

Клиническое значение уровня молекул межклеточной адгезии 1 у пациентов с кандидозным стоматитом в зависимости от способности к биопленкообразованию грибов рода *Candida*

Д.К. Новиков, А.А. Пожарицкая, И.Ю. Карпук

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск

Clinical significance of the level of intercellular adhesion molecules 1 in patients with *Candida* stomatitis depending on the ability of *Candida* spp to form biofilms

D.K. Novikov, A.A. Pozharitskaya, I.Yu. Karpuk

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Цель исследования: провести оценку уровня молекул межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) в ротовой жидкости у пациентов с кандидозным стоматитом в зависимости от способности грибов рода *Candida* к формированию биопленки.

Объектом исследования были 67 пациентов с кандидозом слизистой оболочки рта и 23 пациента контрольной группы без кандидозного стоматита. Проведено клиническое обследование 90 пациентов, взятие мазков для подтверждения диагноза микробиологическим методом, ИФА для оценки уровня ICAM-1 в ротовой жидкости, определение способности к биопленкообразованию штаммов грибов рода *Candida*.

По результатам исследования у 41 (61,2%) пациента с кандидозным стоматитом штаммы грибов рода *Candida* обладали способностью формировать биопленку, а у 26 (38,8%) пациентов эта способность отсутствовала, причем у 19 пациентов (46,3%) была низкая способность к биопленкообразованию, у 21 (51,3%) - умеренная способность и у 1 (2,4%) - высокая. У пациентов с кандидозным стоматитом уровень концентрации ICAM-1 в слюне составлял $8,51 \pm 0,5$ ng/ml, что достоверно отличало его ($p < 0,001$) от показателя в контрольной группе без кандидоза слизистой оболочки рта ($4,51 \pm 0,32$ ng/ml). У пациентов с кандидозным стоматитом ($n=67$) уровень ICAM-1 в слюне был достоверно выше ($p < 0,01$) в группе с биопленкообразующими штаммами, чем с биопленкообразующими.

Ключевые слова

Кандидоз слизистой оболочки рта, ICAM-1, ротовая жидкость, биопленка.

Summary

Aim: to assess the level of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) in the oral fluid of patients with candidal stomatitis, depending on the ability of fungi *Candida* to form a biofilm. **The object** of the study were 67 patients with oral mucosa candidiasis and 23 patients of the control group without oral candidiasis. A clinical examination of 90 patients was carried out, smears were taken to confirm the diagnosis by microbiological methods, ELISA to assess the level of ICAM-1 in the oral fluid, to determine the biofilm-forming ability of strains of fungi *Candida*.

According to the *results of the study*, in 41 (61,2%) patients with candidal stomatitis, strains of fungi *Candida* had the ability to form a biofilm, and in 26 (38,8%) patients this ability was absent, and in 19 patients (46,3%) was low ability to biofilm formation was observed, in 21 (51,3%) - moderate ability and in 1 (2,4%) - high. In patients with candidiasis stomatitis, the level of ICAM-1 concentration in saliva was $8,51 \pm 0,5$ ng / ml, which significantly distinguished it ($p < 0,001$) from the indicator in the control group without oral mucosa candidiasis ($4,51 \pm 0,32$ ng / ml). In patients with candidal stomatitis ($n = 67$), the level of ICAM-1 in saliva was significantly higher ($p < 0,01$) in the group with biofilm-forming strains than with biofilm-non-forming strains.

Keywords

Oral mucosa candidiasis, ICAM-1, saliva, biofilm.

Введение

В связи с тем, что кандидомикозы рта развиваются на фоне иммуносупрессии, требуется проведение у пациентов иммунодиагностики и иммунотерапии в сочетании с противогрибковым лечением [1].

Факторы местного иммунитета имеют огромное значение в патогенезе заболеваний слизистой оболочки рта (СОР). Неоднократно установлено, что поддержание функциональных возможностей системы иммунитета способствует благоприятному исходу лечения стоматологических заболеваний, что вызывает необходимость определения и оценки местного иммунитета рта для планирования адекватного и персонализированного комплекса лечебно-профилактических мероприятий при терапии кандидоза СОР [2].

В ряде работ показано, что иммунитет слизистых оболочек представляет собой самостоятельно функционирующую систему, которая не просто отражает состояние общего иммунитета, а оказывает воздействие на его формирование и развитие инфекции СОР [3].

Местный иммунитет обеспечивается с одной стороны клетками эпителия СОР (мукозальный иммунитет), с другой – защитными факторами слюны. Предрасположенность к грибковым инфекциям обусловлена недостаточностью клеточных факторов (Тх1), которые могут угнетаться преимущественной активацией Тх2 и их цитокинами. Основу противогрибкового иммунитета составляют Тх1 типа, которые активируют макрофаги [4].

Высвобождение провоспалительных факторов приводит к привлечению иммунных клеток к очагам инфекции, в основном нейтрофилов и макрофагов. Нейтрофилы являются основными клетками врожденного иммунитета для борьбы с грибковыми инфекциями слизистой оболочки рта и обеспечения защиты эпителия [5].

Когда нейтрофилы обнаруживают более крупные по размеру микроорганизмы (например, длинные гифы грибов), включается механизм образования внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET). *S. albicans* способна формировать биопленки, что делает клетки грибов менее доступными для иммунных клеток и NET [6].

Возбудители грибковой инфекции способны образовывать биопленки [7,8], которые становятся более устойчивы к воздействию лекарственных препаратов [9]. Некоторые результаты исследований демонстрируют, что формирование биопленки и недостаточная резистентность эпителия СОР может повысить инвазивность *S. albicans* [10].

Поэтому активные исследования ведутся в направлении выявления противогрибковых белков в слюне и их роли в иммунном ответе [11]. К таким белкам можно отнести и молекулу межклеточной адгезии 1 (ICAM-1). ICAM-1 относится к суперсемейству иммуноглобулинов и обнаруживается как на клетках эпителия и эндотелия, так и на активированных лейкоцитах [12].

ICAM-1 участвует в контактном взаимодействии Т-лимфоцитов с моноцитами, а также цитотоксических Т-лимфоцитов с клетками-мишенями при иммунной реакции. Миграция лейкоцитов в очаг воспаления, перестройка цитоскелета и сам процесс фагоцитоза невозможны без поверхностных молекул адгезии ICAM-1. ICAM-1 играет роль в связывании *S. albicans* и последующей индукции экспрессии гена IL-8 в эпителиальных клетках десны и СОР, что способствует эффективному привлечению и активации нейтрофилов на местном уровне [12].

Описано, что ICAM-1 передает внутриклеточные сигналы, приводящие к перестройке актинового цитоскелета в эпителиальных клетках и клетках эндотелия, и способствует миграции лейкоцитов и осуществлению процесса фагоцитоза [13]. Связывание ICAM-1 индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов и способствует поддержанию воспаления [14]. В актуальных научных публикациях имеются разрозненные данные о взаимосвязи уровня ICAM-1 в ротовой жидкости и наличием у пациентов кандидоза СОР [15, 16].

Цель: провести оценку уровня ICAM-1 у пациентов с кандидозным стоматитом в зависимости от способности грибов рода *Candida* к формированию биопленки.

Материалы и методы

1. Объект исследования

Объектом исследования стали пациенты (n=67) в возрасте от 20 до 75 лет (52 женщины и 15 мужчин), которые за период с 2012 по 2020 гг. обратились на кафедру терапевтической стоматологии с курсом ФПК и ПК УО ВГМУ и УЗ «Витебский областной клинический стоматологический центр» с диагнозом «кандидозный стоматит» (табл. 1). А также пациенты (n=23), составившие контрольную группу, без кандидоза СОР и сопоставимые по полу (18 женщин и 5 мужчин) и возрасту (средний возраст 43,1±2,7) для исследования стоматологического и соматического статуса и состояния системы иммунитета (СИ).

Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, наличие микробиологического подтверждения выделения культуры *Candida spp.* из патологического материала с количеством колоний при посеве $\geq 1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона.

Критериями исключения из исследования стали: возраст до 18 лет, отказ пациента от исследования, сахарный диабет, ВИЧ-инфекция, лечение онкологической патологии, прием иммунодепрессантов на постоянной основе, беременность и период грудного вскармливания, выделение культуры *Candida spp.* из патологического материала с количеством колоний при посеве менее $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона.

Все пациенты были проинформированы о сути исследования.

2. Клиническое обследование

Пациентам было проведено обследование слизистой оболочки рта согласно рекомендациям ВОЗ с заполнением стоматологической амбулаторной карты. При оценке клинического состояния пациентов учитывались типичные жалобы пациентов на чувство жжения и дискомфорта во рту, неприятные ощущения и боль при приеме пищи (особенно острой), сухость или наличие пенистой, вязкой слюны, галитоз. Визуально могла определяться эритема и отек слизистой с гладкой блестящей поверхностью или белесоватый легко-

снимающийся налет на слизистой языка, щек, неба и другие симптомы (табл. 2).

3. Микробиологическое исследование

Для подтверждения диагноза у пациентов были взяты мазки с СОР для проведения микробиологического исследования (посевы на среду Сабуро) и определения количества КОЕ грибов, их чувствительности к антимикотическим препаратам и наличия сопутствующей микрофлоры. Материал тщательно собирали стерильным зонд-тампоном с вискозным наконечником (Ningdo Greetmed MI Co, China) со слизистой оболочки щек, основания языка, десен. Пробу в пробирке в течение 2 часов транспортировали в микробиологическую лабораторию УЗ «Витебская областная клиническая больница» или бактериологическую лабораторию Витебского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Перед процедурой пациенту было рекомендовано ополаскивание рта теплой чистой водой без предварительной чистки зубов. Контрольный сбор материала для исследования проводился после окончания лечения (через 1 месяц) и через 6 месяцев.

Диагноз подтверждался при наличии клинических симптомов и положительного результата микробиологического исследования (выделение культуры *Candida spp.* из патологического материала с количеством колоний при посеве $\geq 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона).

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов основной и контрольной групп

Характеристика	Кандидозный стоматит (n=67)	Контрольная группа (n=23)
Пол (м/ж)	15 / 52	5 / 18
Возраст (M±m)	45,7±1,9	43,1±2,7
Наличие съемных зубных протезов, из них:	28(42%)	9(39%)
ЧСПП%	10(36 %)	3(33%)
ПСПП%	15(54%)	5(56%)
другие%	3(10%)	1(11%)
МК, ШПМП%	22(33%)	8(35%)

Таблица 2. Характеристика клинических проявлений кандидозного стоматита в исследуемой группе

Клиническая характеристика	Кандидозный стоматит (n=67)	
	Абс.	Относ. (%)
Наличие жалоб / бессимптомное течение	59/8	88/12
Ксеростомия (сухость во рту)	51	76,1
Налет/ гиперемия	42	62,7
Жжение	48	71,6
Болезненность, дискомфорт	43	64,2
Галитоз	39	58,2
Заболевания СОР (лейкоплакия, КПЛ)	13	19,4

4. Определение уровня ICAM 1 методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Для определения уровня ICAM 1 у пациентов собирались образцы ротовой жидкости (РЖ) в центрифужные пробирки типа Эппендорф в утренние часы натощак до чистки зубов. После центрифугирования материала при скорости 2000 об./мин в течение 20 мин отделяли надосадочную жидкость, фильтровали и замораживали для дальнейшего анализа.

В собранных биосубстратах методом ИФА определяли уровень ICAM 1 (Cloud-Clone Corp., China). Анализы проводили в 96-луночных микропланшетах для иммунополюсорбирования в соответствии с инструкциями производителя. Добавляли 50 мкл стандартного раствора в стандартную лунку и по 40 мкл образцов в соответствующие лунки, затем добавляли 10 мкл антител в лунки для образцов и 50 мкл стрептавидинпероксидазы хрена в лунки для образцов и стандартные лунки. Хорошо перемешивали, герметично закрывали пленкой и инкубировали 60 минут при 37°C. Затем 5 раз промывали планшет промывочным буфером и промокивали пластину. Добавляли 50 мкл раствора субстрата А и затем столько же раствора субстрата В в каждую лунку. Инкубировали планшет в течение 10 минут при 37°C в темноте. После добавляли 50 мкл стоп-раствора, фиксировали смену цвета и определяли оптическую плотность в течение 10 минут после добавления стоп-раствора. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-46 (РФ) при 450 нм с эталоном при 620 нм, и количественные концентрации сравнивали со стандартным антителом в каждом планшете.

5. Определение способности грибов рода *Candida* spp. к образованию биопленки

Определение способности к биопленкообразованию проводилось согласно методике с использованием 96-луночного планшета для ИФА, на котором штаммы грибов способны образовывать биопленку. Для этого из инкубированных на среде Сабуро в течение 24 часов при 37°C штаммов грибов рода *Candida* spp. готовилась взвесь с заданной оптической плотностью, которую вносили в лунки планшета для ИФА по 150 мкл. Контролем были лунки без грибов. После инкубирования в течение 72 часов при температуре 37°C, для удаления планктонной формы грибов в лунки планшета добавляли по 100 мкл дистиллированной воды, а затем промывали автоматически четырехкратно. Далее биопленку фиксировали и окрашивали в соответствии с методикой.

Отображение биопленки и определение её массы по оптической плотности проводилось с помощью многоканального спектрофотометра при длине волны 620 нм. Способность к биопленкообразованию у грибов в зависимости от веса биопленки определяли как низкую (от 0 до 9,4 мкг/лунку), умеренную (от 9,4 до 28 мкг/лунку) или высокую (более 28 мкг/лунку).

6. Статистическая обработка данных

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel 2010, Statistica (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999К347156W). При параметрическом распределении изучаемых явлений результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Межгрупповое сравнение значимости при параметрическом распределении несвязанных выборок проводили с помощью t-критерия Стьюдента, при непараметрическом распределении - с помощью критерия Манна-Уитни. Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе результатов исследования способности к формированию биопленки штаммами грибов рода *Candida*, полученных от пациентов с кандидозным стоматитом, выявлено, что изучаемая способность была в 41 случае, что составило 61,2%. Отсутствовала способность к образованию биопленки у 26 пациентов (38,8%).

В зависимости от средней массы экзополимерного матрикса биопленки было выявлено различный уровень способности её образовывать у пациентов с кандидозом СОР (табл. 3). У 19 лиц (28,4% от всех случаев, где штаммы грибов способны к биопленкообразованию) этот показатель соответствовал низкому уровню ($4,3 \pm 0,38$ мкг/лунку). У 21 пациента (31,3%) средняя масса экзополимерного матрикса биопленки составляла $11,8 \pm 0,45$ мкг/лунку, что соответствовало умеренной способности к биопленкообразованию. В 1 случае (1,5%) этот показатель был высоким (28,1 мкг/лунку). Средний вес микробной биопленки от всех полученных штаммов составлял $8,7 \pm 0,81$ мкг/лунку.

В результате оценки мукозального иммунного статуса пациентов с кандидозным стоматитом методом ИФА с количественным определением уровня ICAM-1 отмечена тенденция к повышению концентрации белка в РЖ в группе лиц с кандидозом СОР относительно контрольной группы без кандидозного стоматита (табл. 4).

Таблица 3. Количество пациентов с кандидозом СОР и способность к биопленкообразованию грибами рода *Candida*

Способность к образованию биопленки	Отсутствует	Способны к биопленкообразованию (n= 41)		
		Низкая (0 до 9,4 мкг/лунку)	Умеренная (от 9,4 до 28 мкг/лунку)	Высокая (более 28 мкг/лунку)
Пациенты с кандидозным стоматитом (n= 67)	26 (38,8%)	19 (28,4%)	21(31,3%)	1 (1,5%)

Таблица 4. Уровень показателей молекулы межклеточной адгезии 1 в ротовой жидкости пациентов с кандидозом СОР и контрольной группы

Группа	ICAM-1 (ng/ml)	
Контрольная группа (n=23)	4,51±0,32	
Пациенты с кандидозом СОР (n=67)	1. Возбудители, способные к биопленкообразованию (БПО) (n=41)	9,54±0,7 ^{*,4}
	2. низкая способность НС(n=19)	7,66±0,53 ^{*,3}
	3. умеренная способность УС(n=21)	10,35±0,83 ^{*,2}
	4. Возбудители, не способные к биопленкообразованию (БПНО) (n=26)	6,89±0,55 ^{*,1}

Примечание:

1) * – отличие с $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

2) Цифры в верхнем индексе^{1,3,4,5} показывают с какой исследуемой группой показатель имеет статистически достоверное различие ($p < 0,01$).

Выводы

- У 41 (61,2%) пациента с кандидозным стоматитом штаммы грибов рода *Candida* обладали способностью формировать биопленку, а у 26 (38,8%) пациентов эта способность отсутствовала.
- Вес микробной биопленки в среднем составлял $8,7 \pm 0,81$ мкг/лунку, причем у 19 пациентов (46,3%) была низкая способность к биопленкообразованию, у 21 (51,3%) - умеренная способность и у 1 (2,4%) - высокая.
- У пациентов с кандидозом СОР уровень концентрации ICAM-1 в РЖ составлял $8,51 \pm 0,5$ ng/ml, что статистически достоверно ($p < 0,001$) отличало его от показателя в контрольной группе без кандидоза СОР ($4,51 \pm 0,32$ ng/ml).

- У пациентов с кандидозным стоматитом (n=67) уровень концентрации ICAM-1 в слюне менялся в зависимости от способности грибов рода *Candida* формировать биопленку и был достоверно выше ($p < 0,01$) в группе с биопленкообразующими штаммами ($9,54 \pm 0,7$ ng/ml), чем с биопленконеобразующими ($6,89 \pm 0,55$ ng/ml). Причем, в группе лиц с кандидозом СОР, вызванным биопленкообразующими штаммами с низкой способностью к биопленкообразованию у грибов, в сравнении с группой пациентов с умеренной способностью отмечались более низкий показатель уровня белка РЖ ($7,66 \pm 0,53$ ng/ml по сравнению с $10,35 \pm 0,83$ ng/ml, $p < 0,01$).

Литература

- Карпук И. Ю. Биомаркеры протезного стоматита. Стоматол. журн. 2017; 18, №2: 104–107.
- Сахарук Н.А., Козловская А. А. Кандидоз: этиология, клиника, диагностика, лечение. Витебск: ВГМУ, 2010: 192 с.
- Emami E., Hanan T., Pierre de Grandmont et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. Int. J. Prosthodont. 2012; 25, № 2: 113–119.
- Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит., 2009: 464 с.
- Erwig, L.P., Gow, N.A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. Nat. Rev. Microbiol. 2016; 14: 163–176.
- John, F.K., B. D Snarr, D.C. Sheppard al. The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. Front. Immunol. 2018; 8: 1968 – 1973. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01968.

7. Окулич В. К., Кабанова А. А., Плотников Ф. В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ, 2017: 300 с.
8. Колчанова Н. Э. Роль микрофлоры и ее способность формировать биопленку в патогенезе хронического периодонтита. Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2017; 16, №5: 127-135.
9. Taff, H.T. Nett J.E., Andes David R. Comparative analysis of Candida biofilm quantitation assays. *Med Mycol.* 2012; 50, №2: 214–218. DOI: 10.3109/13693786.2011.580016.
10. Lotte M., Dijck P.V. Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics.* 2013; 59: 251-264.
11. Toyohiro, T., Tetsuro O., Atsuko O. et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 586-594. DOI: 10.1034/j.1600-0714.2003.00015.x.
12. Hiroshi E., Hiroki N., Seicho M. et al. Intercellular adhesion molecule 1-dependent activation of interleukin 8 expression in Candida albicans-infected human gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73, №1: 622-626. DOI: 10.1128/IAI.73.1.622-626.2005
13. Lawson C., Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009; 61, №1: 22-32. DOI: 10.1016/s1734-1140(09)70004-0.
14. Cook-Mills J.M., Deem T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 77, №4: 487-95. DOI: 10.1189/jlb.0904554.
15. Герасимова А.А., Кабирова М.Ф., Герасимова Л.П. и др. Уровень сенсибилизации к аллергенам грибковой этиологии и состояние местного иммунитета при заболеваниях слизистой оболочки полости рта. *Проблемы стоматологии.* 2017; 13, №1: 56-60.
16. Siripen P., Teerakul A. Salivary cytokine profile in elders with Candida-related denture stomatitis. *Gerodontology.* 2015; 32, №2: 132-40. DOI: 10.1111/ger.12064.

Сведения об авторах:

Новиков Дмитрий Кузьмич – заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО "ВГМУ", д.м.н., профессор.

Карпук Иван Юрьевич – декан стоматологического факультета УО "ВГМУ", д.м.н.

Пожарицкая Анастасия Алексеевна – старший преподаватель кафедры терапевтической стоматологии с курсом ФПК и ПК УО "ВГМУ". nastya.pozhar@mail.ru

Поступила 17.09.2020 г.