

DOI: 10.56871/RBR.2023.97.69.004

УДК 616.98+578.8+616.314-008.1-036.1-08+579.61+691.175+678

ОЦЕНКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* НА МАТЕРИАЛАХ, ИСПОЛЗУЕМЫХ В СТОМАТОЛОГИИ

© Анна Владимировна Зачиняева¹, Ярослав Васильевич Зачиняев², Дмитрий Павлович Гладин¹, Илья Андреевич Баранов³, Анна Сергеевна Набиева¹, Олег Геннадьевич Горбунов¹, Анна Николаевна Андреева¹

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

² Петрозаводский государственный университет. 185910, Российская Федерация, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова. 195067, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47; 191015, ул. Кирочная, 41

Контактная информация: Анна Владимировна Зачиняева — д.б.н., профессор, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. E-mail: anvz60314@gmail.com ORCID ID: 0000-0003-1521-3060 SPIN: 5208-2419

Для цитирования: Зачиняева А.В., Зачиняев Я.В., Гладин Д.П., Баранов И.А., Набиева А.С., Горбунов О.Г., Андреева А.Н. Оценка адгезивных свойств грибов рода *Candida* на материалах, используемых в стоматологии // Российские биомедицинские исследования. 2023. Т. 8. № 4. С. 27–31. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.97.69.004>

Поступила: 15.09.2023

Одобрена: 08.11.2023

Принята к печати: 20.12.2023

Резюме. Введение. Акриламидные пластмассы широко используются в ортопедической стоматологии. Исследования их восприимчивости к микробной адгезии актуальны, поскольку изготовленный на основе этих полимеров реставрационный материал может стать резервуаром для микроорганизмов, которые могут поражать периимплантные ткани и вызывать воспаление. **Целью исследования** было проверить адгезионную способность клинических штаммов грибов рода *Candida* к образцам акриламидных пластмасс. **Материалы и методы.** Исследовано 50 клинических штаммов грибов рода *Candida* на предмет образования биопленок при культивировании на акриламидных пластмассах. Образцы пластмасс обрабатывали инокулятом культур грибов в течение 48 ч при 37 °С. Количественной оценкой биомассы сформировавшихся пленок были значения их оптической плотности ($\lambda=560$ нм). **Результаты исследования.** Количественный анализ биомассы биопленки показал, что через 48 ч все штаммы грибов образовали биопленку на поверхности тестируемых полимерных дисков. Самые высокие количественные значения биомассы биопленок были отмечены при культивировании *C. albicans*. **Заключение.** Было отмечено, что тип материала не является ключевым фактором ограничения роста для *C. albicans*. Необходим комплекс мероприятий, сочетающий оптимальные методы механической обработки с использованием антимикробных препаратов для предотвращения образования и накопления биопленок.

Ключевые слова: грибы рода *Candida*; *Candida albicans*; биопленки; акриламидные пластмассы.

EVALUATION OF THE GENUS *CANDIDA* FUNGI ADHESIVE PROPERTIES ON THE MATERIALS USED IN DENTISTRY

© Anna V. Zachinyaeva¹, Yaroslav V. Zachinyaev², Dmitriy P. Gladin¹, Ilya A. Baranov³, Anna S. Nabieva¹, Oleg G. Gorbunov¹, Anna N. Andreeva¹

¹ Saint Petersburg State Pediatric Medical University. Lithuania 2, Saint Petersburg, Russian Federation, 194100

² Petrozavodsk State University. Lenin str. 33, Petrozavodsk, Russian Federation, Republic of Karelia, 185910

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. Piskarevskiy pr. 47, 195067, Kirochnaya str., 41, 191015, Saint Petersburg, Russian Federation

Contact information: Anna V. Zachinyaeva — Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of microbiology, virology and immunology. E-mail: anvz60314@gmail.com ORCID ID: 0000-0003-1521-3060 SPIN: 5208-2419

For citation: Zachinyaeva AV, Zachinyaev YaV, Gladin DP, Baranov IA, Nabieva AS, Gorbunov OG, Andreeva AN. Evaluation of the genus *Candida* fungi adhesive properties on the materials used in dentistry // Russian biomedical research (St. Petersburg). 2023;8(4):27-31. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.97.69.004>

Received: 15.09.2023

Revised: 08.11.2023

Accepted: 20.12.2023

Abstract. Introduction. Acrylamide plastics are widely used in orthopedic dentistry. Studies of their susceptibility to microbial adhesion are relevant, since the restorative material made on the basis of these polymers can become a reservoir for microorganisms that can infect peri-implant tissues and cause inflammation. **The purpose of the study** was to test the adhesive ability of clinical strains of *Candida* to samples of acrylamide plastics. **Materials and methods.** 50 clinical strains of *Candida* fungi have been studied for the formation of biofilms during cultivation on acrylamide plastics. Plastic samples were treated with an inoculum of fungal cultures for 48 h at 37 °C. The values of their optical density ($\lambda=560$ nm) were a quantitative assessment of the biomass of the formed films. **The results of the study.** Quantitative analysis of the biofilm biomass showed that after 48 h all fungal strains formed a biofilm on the surface of the tested polymer discs. The highest quantitative values of the biofilm biomass were noted in the cultivation of *C. albicans*. **Conclusion.** It was noted that the type of material is not a key growth restriction factor for *C. albicans*. A set of measures is needed that combines optimal mechanical processing methods with the use of antimicrobial drugs to prevent the formation and accumulation of biofilms.

Key words: fungi of the genus *Candida*; *Candida albicans*; biofilms; acrylamide plastics.

ВВЕДЕНИЕ

Ротовая полость является важнейшим биотопом человеческого организма, заселенным разнообразной микрофлорой, которая представлена более чем 700 видами микроорганизмов и играет уникальную роль во взаимодействии организма человека с окружающим его миром [6]. В полости рта обитает специфическая микробиота, которая имеет тенденцию колонизировать поверхности зубов, языка и слизистой оболочки полости рта, мягкие ткани, зубные имплантаты и реставрационные материалы.

Микроорганизмы, колонизирующие полость рта, живут в основном в биотопах, в которых происходит образование биопленки. В составе биопленок микробы обладают рядом преимуществ (устойчивость к факторам иммунитета, антибиотикам и др.) перед свободноживущими видами, что способствует развитию различных заболеваний полости рта, таких как кариес, заболевания пародонта, инфекции, связанные с имплантатами, кандидоз ротоглотки. В зубных имплантатах инфекция полимикробной биопленки считается основной причиной периимплантных заболеваний. Оральные стрептококки, такие как *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* и *Streptococcus mitis*, считаются «пионерами» колонизации с последующим образованием зубного налета [11], в котором, наряду с бактериями, принимают участие и грибы. Так, ротовую полость колонизируют различные виды грибов рода *Candida*, которые чаще всего ассоциируются с поражениями слизистой оболочки полости рта. К наиболее распространенным видам относятся *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* и *Candida dubliniensis*, среди которых нередко встречаются антибиотикорезистентные штаммы [1, 4]. Показано, что грибы рода *Candida* обладают выраженными адгезивными свойствами и способны адсорбироваться на биотических и абиотических поверхностях, в том числе зубных протезах из акриловой смолы. Адгезия и колонизация представляют собой первый и крайне важный

этап инфекционного процесса, лежащий в основе формирования биопленки не только на слизистых оболочках, но и на поверхности медицинских девайсов [3], что может привести к развитию инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Способность к образованию биопленок грибами рода *Candida* в настоящее время рассматривается как важнейший фактор вирулентности [5], реализация действия которого приводит к серьезным проблемам в клинической практике. Грибы рода *Candida* в биопленках обладают повышенной резистентностью к противогрибковой терапии, а также способностью противостоять некоторым иммунным факторам хозяина.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования состояла в изучении адгезивной способности клинических изолятов грибов рода *Candida* на образцах акриламидных пластмасс, используемых для протезирования в стоматологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы метилметакрилатной пластмассы Белакрил-М ХО (Россия), этилметакрилатной пластмассы Белакрил-Э ХО (Россия) и материал Протакрил-М (Украина). В исследование было включено по 10 образцов каждого материала диаметром 20 мм и высотой 8 мм. Исследовано 50 штаммов грибов рода *Candida*: *C. albicans* — 23, *C. tropicalis* — 14, *C. krusei* — 8, *C. glabrata* — 5. Все штаммы первоначально культивировали на 5% кровяном агаре (24 ч при 37 °C) для получения отдельных колоний. Для приготовления инокулята культуры суспендировали в жидкой среде Сабуро (Биомедиа) до оптической плотности $D_{600} 0,025 \pm 0,005$ (NanoPhotometer N60-Touch, Германия). Тестируемые образцы помещали в планшеты (Fudau Biotechnology, Россия), в которые вносили 2 мл инокулята. Культивирование проводили в течение 48 ч при 37 °C. После инкубации образцы дважды тщательно промывали

Таблица 1

Количественные характеристики биомассы биопленки на основе значений поглощения в зависимости от типа реставрационного материала

Table 1

Quantitative characteristics of biofilm biomass based on absorption values depending on the type of restoration material

Материал / Material	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Белакрил-М ХО / Belacril-M HO	2,62	1,29	1,54	1,9
Белакрил-Э ХО / Belacril-E HO	2,07	1,43	1,8	1,54
Протакрил-М / Protacril-M	2,19	2,0	2,04	1,62

Таблица 2

Количество жизнеспособных микроорганизмов в биопленках, выраженное в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл)

Table 2

Number of viable microorganisms in biofilms, expressed in colony forming units (CFU/ml)

Материал / Material	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Белакрил-М ХО / Belacril-M HO	5,87×10 ⁶	1,63×10 ⁶	2,28×10 ⁶	2,86×10 ⁶
Белакрил-Э ХО / Belacril-E HO	5,14×10 ⁶	1,80×10 ⁶	2,62×10 ⁶	2,24×10 ⁶
Протакрил-М / Protacril-M	5,99×10 ⁶	3,05×10 ⁶	3,14×10 ⁶	2,24×10 ⁶

фосфатно-буферным раствором (ФБР) pH 5,0 для удаления планктонных клеток. Биомассу биопленки оценивали по методу [2] в нашей модификации: окрашенную раствором генцианвиолета биопленку экстрагировали этанолом, декантировали, разводили в 20 раз и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «ПЭ-5400 УФ» при длине волны 560 нм. В качестве отрицательного контроля использовались стерильные диски.

Количество жизнеспособных микроорганизмов в биопленке определяли путем подсчета КОЕ (колониеобразующих единиц). После формирования биопленки образцы трижды тщательно промывали 1 мл ФБР для удаления несвязанных клеток. Затем их помещали в центрифужные пробирки, содержащие 1 мл ФБР, интенсивно перемешивали в течение 2 мин на шейкере (LAUDA Varioshake VS 15 R, Германия) для рассеивания клеток, прикрепленных к поверхности дисков. Клеточную суспензию из каждого образца в трехкратной повторности последовательно десятикратно разводили в ФБР и наносили на агар Сабуро. Инкубирование проводили при 37 °С в течение 48 ч. Количество жизнеспособных клеток, образовавших колонии, выражали в КОЕ/мл. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ STATISTICA 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественный анализ биомассы биопленки показал, что через 48 ч все штаммы грибов образовали биопленку на поверхности тестируемых полимерных дисков. Самые высокие количественные значения биомассы биопленок были отмечены при культивировании *C. albicans* (табл. 1).

Высокие количественные значения биомассы биопленок при культивировании *C. albicans* во многом связаны с высокой адгезионной активностью этих грибов. По сравнению с другими видами рода *Candida*, как отмечается рядом авторов, *Candida albicans* образует сложные биопленки, состоящие из сливающегося базального слоя бластоспор, покрытого толстым матриксом, состоящим из внеклеточного материала и гиф. Другие изоляты образуют только базальный слой бластоспор [8, 10]. Морфологический переход культуры *C. albicans* из дрожжевой формы в мицелиальную — один из основных факторов вирулентности, поскольку способствует не только значительному распространению культуры по поверхности полимерного материала, но и повреждению слизистой оболочки ротовой полости кислыми протеазами.

Результаты подсчета живых клеток, выделенных из биопленок, соответствовали динамике образования биомассы биопленки различными видами грибов рода *Candida* (табл. 2).

Было отмечено, что тип материала не является ключевым фактором ограничения роста для *C. albicans*. Отмечалось снижение роста *C. glabrata* и *C. tropicalis* на материале Белакрил-М ХО.

Выживаемость *C. albicans* на полимерных материалах обусловлена способностью формировать внеклеточный полимерный матрикс, который обволакивает клетки и псевдогифы гриба, таким образом защищая гриб от ингибирующих факторов [12].

Акриламидные пластмассы являются наиболее часто используемыми полимерными материалами в стоматологии. Тем не менее нет обширных исследований по образованию биопленки на этих материалах. Микроорганизмы, адгезированные на зубных имплантатах и других протезах, могут быть причиной

различных инфекционных процессов, в частности способствовать патологии пульпы [7, 9]. Интенсивное образование биопленки на реставрационных материалах в полости рта обнаруживается уже через сутки и даже при временной реставрации может способствовать ухудшению состояния полости рта, что требует проведения мероприятий для предотвращения накопления микроорганизмов и образования биопленки.

ВЫВОДЫ

Выявлена высокая способность всех изученных видов грибов рода *Candida* к быстрому образованию биопленки на поверхности всех исследуемых образцов акриламидных пластмасс, при этом самые высокие количественные показатели ее биомассы были характерны для *Candida albicans*. Интенсивное образование биопленки грибов на используемых материалах при проведении реставрационных работ в ротовой полости является фактором риска развития инфекционных осложнений. Для ее эффективной санации необходим комплекс мероприятий, сочетающий оптимальные методы механической обработки с использованием антимикробных препаратов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова Е.А., Косякова К.Г. Грибы рода *Candida* — возбудители инфекционных состояний. *Здоровье — основа человеческого потенциала*. 2019; 14(1): 455–9.
2. Зачиняева А.В., Зачиняев Я.В. Действие полигексаметиленгуанидина на активность каталазы гриба *Pyricularia oryzae*. *Успехи медицинской микологии*. 2022; 23: 245–6.
3. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Косякова К.Г. и др. Чувствительность к антибиотикам энтеробактерий, выделенных в двух стационарах двух районов Санкт-Петербурга. *Проблемы медицинской микологии*. 2017; 19(1): 34–42.
4. Козлова Н.С., Нестерова Е.В., Васильев О.Д., Селезнева А.А. Спектры устойчивости к антифунгальным препаратам штаммов *Candida spp.*, выделенных в кожно-венерологическом диспансере. *Успехи медицинской микологии*. 2023; 24: 221–5.
5. Козлова Н.С., Нестерова Е.В., Трофимова Н.Н. и др. Антибиотикорезистентность штаммов *Candida spp.*, выделенных у больных дерматозами. *Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2021; 16(2): 429–35.
6. Кузьмина Д.А., Новикова В.П., Шабашова Н.В., Оришак Е.А. *Candida spp.* и микробиоценоз полости рта у детей с декомпенсированной формой кариеса. *Проблемы медицинской микологии*. 2011; 13(1): 23–7.
7. Bertolini M., Costa R.C., Barão VAR. Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms*. 2022; 10(12): 2413.
8. Cássia M. de Souza, Murilo M. dos Santos, Luciana Furlaneto-Maia. Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: what do we know? *Canadian Journal of Microbiology*. 2023; 69(6): 207–18.
9. Engel A.S., Kranz H.T., Schneider M. et al. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*. 2020; 20 (1): 162.
10. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infect Immun*. 2002; 70(2): 878–88.
11. Mazurek-Popczyk J., Nowicki A., Arkusz K. et al. Valuation of biofilm formation on acrylic resins used to fabricate dental temporary restorations with the use of 3D printing technology. *BMC Oral Health*. 2022; 22(1): 442.
12. Paulone S., Malavasi G., Ardizzoni A. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouth-washes: an in vitro study. *New Microbiologica*. 2017; 40(1): 45–52.

REFERENCES

1. Antonova Ye.A., Kosyakova K.G. Griby roda *Candida* — возбудители инфекционных состояний. *Zdorov'ye — osnova chelovecheskogo potentsiala*. [Fungi of the genus *Candida* are causative agents of infectious conditions. *Health is the foundation of human potential*]. 2019; 14(1): 455–9. (in Russian).
2. Zachinyayeva A.V., Zachinyayev Ya.V. Deystviye poligeksametilenguanidina na aktivnost' katalazy griba *Pyricularia oryzae*. [Effect of polyhexamethylene guanidine on the activity of catalase in the fungus *Pyricularia oryzae*]. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2022; 23: 245–6. (in Russian).
3. Kozlova N.S., Barantsevich N.Ye., Kosyakova K.G. i dr. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam enterobakteriy, vydelennykh v dvukh stat-



- sionarakh dvukh rayonov Sankt-Peterburga. [Antibiotic sensitivity of enterobacteria isolated in two hospitals in two districts of St. Petersburg]. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2017; 19(1): 34–42. (in Russian).
4. Kozlova N.S., Nesterova Ye.V., Vasiliyev O.D., Selezneva A.A. Spektry ustoychivosti k antifungal'nym preparatam shtammov *Candida* spp., vydelennykh v kozhno-venerologicheskom dispansere. [Spectra of resistance to antifungal drugs of *Candida* spp. strains isolated in the dermatovenerological dispensary]. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2023; 24: 221–5. (in Russian).
 5. Kozlova N.S., Nesterova Ye.V., Trofimova N.N. i dr. Antibiotikorezistentnost' shtammov *Sandida* spp., vydelennykh u bol'nykh dermatozami. Zdorov'ye — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ikh resheniya. [Antibiotic resistance of *Candida* spp. strains isolated from patients with dermatoses. Health is the basis of human potential: problems and ways to solve them]. 2021; 16(2): 429–35. (in Russian).
 6. Kuz'mina D.A., Novikova V.P., Shabashova N.V., Orishak Ye.A. *Candida* spp. i mikrobotsenoz polosti rta u detey s dekompensovannoy formoy kariyesa. [Candida spp. and microbiocenosis of the oral cavity in children with decompensated forms of caries]. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2011; 13(1): 23–7. (in Russian).
 7. Bertolini M., Costa R.C., Barão VAR. Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms*. 2022; 10(12): 2413.
 8. Cássia M. de Souza, Murilo M. dos Santos, Luciana Furlaneto-Maia. Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: what do we know? *Canadian Journal of Microbiology*. 2023; 69(6): 207–18.
 9. Engel A.S., Kranz H.T., Schneider M. et al. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*. 2020; 20 (1): 162.
 10. Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infect Immun*. 2002; 70(2): 878–88.
 11. Mazurek-Popczyk J., Nowicki A., Arkusz K. et al. Valuation of biofilm formation on acrylic resins used to fabricate dental temporary restorations with the use of 3D printing technology. *BMC Oral Health*. 2022; 22(1): 442.
 12. Paulone S., Malavasi G., Ardizzoni A. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. *New Microbiologica*. 2017; 40(1): 45–52.