., Düzgüneş N., Konopka K.: AmBisome and Amphotericin B inhibit the initial adherence of *Candida albicans* to human epithelial cell lines, but do not cause yeast detachment. *Med. Sci. Monit.*, 2009; 15(9): 262-269.

- [47] Dorocka-Bobkowska B., Leśniewska K., Łukaszewska M.: Wydzielnicza immunoglobulina A śliny u pacjentów ze stomatopatią protetyczną powikłaną zakażeniem grzybiczym. *Dent. Med. Probl.*, 2009; 46(4): 417-423.
- [48] Dorocka-Bobkowska B., Szumała-Kąkol A., Hędzelek W.: Charakterystyka wybranych cech grzybów drożdżopodobnych w stomatopatiach protetycznych u chorych na cukrzycę typu 2. *Mikol. Lek.*, 2007; 14(1): 41-45.
- [49] Dorocka-Bobkowska B., Zozulińska-Ziółkiewicz D., Wierusz-Wysocka B., Hędzelek W., Szumała-Kąkol A., Budtz-Jørgensen E.: *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2010; 90: 81-86.
- [50] Dworacka M.: Ostra hiperglikemia – przyczyny, następstwa oraz nowe możliwości jej monitorowania u osób z typem 2 cukrzycy. *Diabetol. Pol.*, 2006; 13; suppl. 1: 1-74.
- [51] Dynowska M., Roślan M., Biedunkiewicz-Ziomek A.: Wartość diagnostyczna preparatów bezpośrednich w rozpoznawaniu zakażeń grzybiczych. *Mikol. Lek.*, 2004; 11; 4: 251-257.
- [52] Edlind T.D., Katiyar S.K.: Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010; 54; 11: 4733-4738.
- [53] Egusa H., Ellepola A.N.B., Nikawa H., Hamada T., Samaranayake L.P.: Exposure to subtherapeutic concentrations of polyene antifungals suppresses the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *Chemotherapy*, 2000; 46; 4: 267-274.
- [54] Elguezabal N., Maza J.L., Pontón J.: Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis.*, 2004; 10(2): 81-86.
- [55] Eliasson L., Birkhed D., Osterberg T., Carlén A.: Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and elderly. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006; 114(6): 494-499.
- [56] Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P.: Adhesion of oral *Candida albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. *J. Oral Pathol. Med.*, 1998; 27: 325-332.

- [57] Ellepola A.N.B., Samaranayake L.P.: Antimycotic agents in oral candidosis: An overview: 2. Treatment of oral candidosis. *Dent. Update*, 2000; 27: 165-174.
- [58] Ellis D: Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002; 49(suppl.1): 7-10.
- [59] Emami E., de Grandmont P., Rompré P.H., Barbeau J., Pan S., Feine J.S.: Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J. Dent. Res.*, 2008; 87: 440-444.
- [60] Emami E., Seguin J., Rompré P.H., Koninck L., Grandmont P., Barbeau J.: The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an *in vivo/in vitro* study. *Int. J. Prosth.*, 2007; 20: 514-520.
- [61] Evren B.A., Uludamar A., Işeri U., Ozkan Y.K.: The association between socioeconomic status, oral hygiene practice, denture stomatitis and oral status in elderly people living different residential homes. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2011; 1: 12-18.
- [62] Farah C.S., Lynch N., McCullough M.J.: Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust. Dent. J.*, 2010; 55 Suppl 1: 48-54.
- [63] Felton D.A.: Edentulism and comorbid factors. *J. Prosthodont.*, 2009; 18: 88-96.
- [64] Fidel P.L.: Immunity to *Candida*. *Oral Dis.*, 2002; 8; Suppl 2: 69-75.
- [65] Filler S.G.: *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006; 9(4): 333-339.
- [66] Franek E., Napora M., Blach A., Budlewski T., Gozdowski D., Jedynasty K., Krajewski J., Gorska R.: Blood pressure and left ventricular mass with subjects with type 2 diabetes and gingivitis and chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37(10): 875-880.
- [67] Frączak B., Tutak M., Ziółkowska J.: Leczenie protetyczne pacjentów chorych na cukrzycę. *Mag. Stom.*, 2002; 1: 10-11.
- [68] Fukuhara M., Matsumura K., Wakisaka M., Takata Y., Sonoki K., Fujisawa K., Ansai T., Akifusa S., Fujii K., Iida M., Takehara T.: Hyperglycemia promotes microinflammation as evaluated by C-reactive protein in the very elderly. *Intern. Med.*, 2007; 46: 207-212.
- [69] Gasparoto T.H., Dionisio T.J., de Oliveira C.E., Porto V.C., Gelani V., Santos C.V., Lara V.S.: Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *J. Med. Microbiol.*, 2009; 58: 959-962.

- [70] Gasparoto T.H., Sipert C.R., de Oliveira C.E., Porto V.C., Santos C.F., Campanelli A.P., Lara V.S.: Salivary immunity in elderly individuals presented with *Candida*-related denture stomatitis. *Gerodontology*, 2011; 1: 14-19.
- [71] Gendreau L, Loewy ZG: Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.*, 2011; 1: 6-11.
- [72] Glazar I, Urek M.M., Brumini G, Pezelj-Ribaric S: Oral sensorial complaints, salivary flow rate and mucosal lesions in the institutionalized elderly. *J. Oral Rehabil.*, 2010; 37(2): 93-99.
- [73] Golecka M., Oldakowska-Jedynak U, Mierzwinska-Nastalska E., Adamczyk-Sosińska E.: *Candida*-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. *Transplant. Proc.*, 2006; 38: 155-156.
- [74] Górska R.: Związek zapaleń przyzębia z chorobami ogólnoustrojowymi. *Dent. Med. Probl.*, 2009; 46: 379-383.
- [75] Górska-Ciebiada M., Ciebiada M., Barylski M., Loba J.: Cukrzyca u osób w wieku podeszłym w świetle nowych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Geriatrics*, 2009; 3: 228-233.
- [76] Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel P, Skerka C: The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol. Immunol.* 2009; 47: 465-475.
- [77] Guggenheimer J, Moore P.A.: Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2003; 134(1): 61-69.
- [78] Guggenheimer J, Moore P.A., Rossie K, Myers D, Mongelluzzo M.B. Block H.M., Weyant R, Orchard T.: Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: I. Prevalence and characteristics of non-candidal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2000a; 89: 563-569.
- [79] Guggenheimer J, Moore P.A., Rossie K, Myers D, Mongelluzzo M.B., Block H.M., Weyant R, Orchard T.: Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2000b; 89: 570-576.
- [80] Hawser S, Francolini M., Islam K.: The effects of antifungal agents on the morphogenetic transformation by *Candida albicans in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1996; 38: 579-587.



- [81] Hermann P., Berek Z., Nagy G., Kamotsay K., Rozgonyi F.: Pathogenesis, microbiological and clinical aspects of oral candidiasis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2001; 48: 479-95.
- [82] Hędzulek W.: Praca habilitacyjna: Badanie zwarcia centrycznego metodą gnatosoniczną. Poznań 1994.
- [83] Hibino K., Samaranayake L.P., Hägg U., Wong, R.W.K., Lee W.: The role of salivary factors in persistent oral carriage of *Candida* in humans. *Arch. Oral Biol.*, 2009; 54; 7: 678-683.
- [84] Holmes A.R., Bandara B.M., Cannon R.D.: Saliva promotes *Candida albicans* adherence to human epithelial cells. *J. Dent. Res.*, 2002; 81(1): 28-32.
- [85] Hoshi N., Mori H., Taguchi H., Taniguchi M., Aoki H., Sawada T., Kawabata M., Kuwabara A., Oono A., Tanaka K., Hori N., Toyoda M., Kimoto K.: Management of oral candidiasis in denture wearers. *J. Prosthodont. Res.*, 2011; 55(1): 48-52.
- [86] Infante-Cossio P., Martinez-de-Fuentes R., Torres-Carranza E., Gutierrez-Perez J.L.: Inflammatory papillary hyperplasia of the palate: treatment with carbon dioxide laser, followed by restoration with an implant-supported prosthesis. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2007; 45(8): 658-660.
- [87] Isham N., Ghannoum M.A.: Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. *Mycoses*, 2010; 53(5): 434-437.
- [88] Jankittivong A., Aneksuk V., Langlais R. P.: Oral mucosal conditions in elderly dental patients. *Oral Dis.*, 2002; 8(4): 218-223.
- [89] Jankittivong A., Aneksuk V., Langlais R.P.: Oral mucosal lesions in denture wearers. *Gerodontology*, 2010; 27(1): 26-32.
- [90] Janket S.J., Jones J.A., Meurman J.H., Baird A.E., Van Dyke T.E.: Oral infection, hyperglycemia, and endothelial dysfunction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2008; 105: 173-179.
- [91] Jeganathan S., Ufomata D., Hobkirk J. A., Ivanyi L.: Immunoglobulin A1 and A2 subclass of salivary antibodies to *Candida albicans* in patients with oral candidosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1987; 70: 316-321.
- [92] Jorge A.O.C., Totti M.A.G., deAlmeida O.P., Scully C.: Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. *J. Oral Pathol. Med.*, 1993; 22: 52-56.



- [93] Jose A., Coco B.J., Milligan S., Young B., Lappin D.F., Bagg J., Murray C., Ramage G.: Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient? *J. Prosthodont.*, 2010; 19(4): 252-257.
- [94] Kantardjiev T.V., Popova E.V.: Interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and their soluble receptors in the blood serum of patients with denture stomatitis and fungal infection. *Folia Med.*, 2002; 44(4): 39-44.
- [95] Kasperski J., Piechuta-Królczak B., Wyszynska M., Urban J., Kapel A., Kalarus J.: Zmiany odczuwania smaku w procesie adaptacji do protez ruchomych. *Prot. Stomatol.*, 2010; 3: 176-181.
- [96] Khozeimeh F., Shahtalebi M.A., Noori M., Savabi O.: Comparative evaluation of ketoconazole tablet and topical ketoconazole 2% in orabase in treatment of *Candida*-infected denture stomatitis. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 2010; 11(2): 17-24.
- [97] Kilpatrick E.S.: Haemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *J. Clin. Pathol.*, 2008; 61(9): 977-982.
- [98] Kilpatrick E.S., Keevil B.G., Jagger C., Spooner S., Small M.: Determination of raised C-reactive protein concentration in type 1 diabetes. *J. Med.*, 2000; 93: 231-236.
- [99] King D.E., Mainous A.G., Buchanan T.A., Pearson W.S.S.: C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care*, 2003; 26: 1535-1539.
- [100] Koczorowski R., Gałczyńska-Rusin M.: Gerostomatologia jako nowy przedmiot w szkoleniu lekarza-dentysty. *Dent. Forum*, 2009; 1: 61-67.
- [101] Koczorowski R., Szkaradkiewicz A., Tułeczka T.: Adhezja *Candida albicans* do twardych i elastycznych materiałów protetycznych w badaniach *in vitro*. *Stom. Współcz.*, 2003; 10(4): 31-34.
- [102] Konopka K., Dorocka-Bobkowska B., Gebremedhin S., Düzgüneş N.: Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 2010; 97(4): 413-417.
- [103] Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.*, 2002a; 70: 878-888.
- [104] Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.: Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of Amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002b; 46: 1773-1780.

- [105] Kumamoto C.A.: *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002; 5: 608-611.
- [106] Lamfon H., Al-Karaawi Z., McCullough M., Porter S.R., Pratten J.: Composition of *in vitro* denture plaque biofilms and susceptibility to anti-fungals. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005; 242(2): 345-351.
- [107] Leigh J.E., Steele C., Wormlev F., Fidel P.L.: Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with *Candida*-associated denture stomatitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2002; 17: 311-314.
- [108] Li L., Finnegan M.B., Özkan S., Kim Y., Lillehoj P.B., Ho C.M., Lux R., Mito R., Loewy Z., Shi W.: *In vitro* study of biofilm formation and effectiveness of antimicrobial treatment on various dental material surfaces. *Mol. Oral Microbiol.*, 2010; 25(6): 384-90.
- [109] Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A.: *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2007; 86: 204-215.
- [110] Lopez- Ribot J.L.: *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr. Biol.*, 2005; 15: 453-455.
- [111] Louie A., Dixon D.M., El-Maghrabi E.A., Burnett J.W., Baltch A.L., Smith R.P.: Relationship between *Candida albicans* epidermolytic proteinase activity and virulence in mice. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1994; 32: 59-64.
- [112] Lu D.P.: Prosthodontic management of angular cheilitis and persistent drooling; a case report. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, 2007; 28: 572-577.
- [113] Lund H.L., Nafstad P., Olsen I., Schwarze P., Rønningen K. S.: C-reactive protein variations for different chronic somatic disorders. *Scand. J. Public Health*, 2009; 37: 640-646.
- [114] Lyon D.G., Chick A.O.: Denture sore mouth and angular cheilitis. *Dent. Practit.*, 1957; 7: 212-217.
- [115] Łukaszuk C., Krajewska-Kułał E., Niczyporuk W., Krawczuk-Rybak M., Wojtukiewicz M.: Pięcioletnia obserwacja lekowrażliwości szczepów grzybów drożdżopodobnych u pacjentów onkologicznych. *Mikol. Lek.*, 2000; 7: 209-275.
- [116] Macura A.B.: Cząstki adhezyjne biorące udział w przyleganiu grzybów *Candida albicans*. *Przegl. Dermatol.*, 1993; 80(5): 435-440.

- [117] Macura A.B., Bort A.: Evaluation of adhesive properties of *Candida albicans* isolated from the oral cavity in HIV positive patients. *Wiad. Parazytol.*, 2001; 47(4): 723-728.
- [118] Madejczyk M., Bachanek T.: Zdrowie jamy ustnej u pacjentów chorych na cukrzycę – przegląd piśmiennictwa. *Wiad. Lek.*, 2001; 54: 556-561.
- [119] Mah T.F., O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 34-39.
- [120] Majewski S.: Wyniki badań własnych nad patomechanizmem grzybiczego zapalenia błony śluzowej podłoża protetycznego (stomatitis prothetica mycotica). *Prot. Stomatol.*, 1982; 22: 171-181.
- [121] Majewski S., Macura A.B.: Zastosowanie prób biologicznych na zwierzętach laboratoryjnych do określenia chorobotwórczości szczepów *Candida albicans* izolowanych w stomatitis prothetica mycotica. *Czas. Stomat.*, 1983; 36: 217-220.
- [122] Majewski S., Loster B.W., Macura A.B., Wiśniewska G., Śliwowski Z., Mazurkiewicz-Janik M., Konturek S.J.: Application of a diagnostic therapeutic procedure using implant-supported dental prosthesis as a preventive therapy for *Candidiasis* of upper gastrointestinal tract in complete denture users. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2008; 59: 39-46.
- [123] Majewski S., Loster B.W., Wiśniewska G.: Procedura diagnostyczna i terapeutyczna w przypadku stomatopatii protetycznych – na podstawie obserwacji własnych i długoczasowych obserwacji klinicznych. *Implantoprot.*, 2003; 3: 27-34.
- [124] Manfredi M., McCullough M.J., Polonelli L., Conti S., Al-Karaawi Z.M., Vescovi P., Porter S.R.: *In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2006; 21(3): 177-182.
- [125] Martínez-Beneyto Y., López-Jornet P., Velandrino-Nicolás A., Jornet-García V.: Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. *Int. J. Dent. Hyg.*, 2010; 8(1): 47-52.
- [126] Mendak M., Konopka T., Bogucki A.: Wpływ wybranych uwarunkowań miejscowych na powstawanie zespołu pieczenia jamy ustnej. *Dent. Med. Probl.*, 2010; 47(3): 322-327.

- [127] Meurman J.H., Pärnänen P., Seneviratne C.J., Samaranayake L.P., Saarinen A.M., Kari K.: Prevalence and antifungal drug sensitivity of *non-albicans Candida* in oral rinse samples of self-caring elderly. *Gerodontology*, 2010; 1: 5-9.
- [128] Mierzwińska E.: Odpowiedź immunologiczna typu komórkowego u pacjentów z zakażeniem grzybiczym jamy ustnej w przebiegu stomatopatii protetycznych. Cz. I. Komórkowa aktywność cytotoksyczna zależna od udziału przeciwciał (ADCC). *Prot. Stom.*, 1987; 37: 265-271.
- [129] Mierzwińska E.: Odpowiedź immunologiczna typu komórkowego u pacjentów z zakażeniem grzybiczym jamy ustnej w przebiegu stomatopatii protetycznych. Cz. II. Aktywność angiogenetyczna indukowana limfocytami (LIA). *Prot. Stom.*, 1988; 38: 1-6.
- [130] Mierzwińska-Nastalska E.: Zakażenia grzybicze błony śluzowej jamy ustnej u użytkowników uzupełnień protetycznych – badania kliniczne i immunologiczne. Praca habilitacyjna. Warszawa 1999.
- [131] Mierzwińska-Nastalska E., Jaworska M., Demkow U.: Concentration of  $\alpha$ 1-antitrypsin in serum of blood in dependence on the level of intensity of denture stomatitis. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2006; 31: 11-14.
- [132] Mierzwińska-Nastalska E., Rusiniak-Kubik E., Gontek R., Adamczyk E.: Stan kliniczny błony śluzowej u pacjentów z zakażeniem grzybiczym. *Stom. Współcz.*, 2002; 5: 34-38.
- [133] Mishra N.N., Prasad T., Sharma N., Payasi A., Prasad R., Gupta D.K., Singh R.: Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2007; 54(3): 201-235.
- [134] Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Charakterystyka biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.*, 2009a; 16(3): 159-164.
- [135] Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Lekooporność oraz zwalczanie biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.*, 2009b; 16(3): 165-169.
- [136] Moore P.A., Guggenheimer J., Orchard T.: Burning mouth syndrome and peripheral neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J. Diab. Compl.*, 2007; 21: 397-402.
- [137] Moore P.A., Zgibor J.C., Dasanayake A.P.: Diabetes: a growing epidemic of all ages. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2005; 134: 11-15.

- [138] Muzyka B.C.: Oral fungal infections. *Dental Clinics of North America* 2005; 49(1): 49-65.
- [139] Nagler R.M., Hershkovich O.: Age-related changes in unstimulated salivary function and composition and its relations to medications and oral sensorial complaints. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2005; 17(5): 358-366.
- [140] Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(3): 400-428.
- [141] Nakagami T., Tajima N., Oizumi T., Karasawa S., Wada K., Kameda W., Susa S., Kato T., Daimon M.: Hemoglobin A1c in predicting progression to diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2010; 87(1): 126-131.
- [142] Naruszewicz M.A.: Patogenetyczne mechanizmy wpływu chorób przyzębia na progresję miażdżycy. *Czas. Stomatol.*, 2009; 62: 549-553.
- [143] Naskręt D., Zozulińska D.: Cukrzyca typu 2 – epidemiologia, patogenezą, objawy, powikłania. *Farm. Pol.*, 2003; 1(15): 1055-1060.
- [144] Nawrot U., Karpiewska A.: Patogeneza zakażeń wywołanych przez *C. albicans*. *Mikol. Lek.*, 2002; 9(3): 137-143.
- [145] Nett J.E., Marchillo K., Spiegel C.A., Andes D.R.: Development and validation of an *in vivo* *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect. Immun.*, 2010; 78(9): 3650-3659.
- [146] Newton A.V.: Denture sore mouth. A possible aetiology. *Br. Dent. J.*, 1962; 7: 357-360.
- [147] Niesłuchowska M.: Podścielanie protez materiałem Visco-gel z dodatkiem leku przeciwgrzybiczego jako metoda leczenia stomatopatii protezycznych powikłanych infekcją grzybami drożdżopodobnymi – badania laboratoryjne. *Prot. Stom.*, 1986; 36(4): 153-159.
- [148] Niimi M., Firth N.A., Cannon R.D.: Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*, 2010; 98(1): 15-25.
- [149] Nikawa H., Mikihiro S., Egusa H., Fukushima H., Kawabata R., Hamada T., Yatani H.: *Candida* adherence and biofilm formation on oral surfaces. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2005; 46(4): 233-242.
- [150] Nikawa H., Nishimura H., Mikihiro S., Hamada T., Sadamori S., Samaranayake L.P.: Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycoses*, 2000; 43: 139-143.

- [151] Noack B., Genco R.J., Trevisan M., Grossi S., Zambon J.J., De Nardin E.: Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J. Periodontol.*, 2001; 72: 1221-1227.
- [152] Nobile C.J., Schneider H.A., Nett J.E., Sheppard D.C., Filler S.G., Andes D.R., Mitchell A.P.: Complementary adhesion function in *Candida albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.*, 2008; 18(14): 1017-1024.
- [153] Nyquist G.: A study of denture sore mouth. An investigation of traumatic, allergic and toxic lesions of the oral mucosa arising from the use of full dentures. *Thesis. Acta Odontol. Scand.*, 1952; 10; 9: 151-154.
- [154] Pedersen A.M.L.: Diabetes mellitus and related oral manifestations. *Oral Biosci. Med.*, 2004; 1: 229-248.
- [155] Pereira-Cenci T., Del Bel Cury A., Crielaard W., Ten Cate T.M.: Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J. Appl. Oral Sci.*, 2008; 16: 86-94.
- [156] Pietruski J.K., Pietruska MD, Jabłońska E, Sacha P, Zaremba M, Stokowska J.W.: Interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and their soluble receptors in the blood serum of patients with denture stomatitis and fungal infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 2000; 48(2): 101-105.
- [157] Piłaciński S., Pelczar A., Uruski P., Dudziak J., Sporna A., Kosikowski P., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B.: Wybrane markery reakcji zapalnej a przewlekłe powikłania choroby u pacjentów z cukrzycą typu 1. *Now. Lek.*, 2005; 74: 667-671.
- [158] Pinto E., Ribeiro I.C., Ferreira N.J., Fortes C.E., Fonseca P.A., Figueiral M.H.: Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida* species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J. Oral Pathol. Med.*, 2008; 37(10): 587-592.
- [159] Piotrowski P.: Zaniki kostne podłoża protetycznego pod protezami ruchomymi. Opis przypadków. *Dent. Forum*, 2005; 33(2): 103-109.
- [160] Pires F.R., Santos E.B., Bonan P.R., de Almeida O.P, Lopes M.A.: Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J. Oral Rehabil.*, 2002; 29: 1115-1119.

- [161] Pisarczyk-Wiza D., Zozulińska D., Majchrzak A., Sobieska M., Wiktorowicz K., Wierusz-Wysocka B.: Ocena wybranych białek ostrej fazy u otyłych chorych na cukrzycę typu 2. *Diabetol. Dośw. Klin.*, 2002; 2: 455-460.
- [162] Pradhan A.D., Manson J.E., Rifai N., Buring J.E., Ridker P. M.: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2001; 18(286): 327-334.
- [163] Radford D.R., Challacombe S.J., Walter J.D.: Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1999; 10(1): 99-116.
- [164] Radnai M., Whiley R., Friel T., Wright P.S.: Effect of antifungal gels incorporated into a tissue conditioning material on the growth of *Candida albicans*. *Gerodontology*, 2010; 27(4): 292-296.
- [165] Ramage G., Bachman S., Patterson T.F., Wickes B.L., López-Ribot J.L.: Investigation of multidrug efflux pumps in relations to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002a; 49: 973-980.
- [166] Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C., Lopez-Ribot J.: Our current understanding of fungal biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2009; 35(4): 340-355.
- [167] Ramage G., Tomsett K., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L., Redding S.W.: Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2004; 98: 53-59.
- [168] Ramage G., Vande Walle K., López-Ribot J.L., Wickes, B.L.: The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Let.*, 2002b; 214: 95-100.
- [169] Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., López-Ribot J.L.: Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 3234-3240.
- [170] Redding S., Bhatt B., Rawls H.R., Siegel G., Scott K., Lopez-Ribot J.: Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2009; 107(5): 669-672.
- [171] Ruhnke M.: Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Curr. Drug Targets*, 2006; 7(4): 495-504.



- [172] Salerno C, Pascale M., Contaldo M., Esposito V., Busciolano M., Milillo L., Guida A., Petruzzi M., Serpico R.: *Candida*-associated denture stomatitis. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2010; 16(2): 139-143.
- [173] Salzberg T.N., Overstreet B.T., Rogers J.D., Califano J.V., Best A.M., Schenkein H.A.: C-reactive protein levels in patients with aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, 2006; 77: 933-939.
- [174] Samaranayake, Y.H., Cheung, B.P., Parahitiyawa, N., Seneviratne, C.J., Yau, J.Y., Yeung, K.W., Samaranayake, L.P. Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch. Oral Biol.*, 2009; 54 (2): 115-126.
- [175] San Millán R, Elguezabal N, Regúlez P., Moragues M.D., Quindós G, Pontón J: Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology*, 2000; 146: 2105-2112.
- [176] Saudek C.D., Herman W.H., Sacks D.B., Bergenstal R.M., Edelman D, Dawidson M.B: A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008; 93: 2447-2453.
- [177] Saydah S.H., Fradkin I., Cowie C.: Poor control of risk factors, for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA*, 2004; 291: 335-342.
- [178] Scala A., Checchi L., Montevocchi M., Marini I., Giamberardino M.A.: Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2003; 14: 275-291.
- [179] Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B.: Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005; 48(6): 365-377.
- [180] Seneviratne C.J., Jin L.J., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P.: Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2008; 52(9): 3259-3266.
- [181] Seneviratne C.J., Wang Y., Jin L., Abiko Y., Samaranayake L.P.: Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*, 2010; 10(7): 1444-1454.
- [182] Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z.: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2010; 87: 4-14.



- [183] Shimizu K., Kimura F., Akimoto T., Akama T., Otsuki T., Nishijama T., Kuna S., Kono I.: Effects of exercise, age and gender on salivary secretory immunoglobulin A in elderly individuals. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2007; 13: 55-66.
- [184] Ship J.A.: Diabetes and oral health. *JADA*, 2003; 134: 4-10 .
- [185] Shulman J.D., Rivera-Hidalgo F., Beach M.M.: Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J. Oral Pathol. Med.*, 2005; 34: 340-346.
- [186] Sieradzki J., Grzeszczak W., Kamafel W.: Badanie PolDiab. Część I. Analiza leczenia cukrzycy w Polsce. *Diabetol. Prakt.*, 2006; 7: 8-15.
- [187] Sieradzki J., Koblik T., Nazar M.: Próba oceny postępów w leczeniu chorych na cukrzycę typu 2 na podstawie nadań przesiewowych HbA1c wykonanych w latach 2002 i 2005. *Diabetol. Prakt.*, 2008; 3: 132-139.
- [188] Sims C.R., Ostrosky-Zeichner L., Rex J.: Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch. Med. Res.*, 2005; 36: 660-671.
- [189] Skowroński M., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka M.: Ocena stężenia białka C-reaktywnego u chorych na cukrzycę ze współistniejącym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. *Diabetol. Dośw. Klin.*, 2005; 5: 65-70.
- [190] Spiechowicz E., Niesłuchowska M., Ciechowicz B., Kowalczyk W.: Opracowanie i ocena metod profilaktyki w stomatopatiach protetycznych powikłanych infekcją grzybami drożdżopodobnymi. *Prot. Stomat.*, 1995a; 6: 320-323.
- [191] Spiechowicz E., Renner R., Ling X., Santarpià R., Pollock J.: Badania nad dimorfizmem *C. albicans* na powierzchniach protezy i błony śluzowej u pacjentów ze stomatopatią protetyczną. *Prot. Stomat.*, 1994a; 64: 65-69.
- [192] Spiechowicz E., Rusiniak-Kubik K., Gawor E., Rudkiewicz M., Rolski D.: Ocena niektórych czynników miejscowych i ogólnych u pacjentów geriatrycznych w aspekcie profilaktyki stomatopatii protetycznych. *Prot. Stomat.*, 1995b; 1: 8-16.

- [193] Spiechowicz E., Rusiniak-Kubik K., Skopińska-Różewska E., Sokolnicka I., Zabuska-Jabłońska K., Brajczewska-Fischer W., Rolski D., Ciecchowicz B., Gil M., Renner R.P.: Immunological status of patients with denture stomatitis and yeast infection after treatment of maxillofacial tumors. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1994b; 42: 263-267.
- [194] Srinivasan M., Gulabani M.: A microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. *Ind. J. Dent. Res.*, 2010; 21(3): 353-356.
- [195] Stafford G.D., Arendorf T., Huggett R.: The effect of overnight drying and water immersion on *Candidal* colonization and properties of complete dentures. *J. Dent.*, 1986; 14: 52-56.
- [196] Stolar M.: Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, 2010; 123(3): 3-11.
- [197] Sun, Q.N., Fang, K.: Architecture, influencing factors, and sensitivity to antifungal agents of *Candida* biofilm. *Acta Acad. Med. Sin.*, 2002; 24(4): 385-388.
- [198] Sundstrom P.: Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999; 2(4): 353-357.
- [199] Szponar E., Bobowicz Z., Orkiszewska M: Występowanie i lekooorność grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych z błony śluzowej jamy ustnej. *Dent. Forum*, 2005; 32(1): 25-29.
- [200] Szkaradkiewicz A.: Ewolucyjność wirulencji drobnoustrojów. *Now. Lek.*, 2002; Suppl. 1: 23-25.
- [201] Szkaradkiewicz A., Karpiński T.M., Drews M., Borejsza-Wysocki M., Majewski P., Andrzejewska E.: Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010; 901564.
- [202] Szkaradkiewicz A., Szponar E., Krzemińska-Jaškowiak E., Tułeczka T.: Serum interferon-gamma (IFN-gamma) in chronic oral candidosis. *Med. Mycol.*, 1998; 36(5): 269-73.
- [203] Szymankiewicz M., Kowalewski J.: Zakażenia wywołane przez grzyby *Candida*. Czynniki predysponujące. *Mikol. Lek.*, 2005; 12: 189-192.

- [204] Szymborska-Kajane A., Koblik T., Bandurska-Stankiewicz E., Dzida G., Ruprecht Z., Stefański A., Szykowna I., Tiuryn-Petrulewicz A., Wolnik B., Zozulińska-Ziółkiewicz D., Smoczek J., Burski J., Kot W.: Wyrównanie metaboliczne chorych na cukrzycę typu 2 leczonych w poradniach lekarzy rodzinnych kierowanych do specjalisty – wstępne wyniki programu „Poprawa kontroli glikemii”. *Diabetol. Prakt.*, 2009; 6: 228-233.
- [205] Tan K.C., Chow W.C., Tan S.: Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004; 27: 223-228.
- [206] Tanida T., Ueta E., Tobiume A., Hamada T., Rao F., Osaki T.: Influence of aging on *Candidal* growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J. Oral Pathol. Med.* 2001; 30(6): 328-335.
- [207] Ten Cate, J.M., Klis, F.M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., De Groot, P.W.J.: Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J. Dent. Res.*, 2009; 88(2): 105-115.
- [208] Tronchin G., Pihet M., Lopez-Bezerra L.M., Bouchara J.P.: Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, 2008; 24: 1-24.
- [209] Ueta E., Tanida T., Doi S., Osaki T.: Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. *J. Lab. Clin. Med.*, 2000; 136(1): 66-73.
- [210] Vitkov L., Weitgasser R., Hannig M., Fuchs K., Krautgartner W.D.: *Candida*-induced stomatopyrosis and its relation to diabetes mellitus. *J. Oral Pathol. Med.*, 2003; 32: 46-50.
- [211] Watamoto T., Samaranayake L.P., Jayatilake J.A., Egusa H., Yatani H., Seneviratne C.J.: Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2009; 34(4): 333-339.
- [212] Webb B.C., Thomas C.J., Willcox M.D.P., Harry D.W.S., Knox K.W.: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Austr. Dent. J.*, 1999; 43: 45-50.
- [213] Webb B.C., Thomas C.J., Whittle T.: A 2-year study *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerontology*, 2005; 22: 168-176.
- [214] Whiteway W., Bachewich C.: Morphogenesis in *Candida albicans*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2007; 61: 529-553.

- [215] Wierusz-Wysocka B.: Praca habilitacyjna: Czynność granulocytów obojętnochłonnych u chorych na cukrzycę. Poznań 1983.
- [216] Wierusz-Wysocka B.: Diabetes problems in elderly patients. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2001; 105: 295-298.
- [217] Wilson J., Wilton J.M., Sterne J.A.C.: Comparison of secretory IgA and IgG isotype levels in palatal secretions of denture stomatitis patients with denture wearers having clinically healthy palates. *Eur. J. Prosthodont. Res. Dent.*, 2007; 15(2): 50-54.
- [218] Wu T., Dorn J.P., Donahue R.P., Sempos C.T., Trevisan M.: Associations of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am. J. Epidemiol.*, 2002; 1(15): 65-71.
- [219] Yao X., Li H., Leng S.X.: Inflammation and Immune System Alterations in Frailty. *Clin. Geriatr. Med.*, 2011; 27(1): 79-87.
- [220] Yoshijima Y., Murakami K., Kayama S., Liu D., Hirota K., Ichikawa T., Miyake Y.: Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses*, 2010; 53(3): 221-226.
- [221] Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2011. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetol. Dośw. Klin.*, 2011; supl A1-A48.
- [222] Zhu W., Filler S.G.: Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010; 12(3): 273-82.
- [223] Zomorodian K., Haghighi N.N., Rajaei N., Pakshir K., Tarazooie B., Vojdani M., Sedaghat F., Vosoghi M.: Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med. Mycol.*, 2011; 49(2): 208-211.
- [224] Zozulińska D.: Rola procesu zapalnego ze szczególnym uwzględnieniem granulocytów obojętnochłonnych w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy. Praca habilitacyjna. Poznań 2001.
- [225] Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B.: Hyperglycaemia and inflammation are culprits of late complications. *Arch. Med. Sci.*, 2005; 1: 115-118.
- [226] Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B.: Rola granulocytów obojętnochłonnych w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy. *Diabetol. Prakt.*, 2004a; 3: 139-142.
- [227] Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B.: Rola zapalenia w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy. *Diabetol. Pol.*, 2004b; 11: 264-267.