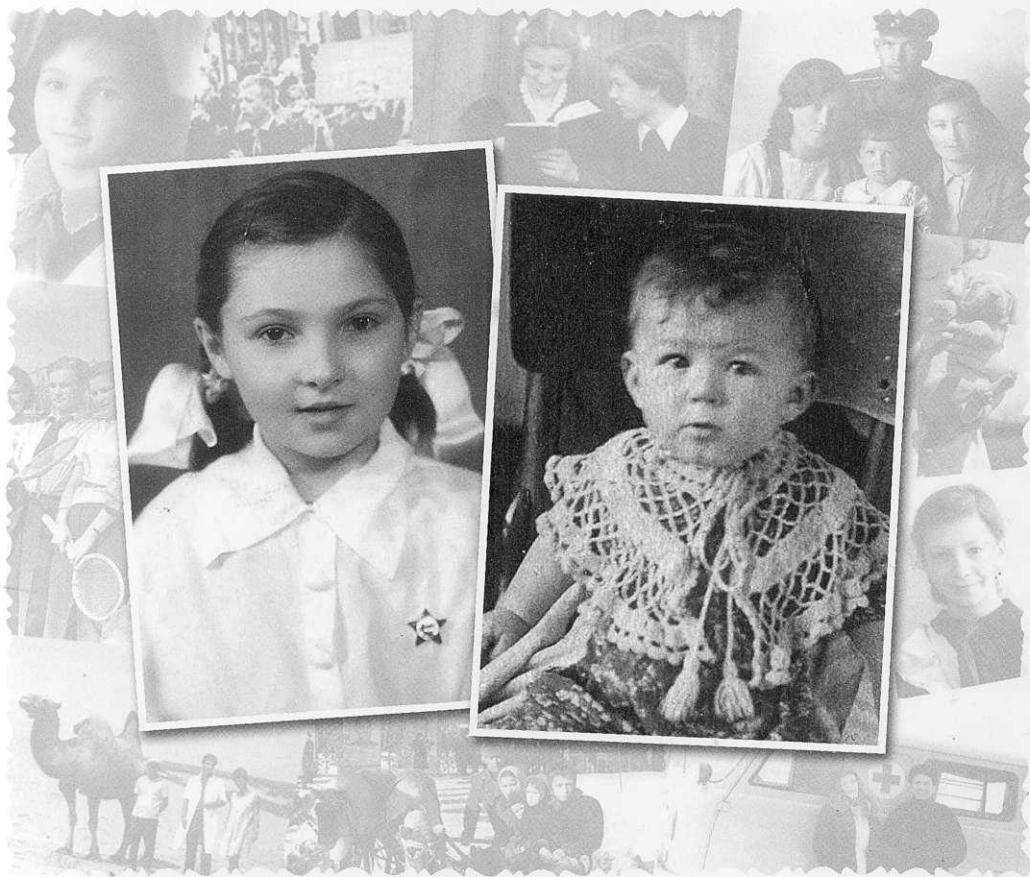


МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# Педиатрия

Восточная Европа

№ 3 (11) 2015



ISSN 2307-4345



9 772 307 434 000



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ  
ИЗДАНИЯ

Savichuk N.<sup>1</sup>, Beketova G.<sup>1</sup>, Savichuk A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Shupyk National Medical Academy of Post-Graduate Education, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> O. Bogomolets National Medical University, Kiev, Ukraine

Савичук Н.О.<sup>1</sup>, Бекетова Г.В.<sup>1</sup>, Савичук А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П.Л. Шупика, Киев, Украина

<sup>2</sup> Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

## Characteristics of pathogenesis of acute and recurrent oral candidiasis under experimental conditions (part 1)

Особенности патогенеза острого и рецидивирующего кандидоза полости рта в условиях эксперимента (часть 1)

### Abstract

An experimental model of chronic oral candidiasis, which adequately reproduces the recurrence of the disease and can be used to study the major pathogenic mechanisms of the disease and determine the effectiveness of antifungal drugs. Under the experimental conditions studied pathological changes that occur at different stages of infection in the mouth, the digestive system, liver, and spleen of experimental animals. The dynamics of the immune response during relapse of experimental oral candidiasis and stages of secondary immunodeficiency postinfection.

**Keywords:** experimental model in laboratory animals, oral candidiasis, chronic candidiasis, pathological changes postinfection laboratory markers of immune deficiency.

### ■ INTRODUCTION

Chronic lesions of oral mucosa is one of the topical problems of modern pediatric dentistry and gastroenterology due to its prevalence, severe clinical deployments and risks of recurrence. Traditionally, the most common agent of chronic lesions of oral mucosa are yeasts of genus *Candida*. The specific weight of candidal lesions of oral mucosa has increased significantly due to the augmentation of a number of severe and atypic clinical forms, which are resistant to traditional therapy, high risk of complications and infection generalization. The specified state of the problem is defined by total influence of several injurious factors: ecological, social and iatrogenic. The pathogenic speciality of candidiasis

### ■ ВВЕДЕНИЕ

Хронические поражения слизистой оболочки полости рта (СОПР) представляют собой одну из актуальных проблем современной детской стоматологии и гастроэнтерологии вследствие их значительной распространенности, тяжелых клинических проявлений, риска рецидивирования. Традиционно наиболее распространенными возбудителями хронических поражений СОПР у детей являются грибы рода *Candida*. Удельный вес кандидозных поражений СОПР существенно возрос за счет увеличения количества тяжелых и атипичных клинических форм, резистентных к традиционной терапии, высокого риска возникновения осложнений и генерализации

as a chronic infectious disease is desintegration of anti-infective resistention mechanisms. And this is the character of these disorders, which defines a disease clinical course and infection generalization risks in patients with local lesion forms [1–6].

Aim of the research: studying pathological characteristics of chronic oral candidiasis under conditions of adequate experimental modeling.

## RESEARCH MATERIALS AND METHODS

### Characteristics of experimental material and procedure of the experiment

The essence of the experimental research lied in: extrapolation criteria selection; object and experimental animals optimal sample size defining; development and simulation of acute oral candidiasis model on the experimental animals, its modification and elaboration of infection recurrence model; histomorphological and immunological research complex implementation about clinical observations recurrency dynamics, and investigation of ethiotropic (antifungal) drugs combination efficiency on oral candidiasis recurrency model.

The research was performed on 71 Wistar white rats of both sexes at 7–75 days of its life. During the infection and clinical manifestation period of acute candidiasis, test groups rats were in suckling age (7–21 days of life), which is extrapolated on a traditional infecting period by specified agents in humans [7].

First-stage objective of experimental research are:

- 1) reproduction of acute candidiasis of oral mucosa on Wistar white rats;
- 2) implementation of oral candidiasis recurrency model implementation;
- 3) studying of disease morphogenesis and immunal response dynamics on experimental models, and determination of characteristics, inherent to this lesion form.

For candidiasis reproduction we used two-day-old strain culture of (ВКПГУ-1006/1869 *Candida albicans*), adapted for reproduction in rats' organism, which was obligingly provided by P.N. Kashkin Scientific Research Institute of Medical Mycology 10<sup>9</sup> (RAMS Scientific Research Laboratory of Fungal Morphology and Biology)

инфекции. Указанное состояние проблемы обусловлено совокупным влиянием целого ряда неблагоприятных факторов – экологических, социальных, ятрогенных. Ведь отличительной чертой патогенеза кандидоза как хронического инфекционного заболевания является дезинтеграция механизмов антиинфекционной резистентности. Именно характер этих нарушений определяет клиническое течение заболевания и риск генерализации инфекции у пациентов с местными формами поражения [1–6].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение патогенетических особенностей хронического кандидоза полости рта в условиях адекватного экспериментального моделирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика экспериментального материала и методик эксперимента

Суть экспериментального исследования заключалась в выборе критериев экстраполяции; определении объекта и оптимального объема выборки экспериментальных животных; отработке и воспроизведении на экспериментальных животных модели острого кандидоза полости рта, их модификация и создание модели рецидива инфекции; осуществлении комплекса гистоморфологических и иммунологических исследований в динамике рецидива клинических наблюдений, а также в изучении эффективности комбинаций этиотропных препаратов (противогрибковых) на модели рецидива хронического кандидоза полости рта (ХК ПР).

Исследование проведено на 71 белой крысе линии Вистар обоих полов на 7–75-м дне жизни. В период инфицирования и клинической манифестации острых форм кандидоза крысы подопытных групп находились в подсосном возрасте (7–21 дни жизни), который экстраполируется на традиционный период инфицирования человека указанными возбудителями [7].

Задачами первого этапа экспериментального исследования определили:

- 1) воспроизведение острой формы кандидоза СОПР на белых крысах линии Вистар;

(Saint Petersburg). Accumulation of *Candida* species yeasts biomass was implemented standantly by reseeded in Sabouraud agar with following formation of fungal cells suspension (volume 20 mcl, infecting dose  $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  fungal blastospores to 1 rat) [8].

To choose experimental models, which would match the objectives of the research, we have worked with it, using 7–8-day-old Wistar rats weighing 10–12 g. Acute candidiasis of oral mucosa was reconstructed via two models [9, 10]. Fungal cells suspension was administered with a microdosator to the rats from the first group (volume 20 mcl, infecting dose  $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  of fungal blastospores) 1 time a day during 3 days. The rats from the second group were placed into a bath filled with fungal suspension ( $10^5$ – $10^6$  cells per 1 ml), where it swallowed the suspension spontaneously. When both of these models were simulated, on the second-third day of the infection, it was observed, that the rats had dyspepsia symptoms, eating habits changes, there were lesion elements on tongue and jaw, which might be described as candidial ones. The specified changes were expressed better in animals from the second group. On the 3–5th day after the infecting, all the rats from the second group and 1 from the first have died. Thus, the first variant of candidiasis of oral mucosa model appeared to be more applicable for utilization in the experiment. When using this model, it is accomplished the simulation of oral mucosa lesion in all the rats, and there is a low level of animal's death induced by generalized forms of candidiasis. The specified model was used in the experiment as a basic one.

Acute candidiasis of oral mucosa was simulated on 65 7–8-day-old Wistar white rats, weighing 9–10.5 g, (34 males, 31 females) by the procedure of V.L. Bykov (1987). To do so, during the first 3 days of the experiment, it was administered to the animals per os via automatic dosator 20 mcl of *Candida* fungal suspension ( $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  of blastospores). During the next 2–14 days after infecting, it were observed the clinical symptoms of acute candidiasis: eating habits disorder, onset of white coatings and erosions on tongue and oral mucosa, and in some cases - occurrence of dyspepsia. Primary

2) создание модели рецидива кандидоза полости рта;

3) изучение на экспериментальных моделях динамики иммунного ответа и морфогенеза заболевания и определение особенностей, присущих этой форме поражения.

Для воспроизведения кандидоза использовали двухдневную культуру штамма ВКПГУ-1006/1869 *Candida albicans*, адаптированного к репродукции в организме крыс, которая была любезно предоставлена НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина  $10^9$  (НИЛ морфологии и биологии грибов РАМН) (Санкт-Петербург). Накопления биомассы грибов рода *Candida* осуществляли по стандартным методикам путем посева на твердую питательную среду Сабурос с последующим формированием суспензии грибных клеток (объем 20 мкл, инфицирующая доза  $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  blastospore гриба на одну крысу) [8].

Для выбора экспериментальных моделей, которые соответствуют задачам исследования, осуществили их отработки на крысах линии Вистар 7–8-дневного возраста весом 10–12 г. Острый кандидоз слизистой оболочки полости рта (ГК СОПР) воссоздавали по двум моделям [9, 10]. Крысам I группы вводили в полость рта суспензию клеток грибов микродозатором (объем 20 мкл, инфицирующая доза  $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  blastospore гриба) 1 раз в день в течение 3 дней. Крыс II группы помещали в ванночку с суспензией гриба ( $10^5$ – $10^6$  клеток в 1 мл), где они спонтанно глотали суспензию. При воспроизведении обеих моделей на 2–3-й день инфицирования у крыс наблюдались признаки диспепсии, изменения пищевого поведения, на языке и щеках возникали элементы поражения, которые можно охарактеризовать как кандидозные. У животных II группы указанные изменения были более выражены. На 3–5-й день после инфицирования погибли все крысы II группы и 1 крыса из I группы. Таким образом, более пригодной для использования в эксперименте оказался первый вариант модели кандидоза СОПР. При использовании этой модели достигается воспроизведение поражения СОПР у всех крыс при низком уровне гибели ЖИВОТНЫХ от генерализованных форм канди-

symptoms of acute candidiasis in most of the animals started to manifest on the third day after infecting. The specified period was considered as a disease inception (day 0). Through the simulation of acute oral candidiasis, 9 (13.8%) animals has been eliminated from the experiment because of a generalized form of disease. The clinical symptoms of acute candidiasis of oral mucosa under experimental conditions and the terms of basic model simulation were corresponding with authors' data [9, 10].

During the first 3 weeks of the experiment, the rats were in its nests together with females, and then it were seated into separate cages (4–6 animals in each). Cultural micological studies on the third day after infecting has appeared to be positive in all the animals of the specified group, while semination rates of oral mucosa by *Candida* species yeasts were high ( $4.51 \pm 0.10$  lgCFU/ml). On the 7th and 21th days of the disease, infecting was micologically confirmed in 82.1% and 66.1% of the rats, which survived with sufficiently high semination by *Candida* species yeasts ( $2.00 \pm 0.21$  lgCFU/ml;  $2.50 \pm 0.14$  lgCFU/ml), which is indicative of chronic candidiasis of oral mucosa. Selective virological observations of animals from the specified group (by 10) on 7 and 14 day of disease have appeared to be negative.

In 5 weeks after infecting, it was reconstructed a recurrency of chronic candidiasis via application of prostaglandin E2 (PGE2) in the form of gel Prostin E on the oral mucosa of 56 animals, which was implemented during 3 days under light ether narcosis. Use of PGE2 is conditioned by its characteristics as a tissue hormone – inflammatory mediator. PGE2 action mechanism is determinated by decreasing of cAMP level and inhibition of adenylate cyclase, which promote trombocytes agregation and its dense granules contents (serotonin etc.) releasing. Due to the action of released mediators, biochemical and morphological changes, which are specific for the inceptive stage of nonspecific inflammation, occur in tissues. We would note, that under the influence of PGE2, the permeability of both keratinized and non-keratinized squamous epithelium is highly increased, that largely contributes to fungal cells adhesion and its invasion (11).

Указанная модель была использована в эксперименте как базисная.

Острый кандидоз СОПР моделировали на 65 белых крысах линии Вистар в возрасте 7–8 дней массой 9–10,5 г (34 самца, 31 самка) по методике В.Л. Быкова (1987). Для этого в течение первых 3 дней эксперимента животным вводили per os автоматическим дозатором 20 мкл суспензии грибов рода *Candida* ( $3 \times 10^5$ – $3 \times 10^7$  бластоспор). В течение следующих 2–14 дней после инфицирования наблюдали клинические признаки острого кандидоза (ОК) – нарушение пищевого поведения, появление белых налетов и эрозий на языке и СОПР, а у некоторых животных – явления диспепсии. Начальные признаки острого кандидоза у большинства животных начали проявляться на 3-й день после инфицирования. Указанный период считали началом заболевания (день 0). В ходе воспроизведения острой формы кандидоза полости рта из эксперимента выбыло 9 (13,8%) животных вследствие генерализованной формы заболевания. Клинические проявления острого кандидоза СОПР в условиях эксперимента и сроки воспроизводства базовой модели согласовывались с данными авторов [9, 10].

В течение первых 3 недель эксперимента крысы находились в гнездах вместе с самками, после чего их рассаживали в отдельные клетки по 4–6 животных. Культуральные микологические исследования, проведенные на 3-й день после инфицирования, оказались положительными у всех животных указанной группы, при этом показатели обсемененности СОПР грибами рода *Candida* были высокими ( $4,51 \pm 0,10$  lgКОЕ/мл). На 7-й и 21-й день заболевания микологически инфицирование подтверждено у 82,1% и 66,1% крыс, выживших с достаточно высокими обсеменением грибами рода *Candida* ( $2,00 \pm 0,21$  lgКУО/мл;  $2,50 \pm 0,14$  lgКУО/мл), что свидетельствует о хроническом кандидозе (ХК) СОПР. Выборочные вирусологические обследования животных указанной группы (по 10) на 7-й и 14-й день заболевания оказались отрицательными.

Через 5 недель после инфицирования воссоздали рецидив хронического кандидоза путем аппликации простагландина E2

During the next 2–4 days, the clinical symptoms the recurrency of candidiasis of oral mucosa were manifested in 46 (82.1%) rats. In most of the animals from specified group, it was observed the clinical symptoms of oral candidiasis on the third day after the stimulation procedure, which is why the signified day was considered as a recurrency inception (day P0).

To confirm the ethiological role of *Candida* species yeasts, it was implemented the scrape from the surface of oral mucosa, with the following sowing of the material onto a selective medium, and the procedure of identification, using standard procedures [12]. In all the animals with clinical symptoms of candidiasis recurrency, have appeared to be a high rate of *Candida* species yeasts semination ( $3,93 \pm 0,26$  IgCFU/ml). The studying of the major clinical characteristics of candidial infection was implemented by observation of the experimental animals, using the recommendations of S. Dundarov et al. (1991) in our modification. And it were considered the intensity of the following clinical symptoms on a 4-point grading scale: general behavior (agility, static character, aggressiveness); feeding behavior (frequency of manger and water-trough using, expression of feeding reflexes); nervous system lesions (sudden debilitation, lack of response to painful stimuli, head nutation, circular motions, hyperkinesia, convulsion, paresis); dyspepsia (diarrhea, vomiting, gut bloating); eye lesions (conjunctivitis, keratitis, ptosis); nasal mucous membrane lesions (rhinitis, lesion elements); skin lesion (number of lesion components, its dynamics); fur condition (luster, density, presence of alopecia). The changes on oral mucosa was rated the intensity of infectious lesion (number of components, its localization, growth dynamics, duration of epithelization period), involvement of gingiva into the pathological process. With lack of changes, the symptom intensity was given 0 points, with insignificant changes – 1 point, with medium and significant intensity – 2 and 3 points respectively.

For objectivization and the ability to compare general appearance of infectious lesion on every step of the disease progress in all the animal groups, it was defined a pathology integral rate (ИПП) due to the procedure [13].

(PGE2) в форме геля Простин Е на слизистую оболочку полости рта 56 животных, которую осуществляли в течение 3 дней под легким эфирным наркозом. Использование PGE2 обусловлено его свойствами как тканевого гормона – медиатора воспаления. Механизм действия PGE2 обусловлен снижением уровня цАМФ и ингибированием аденилат циклазы, что способствует агрегации тромбоцитов и высвобождению содержимого их плотных гранул (серотонина и проч.). За счет действия высвобожденных медиаторов в тканях происходят биохимические и морфологические изменения, характерные для начальной фазы неспецифического воспаления. Отметим, что под влиянием PGE2 значительно повышается проницаемость как неороговевшего, так и ороговевшего эпителия и в значительной степени способствует адгезии клеток гриба и их инвазии [11].

В течение следующих 2–4 дней клинические признаки рецидива кандидоза на СОПР выявлялись у 46 (82,1%) крыс. У большинства животных указанной группы клинические проявления кандидоза полости рта наблюдались на 3-й день после процедуры стимулирования, поэтому указанный день считали началом рецидива (день P0).

Для подтверждения этиологической роли грибов рода *Candida* осуществляли соскоб с поверхности СОПР с последующим посевом материала на селективную среду и процедурой идентификации по стандартным методикам [12]. У всех животных с клиническими признаками рецидива кандидоза оказалась высокая степень обсемененности СОПР грибами рода *Candida* ( $3,93 \pm 0,26$  IgКОЕ/мл). Изучение главных клинических особенностей кандидозной инфекции осуществляли путем наблюдения за экспериментальными животными с учетом рекомендаций С. Дундарова и соавт. (1991) в нашей модификации. При этом по четырехбалльной оценке учитывали выраженность следующих клинических признаков: общий характер поведения (подвижность, статичность, агрессивность); пищевое поведение (частота подходов к кормушке и поилке, выраженность пищевых рефлексов); поражения нервной системы (резкое ослабление, отсутствие реагирова-

$$ИПТ = a_1 \Sigma A + a_2 \Sigma B + a_3 \Sigma C + \dots + a_n \Sigma X, \quad (1)$$

where  $a$  – is a frequency of occurrence of every symptom;

$\Sigma$  – a sum of points of every symptom.

To study the characteristics of disease morphogenesis and the immunal response dynamics, the slaughter of the rats from experimental and control groups was implemented at the P0, 7, 14 and 21 day. The material for mycological, morphological and histochemical studies was withdrawn and investigated according to current requirements of the International Committee for Biomedical Research Involving Animals (Международного комитета по проведению медико-биологических исследований с использованием животных) and the Order of MH USSR № 755 from 12.08.1977. «About the sanctions for further elaboration of organising forms of work involving experimental animals» [Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»]. Considering 24-hours fluctuation of lymphocytes cell populations and eventual biorhythmic dependence of other indexes, the procedure of slaughter was implemented in the afternoon.

Condition of collagen and muscle fiber was rated by Van-Gieson stain. Brachet's method was used to educe cellular DNA and RNA. MSB method in D.D. Zerbino, L.L. Lukasevich modification (1984) was used to indicate fibrin with diverse rate of polymerization and cellular components of blood in the sections [14]. Metachromasia reaction with alcian blue at pH=2.6 in addition to PAS-reaction was used to indicate mast cells.

Immunological researches under experimental conditions were implemented by traditional procedures, adapted to rats (determination of total white blood cells, T- and B-white cells). Condition of oxygen-dependent metabolism of neutrophil granulocytes was rated by NST-test, counting the percentage of active cells and cytochemical index [15]. Spontaneous (SLMC) and antibody-dependent lymphocyte mediated cytotoxicity (ADLMC) was determined

ния на болевые раздражители, покачивание головой, круговые движения, гиперкинезы, судороги, парезы); диспепсию (понос, рвота, вздутие кишечника); поражения глаз (конъюнктивит, кератит, птоз); поражения слизистой оболочки носа (насморк, элементы поражения); поражения кожи (количество элементов поражения, их динамика); состояние меха (блеск, плотность, наличие облысения). Изменения на СОПР оценивали по степени выраженности специфических проявлений инфекционного поражения (количество элементов, их локализация, динамика развития, продолжительность периода эпителизации), вовлечение в патологический процесс десен. При отсутствии изменений выраженность симптома оценивали в 0 баллов, при незначительных проявлениях – в 1 балл, при средней и значительной выраженности – в 2 и 3 балла соответственно.

Для объективизации и возможности сравнения общих проявлений инфекционного поражения на каждом этапе развития заболевания во всех группах животных определяли интегральный показатель патологии (ИПП) по методике [13].

$$ИПП = a_1 \Sigma A + a_2 \Sigma B + a_3 \Sigma C + \dots + a_n \Sigma X,$$

где  $a$  – частота встречаемости каждого из симптомов;

$\Sigma$  – сумма баллов каждого из симптомов.

Для изучения особенностей морфогенеза заболеваний, а также динамики иммунного ответа забор крыс подопытных и контрольной групп осуществляли в дни P0, 7, 14 и 21. Материал для микологических, морфологических и гистохимических исследований забирали и изучали согласно действующим требованиям Международного комитета по проведению медико-биологических исследований с использованием животных и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Учитывая суточные колебания клеточных популяций лимфоцитов и возможную биоритмическую зависимость других показателей, процедуру

by procedure (16). Total amount of IFNs was determined by traditional procedures [15].

#### **Clinical pathogenic characteristics of experimental oral candidiasis**

In all the animals, infected by *Candida* species yeasts, on the 2–3 day after the administration of infecting agent (disease inception – day 0) appeared clinical symptoms of acute oral candidiasis – lesion of general ( $1.52 \pm 0.07$  points) and feeding ( $1.43 \pm 0.07$  points) behavior, dyspepsia ( $1.58 \pm 0.10$  points), hyperemia of oral mucosa with the onset of white coatings and erosions on tongue (93.8%), jaws mucosa (32.3%), palate (18.5%).

During the next 3 days, condition of 56 (86.2%) animals from the specified group have gradually become to stabilize: the symptoms intensity of lesion of general ( $1.37 \pm 0.07$  points,  $p < 0.05$ ) and feeding ( $1.24 \pm 0.05$  points,  $p < 0.03$ ) behavior, dyspepsia ( $1.21 \pm 0.08$  points,  $p < 0.01$ ) reduced. Clinical symptoms of oral mucosa lesion remained unchanged, however the symptoms of gingivitis have become more intense ( $1.38 \pm 0.07$  points,  $p < 0.01$ ).

In 9 (13.8%) animals during the first 3–7 days of acute experimental oral candidiasis, it were progressing the symptoms of infection generalization (lesions of general and feeding ( $2.96 \pm 0.21$  points) behavior, dyspepsia ( $2.84 \pm 0.19$  points), resulted in the death of animals and its elimination from the experiment.

On the 7th day after the inception of oral candidiasis clinical symptoms, general condition of 56 (86.2%) survived animals continued to improve. In 38 (67.9%) animals from the signified group, lesion symptoms of oral mucosa have disappeared or were minimal, and in 10 (17.9%) – there were manifestations of candidal glossitis and gingivitis. And only in 8 (14.3%) animals, there were no clinical symptoms dynamics observed. Lesion components, specific for oral candidiasis, in rats from specified group, were epithelialized on the average  $7.64 \pm 0.14$  day, and a recovery from clinical symptoms happened on  $10.3 \pm 0.20$  day (fig. 1).

In 56 animals, which survived after the acute form of oral candidiasis, it was observed a significant reduction in body weight from the animal control group ( $11.5 \pm 0.2$  g compared to  $15.7 \pm 0.3$  g,  $p < 0.01$ ).

забою осуществляли во второй половине дня.

Состояние коллагеновых и мышечных волокон оценивали путем окраски срезов пикрофуксином по методу Ван Гизона. По методу Браше выявляли клеточные ДНК и РНК. При использовании метода МСБ в модификации Д.Д. Зербино, Л.Л. Лукаевич (1984) в срезах выявляли фибрин различной степени полимеризации и клеточные элементы крови [14]. Для выявления тучных клеточек в дополнении к ШИК-реакции использовали реакцию метахромазии с альциановым синим при  $pH = 2.6$ .

Иммунологические исследования в условиях эксперимента осуществляли по традиционным методикам, адаптированным для крыс (определение абсолютного количества лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов). Состояние кислородозависимого метаболизма нейтрофильных лейкоцитов оценивали с помощью НСТ-теста с подсчетом процента активных клеток и цитохимического показателя (ЦХП) [15]. Спонтанную (СЦЛ) и антителозависимую цитотоксичность лимфоцитов (АТЗ ЦЛ) определяли по методике [16]. Содержание общего сывороточного интерферона определяли по традиционным методикам [15].

#### **Клинико-патогенетическая характеристика экспериментального кандидоза полости рта**

У всех животных, инфицированных грибами рода *Candida*, на 2–3-й день после введения инфекционного агента (начало заболевания – день 0) возникали клинические проявления острого кандидоза полости рта – нарушение общего ( $1.52 \pm 0.07$  балла) и пищевого ( $1.43 \pm 0.07$  балла) поведения, диспепсия ( $1.58 \pm 0.10$  балла), гиперемия СОПР с появлением белых налетов и эрозий на языке (93,8%), слизистой оболочке щек (32,3%), небе (18,5%).

В течение следующих 3 дней состояние 56 (86,2%) животных указанной группы постепенно стабилизировалось – уменьшилась выраженность признаков нарушения общего ( $1.37 \pm 0.07$  балла,  $p < 0.05$ ) и пищевого ( $1.24 \pm 0.05$  балла,  $p < 0.03$ ) поведения, диспепсии ( $1.21 \pm 0.08$  балла,  $p < 0.01$ ). Клинические проявления поражения СОПР оставались



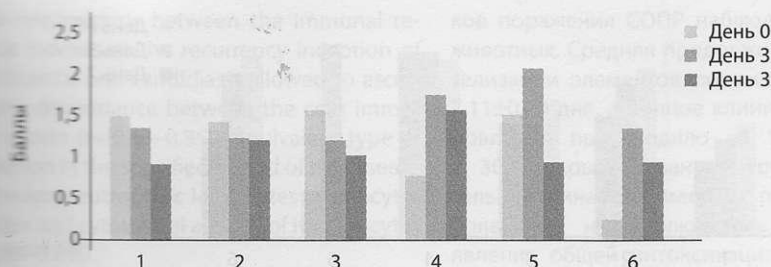


Fig. 1. The intensity of the clinical symptoms of acute oral candidiasis under experimental conditions

Note: 1 – changes in behavior; 2 – feeding behavior lesions; 3 – symptoms of dyspepsia; 4 – trophic lesions; 5 – lesions of oral mucosa; 6 – gingivitis.

During the next 4 weeks, in 12 (21.4%) animals, it was determined hyperemia of gums and separate sections of oral mucosa with small erosions on an upper surface of tongue; in retromolar transitory folds sections, there was a white-grey coating. In 50.0% (28) of animals, the dyspepsia symptoms and flatulence persisted. Compared to the control group of healthy animals, the rats from the signified group looked cachectic, its fur lost the luster and thinned out ( $0.75 \pm 0.07$  points).

In 5 weeks after the experiment start, it was stimulated a recurrency of candidiasis by lubrication of rats' oral mucosa with PGE2 in the form of gel Prostin E under light ether narcosis during 3 days. In 46 (82.1%) animals on the 2–3 day after the stimulation (inception of the recurrency – day P0) the symptoms of oral candidiasis became more intense. In diverse sections of oral mucosa (tongue, hard palate, in retromolar sections, on gums) originated the hyperemia nidi, erosions with the ragged edges, covered with white coating. More often, the clinical symptoms of candidiasis were observed on an upper surface of tongue (80.4%). In 19.6% of the cases, into the pathological process were involved several sections of oral mucosa. Condition of the animals at the inception of oral candidiasis recurrency is defined by lesions of general ( $1.05 \pm 0.03$  point) and feeding ( $1.55 \pm 0.07$  points) behavior, occurrence of dyspepsia ( $1.29 \pm 0.08$  points) (fig. 2).

7 days after the recurrency inception, general ( $0.75 \pm 0.06$  points,  $p < 0.001$ ) and feeding

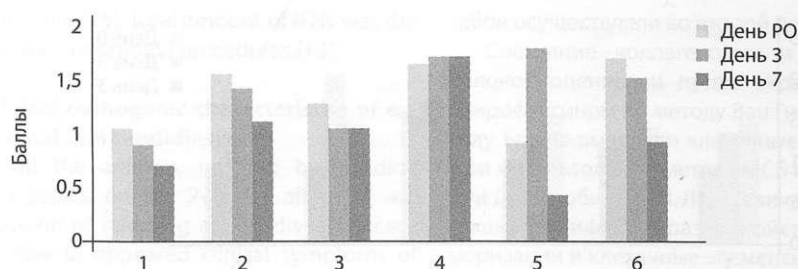
без изменений, однако более выраженными стали симптомы гингивита ( $1,38 \pm 0,07$  балла,  $p < 0,01$ ).

У 9 (13,8%) животных в течение первых 3–7 дней острого экспериментального кандидоза полости рта прогрессировали признаки генерализации инфекции (нарушения общего ( $2,96 \pm 0,21$  балла) и пищевого ( $2,87 \pm 0,19$  балла) поведения, диспепсии ( $2,84 \pm 0,19$  балла), в результате чего животные погибли и выбыли из эксперимента.

На 7-й день от начала клинических проявлений острого кандидоза полости рта общее состояние 56 (86,2%) выживших животных продолжало улучшаться. У 38 (67,9%) животных указанной группы признаки поражения СОПР исчезли или были минимальными, а у 10 (17,9%) – имели место проявления кандидозного глоссита и гингивита. Только у 8 (14,3%) животных динамики клинических признаков не наблюдалось. Элементы поражения, характерные для кандидоза полости рта, у крыс указанной группы эпителизировались в среднем на  $7,64 \pm 0,14$  дня, а выздоровление по клиническим признакам наступало на  $10,3 \pm 0,20$  дня (рис. 1).

У 56 животных, выживших после острой формы кандидоза полости рта, наблюдалось значительное отставание в наборе массы тела от контрольной группы животных ( $11,5 \pm 0,2$  г по сравнению с  $15,7 \pm 0,3$  г,  $p < 0,01$ ).

В течение следующих 4 недель у 12 (21,4%) животных выявлялись гиперемия десен и отдельных участков СОПР с мелкими эрозиями



**Fig. 2. The intensity of the clinical symptoms of oral candidiasis recurrence under experimental conditions**

Note: 1 – changes in behavior; 2 – feeding behavior lesions; 3 – symptoms of dyspepsia; 4 – trophic lesions; 5 – lesions of oral mucosa; 6 – gingivitis.

( $1.13 \pm 0.04$  points;  $p < 0.001$ ) behavior of animals improved, expression of dyspepsia decreased ( $1.07 \pm 0.07$  points;  $p < 0.01$ ). Positive dynamics in clinical appearance of oral mucosa lesions was observed in 69.6% of animals. Average duration of components epithelization was  $7.11 \pm 0.20$  days, and a complete clinical recovery occurred on the  $9.86 \pm 0.20$  day (see fig. B. 1). In 30.4% of rats from the specified group, it was observed no positive dynamics in local disease symptoms, it were persisted the occurrences of general intoxication and dyspepsia ( $2.31 \pm 0.21$  points).

During the period of recurrence, the rats gained weight poorly ( $68.1 \pm 1.3$  g compared to  $72.4 \pm 1.2$  g in the control group,  $p < 0.03$ ). The symptoms of trophic disorders in the forms of general or local (in the rear end of the body) fur alopecia occurred in 48.2% of animals ( $1.71 \pm 0.08$  points).

To define the character of immune response, it was studied the indexes of specific and non-specific immunity at the recurrence inception (day PO), in the 7th, 14th and 21th day. (Fig. 3, 4).

Clinical appearance of experimental oral candidiasis recurrence (day PO) ran its course against the background of leukocyto- and lymphocytopenia ( $11.5 \pm 0.3 \times 10^9/l$ ,  $8.49 \pm 0.54 \times 10^9/l$ ,  $p < 0.001$ ) and decrease of specific weight of T-cells ( $3.74 \pm 0.6 \times 10^9/l$ ,  $p < 0.01$ ). Activity of oxygen-dependent mechanisms of phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and amount of INFs in blood serum were higher than those in the control group of noninfected animals ( $p < 0.05 - 0.001$ ). The study of correla-

на спинке языка; в ретромолярных участках и на участках переходных складок оказывался бело-серый налет. У 50,0% (28) животных сохранялись признаки диспепсии, вздутие живота. По сравнению с контрольной группой здоровых животных, крысы указанной группы выглядели истощенными, их мех потерял блеск и поредел ( $1,75 \pm 0,07$  балла).

Через 5 недель после начала эксперимента стимулировали рецидив кандидоза путем смазывания СОПР крыс PGE2 в форме геля Простин Е под легким эфирным наркозом в течение 3 дней. У 46 (82,1%) животных на 2–3-й день после стимулирования (начало рецидива – день PO) признаки кандидоза полости рта стали более выраженными. На разных участках СОПР (языке, твердом небе, в ретромолярных участках, на деснах) возникали очаги гиперемии, эрозии с неровными краями, покрытыми белым налетом. Чаще клинические признаки кандидоза наблюдались на спинке языка (80,4%). В 19,6% случаев в патологический процесс вовлекалось несколько участков СОПР. Состояние животных в начале рецидива кандидоза полости рта характеризовалось нарушениями общего ( $1,05 \pm 0,03$  балла) и пищевого ( $1,55 \pm 0,07$  балла) поведения, явлениями диспепсии ( $1,29 \pm 0,08$  балла) (рис. 2).

Через 7 дней от начала рецидива общее ( $0,75 \pm 0,06$  балла,  $p < 0,001$ ) и пищевое ( $1,13 \pm 0,04$  балла;  $p < 0,001$ ) поведение животных улучшилось, выраженность диспепсии уменьшилась ( $1,07 \pm 0,07$  балла;  $p < 0,01$ ). Положительная динамика клинических призна-

tion relationships between the immunal response indexes at the recurrency inception of experimental oral candidiasis allowed to ascertain the dependance between the cells immunity indexes ( $r=[0.63-0.95]$ ). Equivalent type of correlation in the specified period of the disease is between neutrophilic leukocytes phagocytosis index and cytotoxic activity of lymphocytes ( $r=[0.58-0.89]$ ).

On the 7th day of the recurrency above mentioned changes persisted, and the indexes of [ADLMC?] credibly decreased ( $25.9 \pm 1.54\%$ ,  $p < 0.01$ ). In the cell link of the immunal response was stored the symptoms of integration

ков поражения СОПР наблюдалась у 69,6% животных. Средняя продолжительность эпителизации элементов поражения составила  $7,11 \pm 0,20$  дня, а полное клиническое выздоровление происходило на  $9,86 \pm 0,20$  дня. В 30,4% крыс указанной группы положительной динамики местных проявлений заболевания не наблюдалось, сохранялись явления общей интоксикации и диспепсии ( $2,31 \pm 0,21$  балла).

На протяжении рецидива заболевания крысы плохо набирали вес ( $68,1 \pm 1,3$  г в сравнении с  $72,4 \pm 1,2$  г в контрольной группе,  $p < 0,03$ ). Признаки трофических нарушений

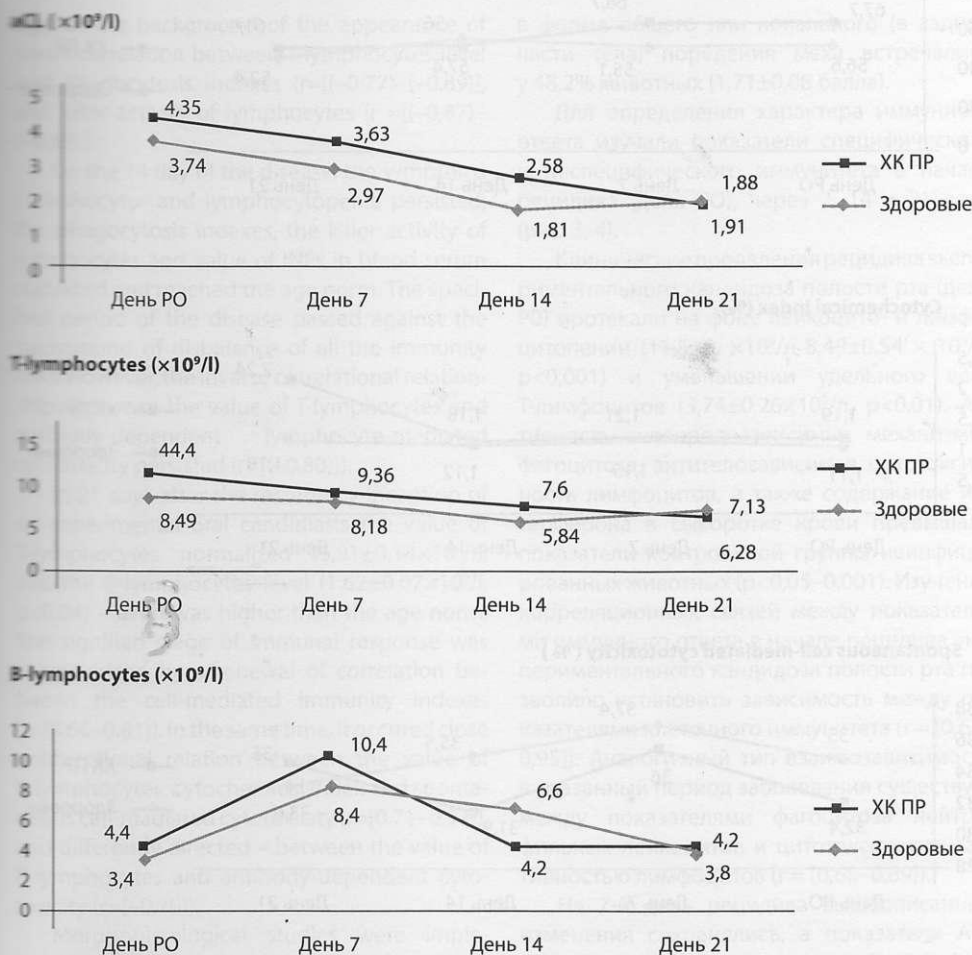


Fig. 3. Dynamics of cell-mediated and humoral immunity indexes and interferonogenesis during the recurrency of experimental oral candidiasis

Characteristics of pathogenesis of acute and recurrent oral candidiasis under experimental conditions (part 1)

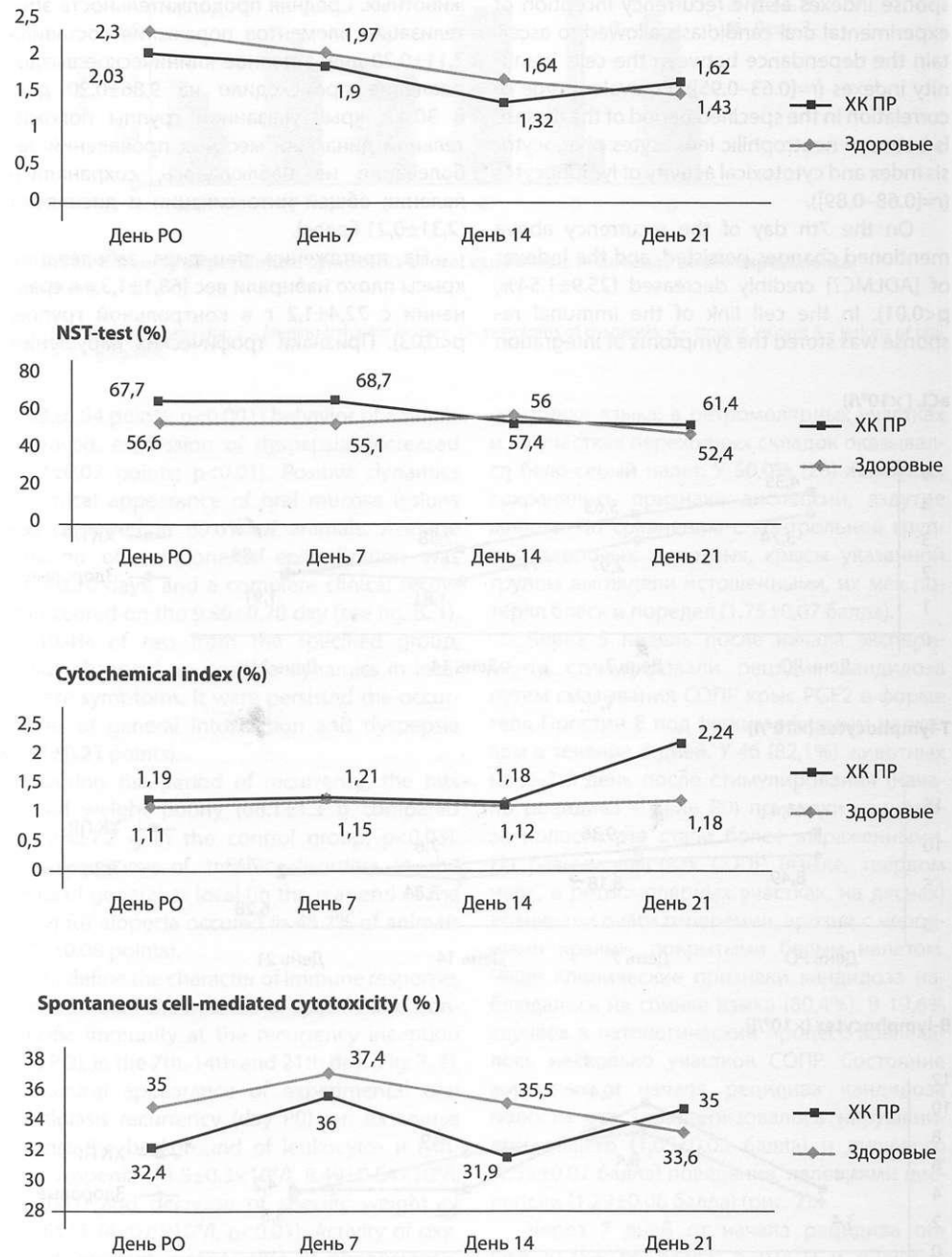


Fig. 4.

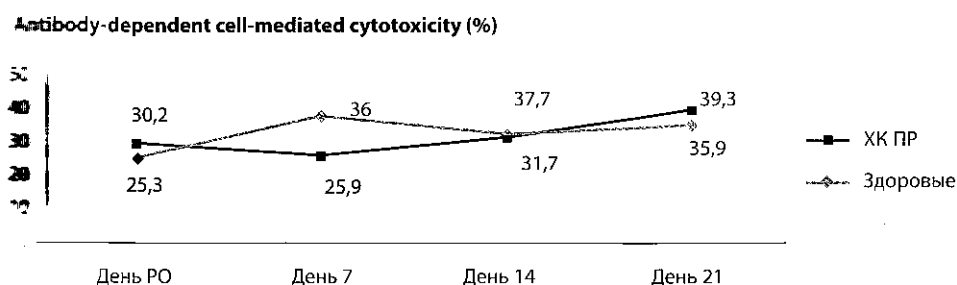


Fig. 4. Dynamics of phagocytic and killer activities indexes during the recurrency of experimental oral candidiasis

against the background of the appearance of **inverted correlation** between T-lymphocytes level and phagocytosis indexes ( $r=[(-0.77)-(-0.89)]$ ), and killer activity of lymphocytes ( $r=[(-0.87)-(-0.89)]$ ).

On the 14 day of the disease, the symptoms of leukocyto- and lymphocytopenia persisted; the phagocytosis indexes, the killer activity of lymphocytes and value of INFs in blood serum stabilized and reached the age norm. The specified period of the disease passed against the background of disbalance of all the immunity links. However, the inverse correlational relationships between the value of T-lymphocytes and antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity persisted ( $r=[(-0.80)]$ ).

In 21 days after the recurrency inception of an experimental oral candidiasis the value of T-lymphocytes normalized ( $1.91 \pm 0.14 \times 10^9/l$ ), and the B-lymphocytes level ( $1.62 \pm 0.07 \times 10^9/l$ ,  $p < 0.04$ ) – even was higher than the age norm. The signified stage of immunal response was characterized by a renewal of correlation between the cell-mediated immunity indexes ( $r=[0.66-0.81]$ ). In the same time, it occurred close unidirectional relation between the value of B-lymphocytes, cytochemical index and spontaneous cell-mediated cytotoxicity ( $r=[0.71-0.97]$ ), and differently directed – between the value of B-lymphocytes and antibody-dependent cytotoxicity ( $r=[-0.70]$ ).

Morphohistological studies were implemented in observation dynamics (days 0, 7, 14 and 21 days of recurrency), using the methods of macro- and microscopic visualization.

в форме общего или локального (в задней части тела) поредения меха встречались у 48,2% животных ( $1,71 \pm 0,08$  балла).

Для определения характера иммунного ответа изучали показатели специфического и неспецифического иммунитета в начале рецидива (день 0), через 7, 14 и 21 день (рис. 3, 4).

Клинические проявления рецидива экспериментального кандидоза полости рта (день 0) протекали на фоне лейкоцито- и лимфоцитопении ( $11,5 \pm 0, \times 10^9/l$ ,  $8,49 \pm 0,54 \times 10^9/l$ ,  $p < 0,001$ ) и уменьшении удельного веса Т-лимфоцитов ( $3,74 \pm 0,26 \times 10^9/l$ ,  $p < 0,01$ ). Активность кислородозависимых механизмов фагоцитоза, антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов, а также содержание интерферона в сыворотке крови превышали показатели контрольной группы неинфицированных животных ( $p < 0,05-0,001$ ). Изучение корреляционных связей между показателями иммунного ответа в начале рецидива экспериментального кандидоза полости рта позволило установить зависимость между показателями клеточного иммунитета ( $r = [0,63-0,95]$ ). Аналогичный тип взаимозависимости в указанный период заболевания существует между показателями фагоцитоза нейтрофильных лейкоцитов и цитотоксической активностью лимфоцитов ( $r = [0,68-0,89]$ ).

На 7-й день рецидива вышеописанные изменения сохранялись, а показатели АТС ЦЛ достоверно уменьшились ( $25,9 \pm 1,54\%$ ,  $p < 0,01$ ). В клеточном звене иммунного ответа хранились признаки интеграции на фоне

During the histological study of animals' organs, it was educed, that at the recurrency inception (day P0) of experimental oral candidiasis on the surface of epithelium, there were not yet observed the significant bunching of yeasts' material. However, on the surface of tongue the zones of submersible growth [погружного роста] of the basal layers of epithelium occur, in which the yeasts' components is differentiated. Compared to healthy animals, the epithelialic layer was [slim/refined], with a reduction of keratin coatings. In tongue and jaw tissues were noted dystrophy manifestations, lamination of superlayer of epithelium, hyperemia of submucous layer vessels, and medium leucocyte infiltration of lamina propria of the mucous membrane. Infiltrates mainly consisted of lymphoid and histiocytic row components, with increased number of eosinophiles and mast cells. In some sections, specified changes proliferated on submucous layers of connective tissue. In the sections of salivary gland, there were manifested bunchings of leucocytes in the forms of infiltrates and PAS-positive components. In one animal, in the section of tongue root, it was detected necrosis nidus [очаг некроза] with single dystrophic yeastlike cells, which was on the stage of calcification.

In stomach and gut, there was observed productive inflammation with leucocytic infiltration of submucous layer. The infiltrates occupied significant areas, and sometimes proliferated on a basal segment of mucous membrane. Infiltrates were composed of many young components of lymphoid row, eosinophiles. However, described changes were more expressed in stomach and less – in gut. At the same time, the components of *Candida* species yeasts wasn't detected.

Morphological characteristics of submandibular lymph nodes, adrenal gland, liver and spleen didn't differ from healthy animals of the same age.

On the 7th day of recurrency, changes in microstructure of observable organs became more expressed. The surface of tongue on a significant area is covered with PAS-positive coating, consisting of desquamated laminae of keratin, ДПК [?] (from single ones to colonies), small groups of red and white blood cells (fig. 5).

появления обратной корреляции между уровнем Т-лимфоцитов и показателями фагоцитоза ( $r = [(-0,77) - (-0,89)]$ ) и киллерную активность лимфоцитов ( $r = [(-0,87) - (-0,89)]$ ).

На 14-й день заболевания сохранялись признаки лейкоцито- и лимфоцитопении, показатели фагоцитоза, киллерной активности лимфоцитов и содержание интерферона в сыворотке крови стабилизировались и достигли возрастной нормы. Указанный период заболевания протекал на фоне дисбаланса всех звеньев иммунитета. Однако корреляционные связи обратного направления между содержанием Т-лимфоцитов и антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов сохранялись ( $r = [(-0,80)]$ ).

Через 21 день от начала рецидива экспериментального кандидоза полости рта содержание Т-лимфоцитов нормализовалось ( $1,91 \pm 0,14 \times 10^9/\text{л}$ ), а уровень В-лимфоцитов ( $1,62 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,04$ ) – даже несколько превышал возрастную норму. Указанный этап иммунного ответа характеризовался восстановлением взаимосвязи между показателями клеточного иммунитета ( $r = [0,66-0,81]$ ). В то же время возникла тесная однонаправленная связь между содержанием В-лимфоцитов, ЦХП и спонтанной цитотоксичность лимфоцитов ( $r = [0,71-0,97]$ ) и разнонаправленная – между количеством В-лимфоцитов и антителозависимой цитотоксичностью ( $r = [-0,70]$ ).

Морфогистологические исследования осуществляли в динамике наблюдения (дни P0, 7, 14 и 21 дни рецидива) с применением методов макро- и микроскопической визуализации.

При гистологическом исследовании органов животных выявлено, что в начале рецидива (день P0) экспериментального хронического кандидоза полости рта на поверхности эпителия еще не наблюдается существенных скоплений грибкового материала. Однако на поверхности языка возникают зоны погружного роста базальных слоев эпителия, в которых дифференцируются элементы грибов. По сравнению со здоровыми животными, эпителиальный слой был изящным, с уменьшением кератиновых покрытий. В тканях языка и щеки отмечались проявления дистрофии, отслоения поверхностного слоя эпите-

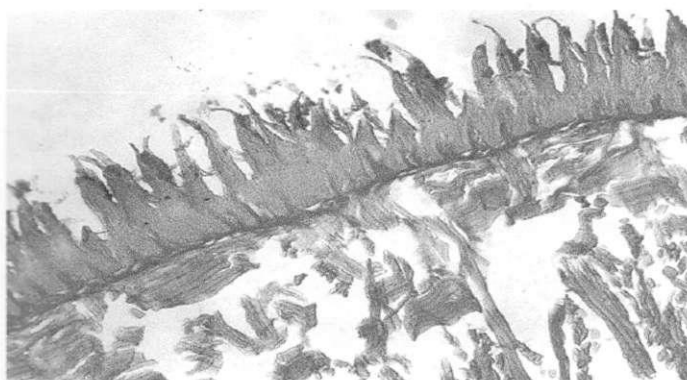


Fig. 5 PAS-positive coating on tongue papillae with elements of *Candida* species yeasts. Edema of submucous layer. Recurrency of an experimental oral candidiasis. PAS-reaction. Об. 10, ок. 10

Frequently among these components occurred bunching of cocci.

Elements of yeasts and microflora manifested directly on tongue papillae, against the background of the lysis symptoms of keratin and squamous layer of epithelium (fig. 6). When yeasts penetrate the deeper layers of epithelium, ulcer-like destructions down to submucous layer occur (fig. 7). In the sections of mucous membrane defects in submucous layer, there takes place dense lympho-histiocytic infiltration, which in some places proliferates on muscle tissues. Among the infiltrate cells, the shadows of necrotized ДПК [тени некротизированных ДПК] are indicated, as well as double refracting fragments of chlamidospores [вдвойне заплывающие фрагменты хламидоспор] and yeasts cells.

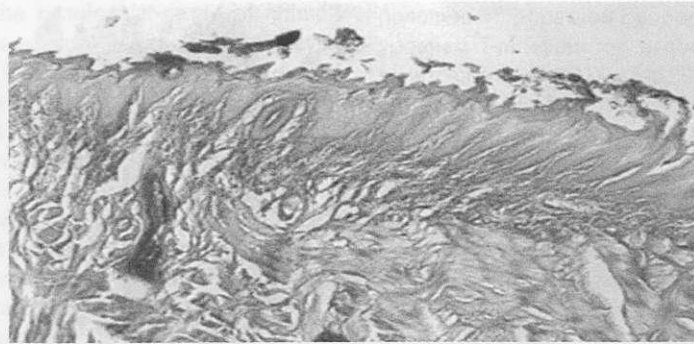
In most of animals, on the 7th day of recurrency, there are indicated expressed local lesions of tongue root on the border with larynx, appearing in the same place as previous granulomatous changes. In some cases, it is a centre of muscle tissue necrosis in the area of a large candidal colony, which consists of a big number of ДПК, chlamidospores, pseudomycelium fragments.

In most of animals, on the 7th day of recurrency, there are indicated expressed local lesions of tongue root on the border with larynx, appearing in the same place as previous granulomatous changes. In some cases, it is a centre of muscle tis-

лия, гиперемия сосудов подслизистого слоя и умеренная лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. Инфильтраты состояли главным образом из элементов лимфоидного и гистиоцитарного рядов с увеличенным количеством эозинофилов и тучных клеток. В некоторых участках указанные изменения распространялись на подслизистые слои соединительной ткани. В участках слюнных желез обнаруживались скопления лейкоцитов в форме инфильтратов и ШИК-положительные элементы. У одного животного в области корня языка выявлен очаг некроза с одиночными дистрофированными дрожжеподобными клетками находился в стадии кальцификации.

В желудке и кишечнике наблюдалось продуктивное воспаление с лейкоцитарной инфильтрацией подслизистого слоя. Инфильтраты занимали значительные площади, а иногда распространялись на базальный отдел слизистой оболочки. В состав инфильтратов входило много молодых элементов лимфоидного ряда, эозинофилов. Однако описанные изменения более выражены в желудке и меньше – в кишечнике. При этом элементов грибов рода *Candida* не обнаружено.

Морфологические характеристики тканей подчелюстных лимфатических узлов, надпочечников, печени и селезенки не отличались от здоровых животных аналогичного возраста.



a)



b)

**Fig. 6. Desquamation of tongue papillae. PAS-positive coating contains *Candida* species yeasts and keratin laminae. Recurrency of experimental oral candida-herpetic (?) infection. PAS-reaction: a) O6.10, ок. 10; b) O6.10, ок. 20**

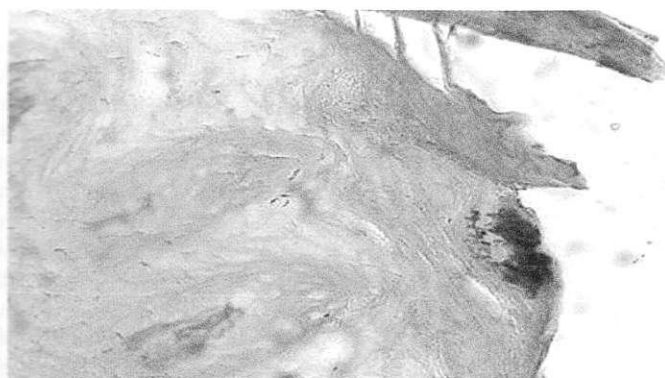
sue necrosis in the area of a large candidal colony, which consists of a big number of ДПК, chlamidospores, pseudomycelium fragments.

It is in the free state and inside of the destructed macrophages. In one of the animals, in the same area, there were found calcinates with conidia and ДПК. In the contiguous to the calcinat muscle layer, there are fibrous scar and vessel plethora. In the larynx cartilage tissues, there are symptoms of destruction due to a candidal invasion. In submucous and muscle layers of tongue, there is noted a significant diffuse interstitial edema. Veins look plethoric, with occurrence of thrombosis and white cells marginal straddling. In wide ranges, microhematomae, perivascular and pericapillar lympho-histiocytic infiltration occur. Many of arteries have hyperthrophied media with intensified collagen com-

На 7-й день рецидива изменения микро-структуры органов, которые исследовались, стали более выраженными. Поверхность языка на значительном промежутке покрыта ШИК-положительным налетом, состоящим из слущенных пластинок кератина, ДПК (от единичных до колоний), небольших групп эритроцитов и лейкоцитов (рис. 5). Часто среди этих компонентов встречались скопления кокков.

Элементы грибов и микрофлора проявлялись непосредственно на сосочках языка, на фоне признаков лизиса кератина и поверхностного слоя эпителия (рис. 6). При проникновении грибов в более глубокие слои эпителия возникают разрушения по типу язв до подслизистого слоя (рис. 7). В участках дефекта слизистой оболочки в подслизистом





**Fig. 7. Invasion of *Candida* species yeasts into epithelium of tongue mucous membrane. Recurrency of chronic oral candidiasis. PAS-reaction. O6.10, ок. 40**

ponent and corrugated interior lissom membrane.

Presence of a significant number of mast cells in perivascular spaces, which are on the different stages of degranulation, engages attention. As you know, substances, which are secreted by mastocytes, appear to be proinflammatory factors and mediators of allergic inflammation, which influence the tone and permeability of the walls of blood microvessels. That's why, tissue infiltration by lymphocytes, eosinophiles and mast cells with the symptoms of its degranulation against the background of vascularization disorder, may point at the formation of inflammation with the allergic component.

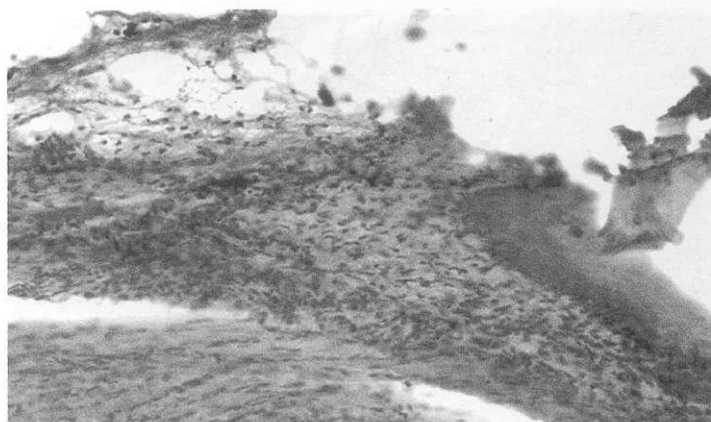
Against the background of discirculatory changes, there appear the symptoms of intracellular edema and muscle fibers dystrophy down to the segmental lysis, that can be mainly connected to tissue hypoxia. Direct candidal lesions of myocytes is confirmed by a presence of intracellularly-situated yeasts.

In the jaw structure in the animals from this group, there are no large abscesses and calcifications. Morphological changes are characterized by the appearance of small scars in a muscle tissue and in the place of gland location. As for the rest, changes in jaw and tongue tissues are analogous (fig. 8). All the above described manifestations are the result of the direct local effect on tissues of actively vegetating *Candida* species yeasts.

слое происходит густая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация, которая в некоторых местах распространяется на мышечные ткани. Среди клеток инфильтрата выявляются тени некротизированных ДПК, а также вдвойне заломляющие фрагменты хламидоспор и клетки грибов.

У большинства животных на 7-й день рецидива выявляются выраженные локальные поражения корня языка на границе с гортанью, возникающие на месте предыдущих гранулематозных изменений. В некоторых случаях это – средоточие некроза мышечной ткани в области крупной кандидозной колонии, которая состоит из большого количества ДПК, хламидоспор, фрагментов псевдомицелия.

Они находятся в свободном состоянии и внутри разрушенных макрофагов. У одного животного в этой же области обнаружены кальцинаты с конидиями и ДПК. В прилегающем к кальцинату мышечном слое имеется фиброзный рубец и полнокровие сосудов. В тканях хрящей гортани есть признаки деструкции вследствие кандидозной инвазии. В подслизистом и мышечном слоях языка отмечается значительный диффузный интерстициальный отек. Вены выглядят полнокровными, с явлениями тромбоза и с краевым стоянием лейкоцитов. Во многих полях зрения оказываются микрогематомы, периваскулярная и перикапиллярная лимфоидно-гистиоци-



**Fig. 8. Superficial erosion on jaw mucous membrane with infiltration of submucous layer. Recurrency of experimental oral candida-herpetic infection hematoxylin-eosin. O6.10, ок. 10**

On the 7th day of experimental oral candidiasis recurrency, stomach lesions are localized in the area of fold, which delimitates two chambers, and in epithelium of a "glandular chamber". ДПК is localized in stratified flat epithelium and submucous layer. Epithelium of many layers is covered by PAS-positive material, containing a significant amount of different yeasts forms, necrotized cells of covering epithelium, solitary white cells. Under these layers, it is found superficial erosions in mucous membrane, on the bottom of which it is determined a certain amount of pseudomycelium. In an interstitial tissue, on the level of holes under erosions, there are bunchings of double-refracting material of dead yeasts.

Deep layers of gastric epithelium don't have the lesion symptoms. Lamina propria of mucous membrane and submucous layer in the zones of superficial yeast vegetation are plethoric, drop-sical, infiltrated by lymphocytes and the components of monocytic row with the impurities of eosinephiles. In muscle and serous gastric membranes, ДПК occurs.

Morphological changes in the gut are notable for larger prevalence of erosions, intensity of diffusive leukocytic infiltration of lamina propria and muscularis of mucous membrane and its significant edema, and a detachment of serous membrane from the muscle one. At the same time, in the lumen of the intestine, in a mass of

тарная инфильтрация. Большинство артерий имеют гипертрофированную медиа с усиленным коллагеновым компонентом и гофрированной внутренней эластичной мембраной.

Обращает на себя внимание наличие в периваскулярных пространствах значительного количества тучных клеток, находящихся на разных стадиях дегрануляции. Как известно, вещества, секретируемые мастоцитами, являются провоспалительными факторами и медиаторами аллергического воспаления, влияющими на тонус и проницаемость стенок микрососудов. Поэтому инфильтрация тканей лимфоцитами, эозинофилами и тучными клетками с признаками их дегрануляции на фоне нарушения васкуляризации может указывать на формирование воспаления с аллергическим компонентом.

На фоне дисциркуляторных изменений возникают признаки внутриклеточного отека и дистрофии мышечных волокон до сегментарного лизиса, что в значительной степени может быть связано с тканевой гипоксией. Непосредственное кандидозное поражение миоцитов подтверждается наличием внутриклеточно расположенных грибов.

В структурах щеки у животных данной группы не оказывается крупных абсцессов и кальцинатов. Морфологические изменения характеризуются появлением мелких рубчиков в мышечной ткани и на месте расположе-

nutritious detritus, there appear not only the vegetating forms of yeasts, but also the significant colonies of microorganisms.

In one of the animals from the specified group, on the 7th day of experimental oral candidiasis recurrency, there were expressed the symptoms of candida sepsis with maximal manifestations in liver tissues. Most of the hepatocytes were on the stages of necrobiosis and necrosis. In the lumen of the vessels, there frequently occurred the thrombs, containing a big amount of different forms of ДПК. Candida invasion proliferated on the walls of the vessels, beyond it and occurred inside of the hepatic lobules. Despite a significant intensity of the alternative processes in liver tissues, reaction for it, as well as in other organs, consisted only in vessel hyperemia and edema with minimal or lack of cellular infiltration.

Spleen of the animals from this group was plethoric, with very small centres of proliferation or its absence, which confirms the thesis about the depression of central mechanisms of immunogenesis by yeasts. Certain number of yeast cells manifests in a connective tissue of salivary gland, thymus, submandibular lymph nodes, and separate components – in kidneys.

In 14 days after the recurrency inception of experimental oral candidiasis, in tongue preparations, there were clearly determined the tendency for smoothing of papillae and its clarification from the PAS-positive layers. However, in some cells on a stratified flat keratinized epithelium of tongue, the active forms of yeasts continue to vegetate, causing the lysis of epitheliocytes. In tongue root, solitary deeper and older erosions occur with the symptoms of regeneration, in a form of growth of 1–2 layers of epitheliocytes on the defect edge. On the bottom of such erosions, it is differentiated a dystrophied, poorly coloured by PAS-reactive, pseudomycelium and ДПК. Destructive changes of mucous membrane are accompanied by a significant inflammatory reaction of deeper layers of tongue in the form of increase in hyperemied microvessels number, bunching of cell components of lymphoid and monocytic rows with a fibroblasts impurity. Moreover, it is noted a vasodilatation of microcapillars, which is indicative of the proliferation of resorption processes of a necrotic

ния желез. В остальном изменения в тканях щеки и языка аналогичны (рис. 8). Все вышеописанные проявления являются следствием непосредственного локального воздействия на ткани активно вегетирующих грибов рода *Candida*.

На 7-й день рецидива экспериментального кандидоза полости рта поражение желудка локализуется в области складки, которая разграничивает две камеры, и в эпителии «железистой камеры». ДПК локализуется в многослойном плоском эпителии и в подслизистом слое. Эпителий многих участков покрыт ШИК-положительным материалом, содержащим значительное количество различных форм грибов, некротизированные клетки покровного эпителия, единичные лейкоциты. Под этими наслоениями в слизистой оболочке обнаруживаются поверхностные эрозии, на дне которых определяется некоторое количество псевдомицелия. В интерстициальной ткани на уровне ямок под эрозиями имеются скопления двоякозаломяющего материала погибших грибов.

Глубокие слои желудочного эпителия не имеют признаков поражения. Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистый слой в зонах поверхностного вегетирования гриба полнокровные, отечные, инфильтрованы лимфоцитами и элементами моноцитарного ряда с примесями эозинофилов. В мышечной и серозной оболочках желудка ДПК встречаются.

Морфологические изменения в кишечнике отличаются большей распространенностью эрозий, выраженностью диффузной лейкоцитарной инфильтрации собственной и мышечной пластинок слизистой оболочки и их значительным отеком, а также отслойкой серозной оболочки от мышечной. При этом в просвете кишечника в массе пищевого детрита оказываются не только вегетирующие формы грибов, но и значительные колонии микроорганизмов.

У одного животного указанной группы на 7-й день рецидива экспериментального кандидоза полости рта были выражены признаки кандидозного сепсиса с максимальными проявлениями в тканях печени. Большин-

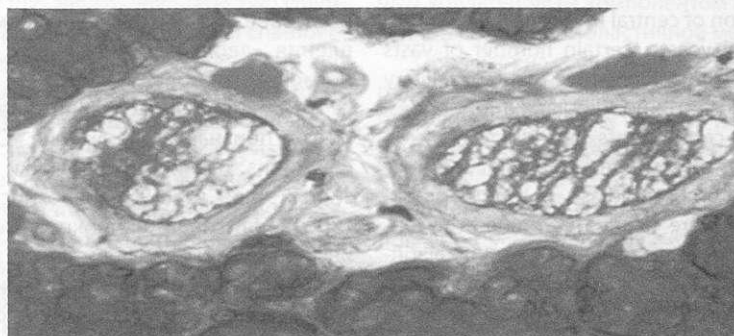
mass from the destruction nidi. Bunching of yeasts and destructive changes are also found in some of the salivary glands (fig. 9) and larynx cartilages (fig. 10). It is followed by leucocytic infiltration with the symptoms of organization inception.

**All the described local changes in tongue tissues are more dropsical**, than on the 7th day of disease. The diffusive infiltration and the amount of mast cells, especially with the symptoms of degranulation, are decreasing. The veins remain plethoric, there occurs a significant number of extended lymphatic vessels. Arteries and arterioles are notable for medias hypertrophy.

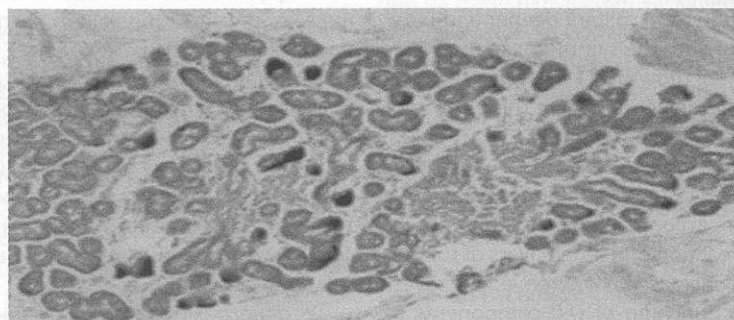
In some jaw preparates, there are registered the symptoms of proliferation of covering epithelium wiyh its submersible growth into muscle tissue, with no changes in basal membrane integrity. The other symptoms of candidiasis on jaw is analogous to those on tongue.

ство гепатоцитов находилось в стадиях некробиоза и некроза. В просвете сосудов часто встречались тромбы, содержащие большое количество различных форм ДПК. Кандидозная инвазия распространялась на стенки сосудов, за их пределы и оказывалась внутри долек печени. Несмотря на значительную выраженность альтернативных процессов в тканях печени, реакция на них, как и в других органах, заключалась лишь в гиперемии сосудов и отека или при отсутствии минимальной клеточной инфильтрации.

Селезенка животных этой группы была полнокровной, с очень мелкими центрами размножения или с их отсутствием, что подтверждает тезис об угнетении грибами центральных механизмов иммуногенеза. Небольшое количество клеток грибов проявляется в соединительной ткани слюнных желез, тимусе, подчелюстных лимфатических узлов, а также отдельные элементы – в почках.



a)



b)

**Fig. 9. Lesion of salivary gland by Candida species yeasts during the experimental oral candidiasis recurrency: a) invasion of submandibular gland ducts. PAS-reaction. O6. 10, ок.40; b) destruction of salivary gland with leucocytic infiltration. Hematoxylin-eosin. O6. 10, ок. 10**

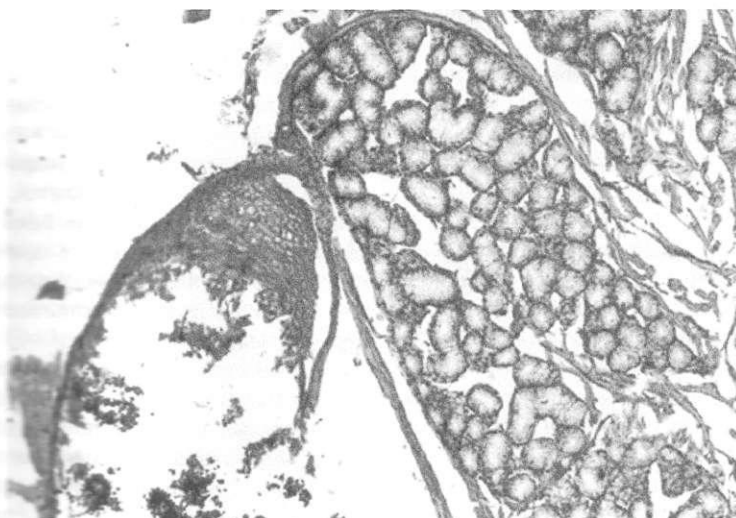


Fig. 10 Destruction of larynx cartilage, salivary gland lysis in experimental animals with the chronic oral candidiasis recurrence. Hematoxylin-eosin.  $\times 6$ . 10,  $\times 10$ .

In gastric tissues of all the animals, on the 14th day of the experimental oral candidiasis recurrence, there is indicated the destruction of superficial layer of epithelium. In desquamated layers of cells, there are a lot of pseudomycelium with conidia whorls, as well as a freely located ДПК, including the bud-forming ones. In the submucous layer, the symptoms of hyperemia and leucocytic infiltration against the background of excessive amount of eosinophiles, manifest. In some of the animals, the yeasts components are associated with a significant amount of cocci microflora colonies.

In small intestine, there are also notified the necrosis and superficial layers of epithelium (apical part of villi) desquamation symptoms, resulted by an active yeasts growth. In large intestine, the pseudomycelium and ДПК components are more usually in the state of dystrophy, and are associated with the groups of *E. coli*. However, the symptoms of erosion regeneration become to manifest brightly.

In liver, on the 14th day of the recurrence of experimental oral candidiasis, there are notified vein plethora, inconsiderable interstitial edema and abstinent fatty dystrophy of hepatocytes. Solitary components of yeasts appears under the capsule, especially in the sections of fatty

Через 14 дней от начала рецидива экспериментального кандидоза полости рта в препаратах языка четко определяется тенденция к сглаживанию сосочков и очистке их от ШИК-положительных наслоений. Однако в некоторых ячейках на многослойном плоском ороговевающем эпителии языка продолжают вегетировать активные формы грибов, вызывая лизис эпителиоцитов. В корне языка встречаются единичные более глубокие и давние эрозии с признаками регенерации в виде нарастания 1–2 слоев эпителиоцитов по краям дефекта. На дне таких эрозий дифференцируется дистрофированный, слабо окрашенный ШИК-реактивом псевдомицелий и ДПК. Деструктивные изменения слизистой оболочки сопровождаются значительной воспалительной реакцией более глубоких слоев языка в виде увеличения количества резко гиперемированных микрососудов, скопления клеточных элементов лимфоидного и моноцитарного рядов с примесью фибробластов. Кроме того, отмечается расширение лимфокапилляров, что свидетельствует об усилении процессов резорбции некротических масс из очагов деструкции. Скопление грибов и деструктивные изменения обнаруживаются также в некоторых слюнных железах (рис. 9)

dystrophy of hepatocytes. Somewhere in biliary ducts, mycelium is found.

The spleen, as well as on the 7th day of recurrency, is notable for a significant plethora of sinuses. Its follicles are relatively large, but with no proliferation centres. Around the follicles, it is localized the bunchings of macrophages, containing in its plasma PAS-positive detritus.

Thus, the experimental oral candidiasis recurrency begins from the activation of candida-infection cells, which are located in the sections of submersible growth of epithelium basal layer, and in granulomas. During the development of the pathological process, the destructive changes of different depth on oral mucosa surface occur, which are more expressed in the places of organized primary lesion components. Due to the infiltration by lymphocytes, eosinophiles and mast cells with high secretory activity on an early stage of the recurrency formation, the inflammation gains the allergic symptoms. Due to the development of the productive inflammation, the symptoms of a sustained circulation disorder occur, that leads to hypoxia. In the course of the recurrency, there are contact and lympho- and hematogenic proliferation of *Candida* species yeasts, with the formation of specific for candida-infection changes in other sections of the gut, liver, submandibular lymph nodes, thymus and spleen. The intensity of these changes may gain the symptoms of candida-sepsis. The direct alteration of immunocompetent organs against the background of intoxication, allergization and hypoxia cause the changes on a morphological level, which confirms a significant role of immunodeficiency in pathogenesis of the disease.

Thus, as the result of the experiment about the simulation of oral candidiasis recurrency on the experimental model, and the determination of immunal response and histomorphological dynamics, we can make the following conclusions.

1. The developed experimental model simulates the oral candidiasis recurrency adequately, and can be used for studying of the main pathogenic mechanisms of the disease and for determination of the efficiency of antifungal drugs.
2. Immunal response dynamics during the experimental oral candidiasis recurrency can

и хрящах гортани (рис. 10). Их сопровождает лейкоцитарная инфильтрация с признаками начала организации.

Все описанные локальные изменения ткани языка менее отечны, чем на 7-й день заболевания. Уменьшается диффузная инфильтрация и количество тучных клеток, особенно с признаками дегрануляции. Вены остаются полнокровными, появляется значительное количество растянутых лимфатических сосудов. Артерии и артериолы отличаются гипертрофией меди.

В некоторых препаратах щеки зарегистрированы признаки пролиферации покровного эпителия с его погружным ростом в мышечную ткань без изменения целостности базальной мембраны. Другие проявления кандидоза на щеке аналогичны изменениям на языке.

В тканях желудка всех животных на 14-й день рецидива экспериментального кандидоза полости рта выявляется деструкция поверхностного слоя эпителия. В слизистых слоях клеток очень много псевдомицелия с мутноватыми конидиями, а также свободно расположенных ДПК, в том числе почкообразующих. В подслизистом слое проявляются признаки гиперемии, лейкоцитарной инфильтрации на фоне избыточного содержания эозинофилов. У некоторых животных элементы грибов ассоциируются со значительным количеством колоний кокковой микрофлоры.

В тонком кишечнике также отмечаются признаки некроза и десквамации поверхностных слоев эпителия (апикальной части ворсин) в результате активного роста грибов. В толстом кишечнике элементы псевдомицелия и ДПК чаще находятся в состоянии дистрофии и ассоциируются с группами кишечных палочек. Однако начинают ярко проявляться признаки регенерации эрозий.

В печени на 14-й день рецидива экспериментального кандидоза полости рта отмечается венозное полнокровие, незначительный интерстициальный отек и умеренная жировая дистрофия гепатоцитов. Единичные фрагменты грибов оказываются под капсулой, особенно в участках жировой дистрофии гепатоцитов. Кое-где в желчных протоках выявляется мицелий.

be characterized in a following way:

- at the recurrency inception (day P0), the deficiency of immunity cellular section (lymphocytopenia, decreasing of T-lymphocytes value) occurs, against the background of compensatory increase of lymphocyte-mediated cytotoxicity and the factors of non-specific immunity (phagocytosis, interferonogenesis);
  - during the next 7 days, there is no positive dynamics in immunal response, and antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity decreases;
  - on the 14th day of the recurrency, the conditions of oxygen-dependent mechanisms of phagocytic activity of neutrophils, spontaneous and antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity and interferon formation are restored;
  - on the 21th day of the recurrency, T-lymphocytes value is normalized, and B-lymphocytes value – exceeds the indexes of non-infected animals a little.
3. Morphohistological changes in the experimental chronic oral candidiasis recurrency manifest:
- at the recurrency inception (day P0) – proliferation of the fungal infection in two following ways – due to the infiltration of epithelium of oral mucosa by superficially located colonies, and activation of deeply located nidi, which are immature, in case of acute candidal lesion, granulemas;
  - during the next 7 days – proliferation of candidal lesion symptoms on deep layers of oral mucosa, destruction of the tissues in the places of granulemas against the background of lymphoid-macrophagal reaction, hypoxia, local hemostasis; involvement of the alimentary tract, liver and immune-endocrine system into the pathological process by lymphogenic and hematogenic dissemination of yeasts;
  - through 7–21 days of the recurrency – activation of regenerative processes in the sections of previous lesions, with formation of microabscesses in the zones of perivascular vegetation of yeasts colonies.

Селезенка, как и на 7-й день рецидива, отличается значительным полнокроем синусов. Их фолликулы относительно крупные, но без центров размножения. Вокруг фолликулов локализуются скопления макрофагов, содержащие в цитоплазме ШИК-положительный детрит.

Таким образом, рецидив экспериментального кандидоза полости рта начинается с активизации ячеек кандиды-инфекции, которые расположены в участках погружного роста базального слоя эпителия и в гранулемах. В ходе развития патологического процесса возникают деструктивные изменения на поверхности СОПР различной глубины, которые более выражены в местах организованных первичных элементов поражений. За счет инфильтрации лимфоцитами, эозинофилами и тучными клетками с высокой секреторной активностью на ранних этапах формирования рецидива воспаление приобретает признаки аллергического. Вследствие развития продуктивного воспаления возникают признаки длительного нарушения микроциркуляции, что приводит к гипоксии.

На протяжении рецидива имеет место контактное, а также лимфо- и гематогенное распространение грибов рода *Candida* с формированием характерных для кандиды-инфекции изменений в других отделах пищеварительного канала, печени, подчелюстных лимфатических узлах, тимусе и селезенке. Выраженность этих изменений может приобретать признаки кандиды-сепсиса. Непосредственная альтерация иммунокомпетентных органов на фоне интоксикации, аллергизации и гипоксии вызывает изменения на морфологическом уровне, что подтверждает существенную роль иммунодефицита в патогенезе заболевания.

## Выводы

В результате проведенного исследования по воспроизведению рецидива кандидоза полости рта на экспериментальной модели и определения динамики иммунного ответа и гистоморфологических изменений можно сделать следующие выводы.

Разработанная экспериментальная модель адекватно воспроизводит рецидив кан-

дидоза полости рта и может использоваться для изучения главных патогенетических механизмов заболевания и определения эффективности противогрибковых препаратов.

Динамику иммунного ответа во время рецидива экспериментального кандидоза полости рта можно охарактеризовать следующим образом:

- в начале рецидива (день P0) возникает дефицит клеточного звена иммунитета (лимфоцитопения, уменьшение содержания Т-лимфоцитов) на фоне компенсаторного повышения антителозависимой цитотоксичности лимфоцитов и факторов неспецифического иммунитета (фагоцитоза, интерфероногенеза);
- в течение следующих 7 дней не наблюдается положительной динамики иммунного ответа, а антителозависимая цитотоксичность лимфоцитов уменьшается;
- на 14-й день рецидива восстанавливается состояние кислородозависимых механизмов фагоцитарной активности нейтрофилов, спонтанной и антителозависимой цитотоксичности лимфоцитов и интерферонообразования;
- на 21-й день рецидива содержание Т-лимфоцитов нормализуется, а В-лимфоцитов – несколько превышает показатели неинфицированных животных.

Морфогистологические изменения при рецидиве экспериментального хронического кандидоза полости рта проявляются:

- в начале рецидива (день P0) – распространением грибковой инфекции двумя путями – за счет инфильтрации эпителия СОПР поверхностно расположенными колониями и активизации глубоко расположенных очагов, которые представляют собой несформированные при остром кандидозном поражении гранулемы;
- в течение следующих 7 дней – распространением признаков кандидозного поражения на глубокие слои СОПР, деструкцией тканей в местах гранулем на фоне лимфоидно-макрофагальной реакции, гипоксии, локального гемостаза; вовлечением в патологический процесс пищеварительного тракта, печени и иммуно-эндокринной системы лимфогенной и гематогенной диссеминацией грибов;
- в течение 7–21 дней рецидива – активизацией регенеративных процессов в участках предыдущих поражений с формированием микроабсцессов в зонах периваскулярной вегетации колоний грибов.

## ■ REFERENCE

1. Jarvis William R. (1995) Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections, with Emphasis on Candida Species. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals*, no 20 (6), pp. 1526–1530.
2. Betts Robert F., Nucci M., Talwar D. (2009) A Multicenter, Double-Blind Trial of a High-Dose Caspofungin Treatment Regimen versus a Standard Caspofungin Treatment Regimen for Adult Patients with Invasive Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, no 48 (12), pp. 1676–1684.
3. Leroy O., Gangneux J.-P., Montravers P. (2009) Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Critical Care Medicine*, vol. 37, pp. 1612–1618.
4. Sergeev A., Sergeev Yu. (2001) *Kandidoz. Priroda infekcii, mehanizmy agressii i zashhity, laboratornaya diagnostika, klinika i lechenie* [Candidiasis. The nature of the infection, the mechanisms of aggression and defense, laboratory diagnosis, clinic and treatment]. Moscow: TriadaH, 472 p. (in Russian).
5. Hmel'nickij O., Shevyakov M. (1999) O differencial'noj diagnostike kandidonositel'stva i kandidoza kishechnika [The differential diagnosis of intestinal candidiasis and media candidiasis]. *Problemy medicinskoj mikologii*, no 4, pp. 19–22.



10. Bevetova G., Savichuk N. (2009) Kandidoz organov pishhevareniya u detej i podrostkov [Clinical lecture]. *Mistectvo likuvannya*, no 1 (57), pp. 41–43.
11. Zapadnyuk M., Zapadnyuk V., Zaharina E. (1983) *Laboratornye zhivotnye. Ispol'zovanie v nauchnykh issledovaniyakh* [Laboratory animals. Using experimentally]. Kiev: Vishha shkola, 878 p. (in Russian).
12. Iasthenko V. (1982) *Laboratornaya diagnostika gribkovykh zabolevanij* [Laboratory diagnosis of fungal diseases]. Moscow: Medicina, 142 p. (in Russian).
13. Bikov V. (1987) E'ksperimental'nyj kandidoz organov pishhevaritel'nogo trakta novorozhdennykh [The experimental candidiasis of the digestive tract of newborns]. *Arhiv patologii*, no 4, pp. 45–49.
14. Bikov V. (1987) E'ksperimental'no-gistologicheskoe issledovanie kandidoznogo stomatita novorozhdennykh [Experimental and histological examination thrush newborn]. *Stomatologiya*, no 6, pp. 45–49.
15. Teppermen Dzh., Teppermen H. (1989) *Fiziologiya obmena veshhestv i e'ndokrinnoj sistemy* [Physiology of Metabolism and Endocrine System]. Moscow: Mir, 656 p. (in Russian).
16. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. (1995) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press, 1482 p.
17. Luk'yanova E., Makeev S. (1988) *Sovremennyye metody medicinskoj informatiki v pediatricheskoj nauke i praktike* [Modern methods of medical informatics in pediatric science and practice]. *Pediatrics*, no 3, pp. 5–8.
18. Zerbino D., Lukasevis L. (1984) *Metody dlya opredeleniya vozrasta fibrina pri sindrome disseminirovannogo vnutrisudisnogo svertyvaniya* [Methods for determining the age of fibrin during clotting of disseminated vnutrisudisnogo]. *Arhiv patologii*, no 8, pp. 72–75.
19. Primel' H.B.J. (1986) *Osnovy immunologii* [Fundamentals of Immunology]. Moscow: Mir, 254 p. (in Russian).
20. Chermushenko E., Kruglova I., Kruglov Yu. (1989) *Modifikatsiya metoda opredeleniya citotoksicheskoy aktivnosti killernykh kletok: informacionnoe pis'mo* [Modification of the method for determining the cytotoxic activity of killer cells: Information pismo]. Kiev, 3 p. (in Russian).

Получена в редакцию: 25.05.2015  
Адрес: docbetetova@i.ua