

А.А. Ярцева, А.В. Степанов, А.Н. Гребенюк,
А.Е. Антушевич, В.Г. Антонов

Состояние микробиоценоза полости рта экспериментальных животных, подвергшихся комбинированному воздействию повреждающих факторов химиолучевой терапии

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. В экспериментальных исследованиях показано, что комбинированное воздействие на животных цитостатика цисплатина и краниокаудального гамма-облучения вызывает значительное повышение микробной обсемененности слизистой оболочки полости рта. Облучение в дозе 10 Гр вызывало значимый рост числа колоний β -гемолитического стрептококка, негемолитического стрептококка, стафилококка, энтеробактерий, анаэробов и кандид. В период разгара химиолучевого стоматита (15 сут после облучения) количество колоний негемолитического стрептококка, стафилококка, энтеробактерий возросло по сравнению с группой интактных животных в среднем в 3 раза, а наибольший рост (в 5 раз) выявлен у дрожжевых грибов *C. albicans* и *C. glabrata*. Облучение изменяло уровень катионных антимикробных пептидов в периферической крови крыс: содержание α -дефензина HNP 1-3 и кателицидина LL-37 снижалось на 30–40%, а β -дефензина hBD-3 незначительно повышалось. После комбинированного химиолучевого воздействия уровень α -дефензина HNP 1-3 и кателицидина LL-37 в крови крыс уменьшался в 1,7–1,8 раз, а содержание β -дефензина hBD-3 увеличивалось на 70%.

Ключевые слова: микробиоценоз, цисплатин, гамма-облучение, химиолучевой оральный мукозит, катионные антимикробные пептиды, дефензины, кателицидин.

Введение. Нормальная микрофлора человека имеет относительно постоянный количественный и видовой состав [3]. При воздействии различных отрицательных факторов (болезни, профессиональные вредности, стресс и т.п.), нередко происходят различные по глубине и длительности изменения в микроэкологической системе. Эти изменения могут иметь транзиторный (функционально-приспособительный) характер, но в далеко зашедших случаях формируется микробный дисбаланс – дисбактериоз [8].

Исследованиями последних лет была установлена роль микрофлоры в развитии инфекционно-воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта [6, 9]. В норме в полости рта присутствует резидентная аэробная и анаэробная флора, представляющая собой относительно «константу» конкретных микроорганизмов. Увеличение микробной обсемененности, изменение ассоциативных взаимоотношений, усиление размножения несвойственных для здоровой ротовой полости бактерий приводит к развитию её патологического состояния полости рта. Это особенно актуально для онкологических заболеваний, поскольку развитие дисбактериоза слизистой оболочки полости рта часто ограничивает возможности проведения химиолучевой терапии [2, 7, 10].

Показано, что микроорганизмы полости рта играют важную роль в развитии орального мукозита (стоматита), при этом особое значение в патогенезе данного

осложнения отводят грибковой микрофлоре [22, 23, 25]. Патофизиологической основой нарушений нормального состава микрофлоры является, главным образом развитие иммунной дисфункции и, прежде всего, функциональной дезорганизацией фагоцитов [4, 13]. Особое место среди факторов иммунитета, опосредованного активацией фагоцитов, занимают антимикробные пептиды, являющиеся, с одной стороны, естественными эндогенными антибиотиками, а с другой – сигнальными молекулами, вовлечёнными в процессы активации клеток иммунной системы и репарации тканей [17, 24].

Цель исследования. Изучение состояния микробиоценоза слизистой оболочки полости рта и оценка содержания катионных антимикробных пептидов α -дефензина HNP 1-3, кателицидина LL-37 и β -дефензина hBD-3 в крови экспериментальных животных, подвергшихся комбинированному воздействию повреждающих факторов химиолучевой терапии.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на 150 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово» (Ленинградская обл.) и выдержанных в течение 14 сут до начала эксперимента в карантине.

Животных содержали в стандартных условиях вивария, кормление осуществляли *ad libitum* в первой половине дня. Исследования проводили согласно требованиям нормативно-правовых документов о порядке проведения экспериментальных работ с применением лабораторных животных.

Комбинированное химиолучевое воздействие моделировали введением экспериментальным животным цитостатика алкилирующего действия цисплатина с последующим (через 24 ч) краниокаудальным гамма-облучением крыс в дозе 10 Гр. Цисплатин фирмы «Teva» (Израиль) вводили однократно подкожно в дозе 7,0 мг/кг (максимально переносимая доза для данного вида животных). Облучение осуществляли с помощью исследовательской установки «ИГУР-1» с источником гамма-квантов ^{137}Cs при мощности дозы 21,07 Гр/мин.

Животные были разделены на три подопытные группы по 30 крыс в каждой: 1 группа – интактные животные (не подвергавшиеся облучению и/или химическому воздействию); 2 группа – животные, подвергнутые краниокаудальному гамма-облучению в дозе 10 Гр; 3 группа – животные, подвергнутые комбинированному (химиолучевому) воздействию: за 24 ч до облучения введение цисплатина в дозе 7,0 мг/кг + облучение в дозе 10 Гр. В ходе эксперимента животных наблюдали в течение 30 сут после облучения, ежедневно оценивая общее состояние (двигательную активность, пищевую возбудимость, изменение массы тела) и клиническую картину мукозита (стоматита) слизистой оболочки полости рта.

Получение материала для микробиологических исследований осуществляли при помощи стерильных тампонов. Мазок делали непосредственно с поверхности слизистой оболочки полости рта (языка и десен). Далее тампон помещали в пробирку со стерильным физиологическим раствором (1 мл), из которого в последующем готовили разведения 1:10, 1:100, 1:1000. Содержимое пробирок от каждого разведения высевали на питательные среды: Эндо, Плоскирева, Сабуро, Вильсон–Блера, Клигера, энтерококковый агар, 5% кровяной агар, кровяной анаэробный бактоагар, агар для лактобактерий, агар для бифидобактерий, мясо-пептонный агар, желточно-солевой агар, агаризованная среда Гаузе № 2, среда для контроля стерильности, обогащённая 10% среда 199. Для культивирования анаэробных микроорганизмов использовали микроанаэроостаты «Anaerobic plus system» (Oxoid, Великобритания). В качестве бескислородного газа применяли трёхкомпонентную газовую смесь, содержащую 80% азота, 10% водорода и 10% углекислого газа, с примесью молекулярного кислорода не более 0,01%. Состав смеси был паспортизован специализированной лабораторией Специального конструкторского бюро аналитического приборостроения Российской академии наук (Санкт-Петербург). Отбор материала для дальнейших биохимических и микробиологических исследований проводили до лучевого или химиолучевого воздействия и на 15 сутки после

облучения. Результаты микробиологических исследований выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ), а именно в десятичном логарифме, взятом от количества КОЕ.

Оценку врожденного иммунитета проводили по динамике уровня антимикробных пептидов α -дефензина HNP 1-3, кателицидина LL-37 и β -дефензина hBD-3 в сыворотке крови лабораторных животных. Содержание антимикробных пептидов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью диагностических наборов «Hycult Vyotechnology» (Нидерланды) согласно прилагаемым инструкциям.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. Рассчитывали среднее значение и ошибку среднего ($X \pm m_x$). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Показано, что развитие экспериментального орального мукозита как при изолированном гамма-облучении, так и при комбинированном химиолучевом воздействии сопровождалось значительным повышением уровня микробной обсемененности слизистой оболочки полости рта (табл. 1).

Установлено, что у интактных животных в мазках со слизистой оболочки полости рта высевались β -гемолитический стрептококк ($2,4 \pm 0,25$), негемолитический стрептококк ($1,9 \pm 0,1$), стафилококки ($2,0 \pm 0,1$), а также энтеробактерии и анаэробы (до 60–80 клеток в мазке).

На 15 сут после облучения крыс в дозе 10 Гр количество колоний β -гемолитического стрептококка, негемолитического стрептококка и стафилококка возросло в среднем в 2–2,5 раза по сравнению с животными, не подвергавшимися облучению. Еще более выраженные изменения выявлены в уровне микробной обсемененности энтеробактериями (в 3,5 раза), анаэробами (в 3,4 раза) и кандидами (в среднем в 3 раза).

Дополнительное к лучевому, воздействие на экспериментальных животных цитостатика цисплатина приводило к еще большему росту содержания изучаемых микроорганизмов на слизистой оболочке полости рта крыс. В период разгара химиолучевого стоматита (15 сут после облучения) количество колоний негемолитического стрептококка, стафилококка, энтеробактерий возросло по сравнению с группой интактных животных более, чем в 3–4 раза. Наибольший рост (более чем в 5 раз) выявлен у кандид. Так, *C. albicans* и *C. glabrata* высевались практически у 90% животных, подвергнутых комбинированному химиолучевому воздействию. Количество колониеобразующих единиц в группе «цисплатин+облучение» возросло по сравнению с группой «облучение» в среднем на 1–2 логарифма.

Как известно, особое место среди продуктов ак-

Таблица 1

Спектр микрофлоры слизистой оболочки полости рта крыс, подвергнутых воздействию факторов химической и радиационной природы, $X \pm m_x$

Вид микроорганизма	Количество микроорганизмов, выявляемых на слизистой оболочке полости рта крыс до и после лучевого и химиолучевого воздействия, lg КОЕ		
	до воздействия (интактные животные)	облучение	цисплатин + облучение
β -гемолитический стрептококк	2,4 \pm 0,3	4,6 \pm 0,2*	6,5 \pm 0,3*#
Негемолитический стрептококк	1,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2*	5,6 \pm 0,2*#
Стафилококк	2,0 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1*	6,2 \pm 0,2*#
Энтеробактерии	70 клеток в мазке	3,6 \pm 0,2*	4,8 \pm 0,2*#
Кандиды (<i>C. albicans</i> и <i>C. glabrata</i>)	не определяются	3,1 \pm 0,1*	5,4 \pm 0,2*#
Анаэробы	60–80 клеток в мазке	3,4 \pm 0,2*	4,4 \pm 0,2*#

Примечание: * – различия с группой интактных животных; # – с группой облучение, $p \leq 0,05$; $n=30$ в каждой группе.

тивированных фагоцитов занимают антимикробные пептиды, являющиеся, с одной стороны, естественными эндогенными антибиотиками, а с другой – сигнальными молекулами, вовлечёнными в процессы активации клеток иммунной системы и репарации тканей [15, 21]. В настоящее время охарактеризованы сотни эндогенных антимикробных пептидов различных групп, большинство из которых являются катионными, ассоциированными с гранулами полипептидов [5]. Наиболее полно на сегодняшний день изучены кателицидин LL-37 (hCAP18), β -дефензин (hBD-3) и α -дефензин (HNP 1-3), являющиеся полностью идентифицированными человеческими антимикробными пептидами, проявляющими иммунорегуляторное действие и антимикробную активность против грамм-отрицательных и грамм-положительных бактерий, а также кандид и вирусов [4, 5, 12].

Предположив, что нарушение синтеза антимикробных пептидов может быть одной из причин иммунной дисфункции при химиолучевых стоматитах, нами были изучены особенности их секреции в кровь (табл. 2).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, изолированное облучение экспериментальных животных вызывает снижение количества α -дефензина HNP 1-3 (в среднем на 30%) и кателицидина LL-37 (в 1,4 раза) в крови крыс по сравнению с группой интактных животных. Аналогичный, но более выраженный

характер носили изменения в уровне антимикробных пептидов. Так, концентрация α -дефензина у животных группы «цисплатин + облучение» уменьшилась в среднем в 1,8 раза по сравнению с группой «интактные животные», а кателицидина LL-37 – почти вдвое.

Противоположный характер носила динамика уровня β -дефензина hBD-3. На 15-е сутки после облучения концентрация этого пептида не только не снижалась, но имела тенденцию к умеренному росту. В условиях комбинированного химиолучевого воздействия повышение количества hBD-3 в крови крыс носило более выраженный характер и достигло величин, превышающих уровень интактных животных в среднем на 70%.

Разнонаправленная динамика уровня α -дефензина HNP 1-3 и β -дефензина hBD-3 в плазме крови животных с химиолучевым мукозитом может быть обусловлена тем, что α -дефензины в основном продуцируются внутри фагосом макрофагов и нейтрофилов, тогда как β -дефензины – эпителиальными клетками [12]. Комбинированное воздействие на организм гамма-облучения и химических радиомиметиков, в том числе цисплатина, сопровождается угнетением костномозгового кроветворения, которое может приводить к существенному снижению в периферической крови пула нейтрофилов [1] и, как следствие, к уменьшению уровня секретируемых ими антимикробных пептидов – α -дефензина HNP 1-3 и кателицидина LL-37. Это

Таблица 2

Содержание α -дефензина HNP 1-3, β -дефензина hBD-3 и кателицидина LL-37 в сыворотке крови крыс, подвергнутых воздействию факторов химической и радиационной природы, $X \pm m_x$

Антимикробный пептид	Концентрация пептида в сыворотке крови, нг/мл		
	до воздействия (интактные животные)	облучение	цисплатин + облучение
α -дефензин HNP 1-3	49,2 \pm 5,7	37,1 \pm 2,5*	26,4 \pm 2,1*#
β -дефензин hBD-3	38,5 \pm 4,9	41,8 \pm 3,9	64,4 \pm 6,8*#
Кателицидин LL-37	4,5 \pm 0,6	3,2 \pm 0,7	2,3 \pm 0,2*

Примечание: * – различия с группой интактных животных; # – с группой облучение, $p \leq 0,05$; $n=20$ в каждой группе.

обусловлено их конститутивной экспрессией [16]. Что же касается β -дефензина hBD-3, его рост объясняется тем, что синтез осуществляется в основном эпителиальными клетками [19], а экспрессия индуцируется специфическими стрессорными факторами, такими как инфекция или воспаление [15, 17].

Рост количества микроорганизмов на слизистой оболочке полости рта в условиях химиолучевого мукозита невозможно объяснить только постлучевой гибелью нейтрофилов и макрофагов с последующим уменьшением пула антимикробных пептидов. По-видимому, комбинированное химиолучевое воздействие вызывает инактивацию внеклеточно секретируемых α -дефензинов. Показано [14], что одновременная с α -дефензинами секреция кателицидина LL-37 обеспечивает активную функциональную синергию антимикробных пептидов. Для нейтрализации микробов пептиды могут синергично действовать протеинами, лизоцимами, а также с традиционными антибиотиками. Некоторые антимикробные пептиды, помимо функционирования в качестве хемокинов и привлечения мигрирующих и циркуляторных клеток, ускоряют заживление ран через ангиогенез и эпителиальный рост [11, 18, 20].

Заключение. Комбинированное воздействие цисплатина и краниокаудального гамма-облучения вызывает у животных значительное повышение микробной обсемененности слизистой оболочки полости рта. В период разгара химиолучевого стоматита (15 сут после облучения) количество колоний негемолитического стрептококка, стафилококка и энтеробактерий возрастает по сравнению с группой интактных животных в среднем в 3 раза, но наибольший рост (в 5 раз) отмечается у дрожжевых грибов *C. albicans* и *C. glabrata*. Кроме того, после комбинированного химиолучевого воздействия в периферической крови животных наблюдается снижение уровня α -дефензина HNP 1-3 и кателицидина LL37 (hCAP18), а содержание β -дефензина hBD-3, напротив, повышается.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности поиска в ряду индукторов антимикробных пептидов – кателицидинов, α - и β -дефензинов, новых высокоэффективных средств профилактики и лечения лучевых и химиолучевых оральных мукозитов.

Литература

1. Алексеев, С.М. Современные подходы к фармакологической коррекции токсической нейтропении / С.М. Алексеев [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. академии. – 2008. – № 1 (21). – Прилож. – С. 175–181.
2. Антушевич, А.А. Патофизиологические основы эффективности глутоксида как средства сопровождения лучевой терапии рака носоглотки / А.А. Антушевич [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. академии. – 2013. – № 3 (43). – С. 32–37.
3. Воробьев, А.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции / А.А. Воробьев, Е.А.

- Лыкова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1999. – № 6. – С. 102–105.
4. Ковальчук, Л.В. Рецепторы врожденного иммунитета: подходы к количественной и функциональной оценке Toll-подобных рецепторов человека / Л.В. Ковальчук, М.В. Хорева, А.С. Варивода // Иммунология. – 2008. – № 4. – С. 223–227.
5. Кокряков, В.Н. Очерки о врожденном иммунитете / В.Н. Кокряков. – СПб.: Наука, 2006. – 261 с.
6. Левицкий, А.П. Физиологическая микробная система полости рта / А.П. Левицкий // Вестн. стоматол. – 2007. – № 1. – С. 6–11.
7. Масленникова, А.В. Термолучевая и химиолучевая терапия местно-распространенного рака глотки и гортани: автореф. дис. д-ра мед. наук / А.В. Масленникова. – Н. Новгород, 2008. – 47 с.
8. Рабинович, О.Ф. Изменение микробной флоры при патологии слизистой оболочки рта / О.Ф. Рабинович, И.М. Рабинович, Е.С. Абрамова // Стоматология. – 2011. – № 6. – С. 71–76.
9. Савичук, Н.О. Микроэкология полости рта, дисбактериоз и пути его коррекции / Н.О. Савичук, А.В. Савичук // Современная стоматология. – 2002. – № 4. – С. 9–12.
10. Цыган, В.Н. Фармакогенетика в онкологии: ингибиторы онкогенного сигналинга / В.Н. Цыган [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. академии. – 2008. – № 1 (21). – С. 150–164.
11. Bhat, S. Antimicrobial peptide in burn sand wounds / S. Bhat, S. Milner // Curr. protein pept. sci. – 2007. – Vol. 8. – P. 506–509.
12. Boman, H.G. Antibacterial peptides: basic fact san demerging concepts / H.G. Boman // J. intern. med. – 2003. – Vol. 254. – P. 197–215.
13. Bowdish, D.J. Impact of LL-37 on antiinfective immunity / D.J. Bowdish, Y.E. Davidson // J. leukocitol. biol. – 2005. – Vol. 77, № 4. – P. 451–459.
14. Chen, X. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / X. Chen [et al.] // J. dermatol. sci. – 2005. – Vol. 40. – P. 123–131.
15. De Smet, K. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins / K. De Smet, R. Contreras // Biotechnol. lett. – 2005. – Vol. 27. – P. 1337–1347.
16. Hancock, R.E. The role of antimicrobial peptides in animal defenses / R.E. Hancock, M.G. Scott // Proc. natl. acad. sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 8856–8861.
17. Hata, T.R. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis / T.R. Hata, R.L. Gallo // Semin. cutan. med. surg. – 2008. – Vol. 27. – P. 144–150.
18. Heilborn, J.D. The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in reepithelization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium / J.D. Heilborn, M.F. Nilsson, A. Kratz // J. investigat. dermatol. – 2003. – Vol. 120. – P. 379–389.
19. Hirsch, T. Human beta-defensin-3 promotes two and healing in infected diabetic wounds / T. Hirsch [et al.] // J. genet. med. – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 220–228.
20. Jacobsen, F. Transient cutaneous adenoviral gene therapy with human host defense peptide hCAP-18/LL-37 is effective for the treatment of burn wound infections // Gene ther. – 2005. – Vol. 12, № 20. – P. 1494–1502.
21. Lee, H.Y. LL-37 inhibits serum amyloid A-induced IL-8 production in human neutrophils / H.Y. Lee [et al.] // Exp. mol. med. – 2009. – Vol. 41. – P. 325–332.
22. Ramirez-Amador, V. Candida colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy / V. Ramirez-Amador [et al.] // Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. & endodontix. – 1997. – Vol. 84. – P. 149–153.
23. Redding, S. Candida dubliniensis in radiation-induced oropharyngeal candidiasis / S. Redding [et al.] // Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. & endodontix. – 2001. – Vol. 91. – P. 659–662.

24. Sieprawska, L.M. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus* – derived proteinases / L.M. Sieprawska [et al.] // *Antimicrob. agents chemother.* – 2004. – Vol. 48, № 12. – P. 4673–4679.
25. Sonis, S.T. Oral mucositis in cancer therapy / S.T. Sonis // *J. support oncology.* – 2004. – Vol. 2. – P. 3–8.
-

A.A. Yartseva, A.V. Stepanov, A.N. Grebenyuk, A.E. Antushevich, V.G. Antonov

Microbiocenosis of oral cavity in experimental animals exposed to damaging factors of chemoradiotherapy

Abstract. Experimental studies have shown that the combined effect on animals of cytostatic (cisplatin) and cranio-caudal gamma-irradiation causes a significant increase in microbial contamination of the oral mucosa. Irradiation in a dose of 10 Gy caused significant growth of number of colonies of β -hemolytic streptococcus, non-hemolytic streptococcus, staphylococci, enterobacteria, anaerobi and candidi. At the height of chemoradiation stomatitis (on the 15th day after irradiation) the number of colonies of non-hemolytic streptococci, staphylococci, enterobacteria increased by an average of 3 times in comparison with the group of intact animals. The highest growth (5 times) was detected in yeasts *C. albicans* and *C. glabrata*. Irradiation changed a level of cationic antimicrobial peptides in peripheral blood of rats: the contents of α -defensin HNP 1-3 and cathelicidin LL-37 was reduced by 30–40%, and β -defensin hBD-3 insignificantly raised. After combined chemoradiation therapy the level of α -defensin HNP 1-3 and cathelicidin LL-37 in the blood of rats were decreased in 1,7–1,8 times, but level of β -defensin hBD-3 was increased by 70%.

Key words: microbiocenosis, cisplatin, gamma-irradiation, experimental chemoradiation oral mucositis, cationic antimicrobial peptides, defensins, cathelicidin.

Контактный телефон: 8 (921) 965-60-08; e-mail: antu-anna@yandex.ru