

Взаимосвязь уровня β -дефензина-1 в ротовой жидкости пациентов с кандидозным стоматитом после перенесенной коронавирусной инфекции

А.А. Пожарицкая, И.Ю. Карпук

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

The relationship of the level of β -defensin-1 in the saliva of patients with oral candidiasis after CoVID-19 infection

A.A. Pozharitskaya, I.Yu. Karpuk

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Цель исследования: определить уровень и клиническое значение β -дефензина-1 в ротовой жидкости у пациентов с кандидозным стоматитом (КС) после перенесенной коронавирусной инфекции.

Объектом исследования были 67 пациентов с КС (из них – 31 пациент имел подтвержденный ПЦР диагноз коронавирусной инфекции) и 23 пациента контрольной группы без КС.

Методы исследования: взятие мазков со слизистой оболочки рта для подтверждения диагноза микробиологическим методом, ИФА для оценки уровня β -дефензина-1 в ротовой жидкости.

По результатам исследования в группе пациентов с КС после COVID-19 ($n=31$) наиболее часто встречалась хроническая гиперпластическая форма кандидоза (64,5%), по локализации – кандидозный глоссит (77,4%, $p<0,05$). Влияние коронавирусной инфекции на мукозальный иммунитет оценивалось по нескольким фактам. Впервые развившийся КС в группе пациентов после COVID-19 ($n=31$) встречался в 74,2% случаев ($p<0,05$) в сравнении с группой пациентов с КС без COVID-19 анамнезе ($n=36$), где этот показатель составил 41,7%. Причем у пациентов в группе с КС после COVID-19 уровень β -дефензина-1 сильно положительно коррелировал с частотой встречаемости впервые возникших эпизодов КС ($R_{\text{Spearman}}=0,76$, $p<0,001$). Также было установлено, что наиболее низкий уровень β -дефензина-1 в РЖ был у пациентов с КС после COVID-19 ($2,1\pm 0,8$ нг/мл, $p<0,001$). Он был достоверно ниже ($p<0,001$) аналогичного показателя в группе пациентов с КС и контрольной группе. Было выявлено, что у пациентов с КС после COVID-19 уровень β -дефензина-1 в РЖ отрицательно коррелировал с длительностью заболевания COVID-19 ($R_{\text{Spearman}}=-0,78$, $p<0,001$), что можно трактовать, как объективный показатель влияния SARS-CoV-2 на эпителиальные клетки СОР.

Summary

Aim: to determine the level and clinical significance of β -defensin-1 in the saliva in patients with *Candida* stomatitis after a previous coronavirus infection.

The object of the study was 67 patients with *Candida* stomatitis (of which 31 patients had a PCR-confirmed diagnosis of coronavirus infection) and 23 patients of the control group without candidal stomatitis.

Research methods: taking smears from the oral mucosa to confirm the diagnosis with a microbiological method, ELISA to assess the level of β -defensin 1 in the saliva.

According to the results of the study, in the group of patients with oral candidiasis (OC) after COVID-19 ($n=31$), the most frequent was the chronic hyperplastic form of candidiasis (64,5%), in terms of localization – *Candida* glossitis (77,4%, $p<0,05$). It was found that the primary OC in the group of patients after COVID-19 ($n=31$) was 74,2% of cases ($p<0,05$), and in the group of patients with OC without a history of COVID-19 ($n=36$) this indicator amounted to 41,7%. Moreover, in patients in the group with OC after COVID-19, the level of β -defensin-1 strongly positively correlated with the incidence of primary episodes of OC ($R_{\text{Spearman}}=0,76$, $p<0,001$). It was also found that the lowest β -defensin-1 level in saliva was in patients with OC after COVID-19 ($2,1\pm 0,8$ ng/ml, $p<0,001$). It was significantly lower ($p<0,001$) than in the group of patients with OC and the control group. It was found that in patients with OC after COVID-19, the level of β -defensin-1 in the saliva was negatively correlated with the duration of the COVID-19 ($R_{\text{Spearman}}=-0,78$, $p<0,001$), which can be interpreted as an objective indicator of the effect of SARS-CoV-2 on epithelial cells of the oral mucosa.

Ключевые слова

Кандидоз слизистой оболочки рта, *Candida*, β -дефензин-1, ротовая жидкость, COVID-19, SARS-CoV-2.

Введение

Респираторное заболевание, вызванное вирусом, известным как коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2, 2019-nCoV), было объявлено Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пандемией 11 марта 2020 года. На территории Республики Беларусь (РБ) рост коронавирусной инфекции (COVID-19) начался в апреле 2020 года. К июлю 2021 года в РБ по официальным данным было установлено около 430 тысяч заражений и более 3 тысяч умерших от COVID-19 [1]. Одним из первых в РБ с проблемой коронавирусной инфекции столкнулось врачебное и научное сообщество Витебской области.

Начиная с июня 2020 года количество пациентов с кандидозным стоматитом, обратившихся на кафедру терапевтической стоматологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ и УЗ «Витебский областной клинический стоматологический центр», значительно увеличилось. Как выяснилось при обследовании этих пациентов, кандидозный стоматит развивался у них впервые после перенесенной коронавирусной инфекции, что и привлекло наше внимание к данной проблеме.

Коронавирус способен поражать эпителиальные клетки человека. Впервые SARS-CoV-2 был выделен из эпителия дыхательных путей, а затем и других локализаций [2, 3]. Поэтому изучение влияния SARS-CoV-2 на эпителиальные клетки организма человека особенно актуально. В настоящее время считается, что SARS-CoV-2 уклоняется от врожденного противовирусного иммунитета, подвергается эндоцитозу и сливается с мембраной клетки-хозяина, используя рецепторы АПФ2 [4]. Высокая экспрессия АПФ2 была идентифицирована как на поверхности альвеол легких, так и на эпителиальных клетках других локализаций: многослойном плоском эпителии пищевода и слизистой оболочки рта, энтероцитах подвздошной и толстой кишки, клетках миокарда, клетках мочевого пузыря и проксимальных канальцев почек, где начинает активно размножаться [5].

Эпителиальные клетки, считающиеся физическим барьером для предотвращения инфекции, играют активную роль в первичном иммунном ответе. β -дефензины локализуются на слизистой

Keywords

Candida stomatitis, oral candidiasis, β -defensin-1, saliva, COVID-19.

оболочке ротовой полости, ноздрей, верхних дыхательных путях, слюнных железах [6, 7, 8]. Именно эти области считаются наиболее уязвимыми для проникновения COVID-19 и первичного заражения. Было выявлено, что β -дефензины являются частью мукозального иммунитета для защиты от вирусов на слизистой оболочке, включая коронавирусы [9-13].

Подавление врожденной системы иммунитета (СИ), в том числе после перенесенной коронавирусной инфекции, определяет повышенный риск грибковых инфекций [14]. Об этом свидетельствуют и данные, что частота появления кандидозного стоматита у пациентов после коронавирусной инфекции значительно выше, чем у здоровых лиц [15]. Имеется достаточно данных об идентификации иммунных рецепторов, ответственных за распознавание грибов, а также о характеристике роли цитокинов и других врожденных медиаторов в развитии защитного иммунного ответа [16, 17]. Однако роль эпителиальных клеток и антимикробных пептидов в иницировании врожденных иммунных ответов на слизистой оболочке рта в ответ на грибковую инфекцию изучена недостаточно. Таким образом, изучение роли эпителиального β -дефензина-1 у пациентов с кандидозным стоматитом после COVID-19 является весьма актуальным.

Цель: определить уровень и клиническое значение β -дефензина-1 в ротовой жидкости у пациентов с кандидозным стоматитом после перенесенной коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе кафедры терапевтической стоматологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ и УЗ «Витебский областной клинический стоматологический центр». Объектом исследования стали 67 пациентов в возрасте от 21 до 75 лет (43 женщины и 24 мужчины), которым за период с 2012 по 2020 гг. был поставлен диагноз по МКБ-10 В37.0 «кандидозный стоматит» (КС). Из них 31 пациент (20 женщин и 11 мужчин) имел в анамнезе подтвержденный диагноз коронавирусной инфекции. Для исследования стоматологического статуса и состояния СИ в контрольную группу вошли 23 пациента без кандидоза слизистой оболочки рта (СОР) и ко-

ронавирусной инфекции в течение 1 года до исследования, сопоставимые по полу (16 женщин и 7 мужчин) и возрасту (средний возраст $42,6 \pm 2,7$). Все пациенты были проинформированы о сути исследования и отобраны в соответствии с критериями включения (табл. 1).

При сборе анамнеза у пациентов выяснялась продолжительность заболевания COVID-19 и сроки наблюдения после болезни. Пациентам было проведено обследование слизистой оболочки рта согласно рекомендациям ВОЗ с заполнением стоматологической амбулаторной карты. При оценке клинического состояния пациентов учитывались типичные жалобы пациентов на чувство жжения и дискомфорта во рту, неприятные ощущения и боль при приеме пищи (особенно острой), гипосаливация, ксеростомия (сухость) или наличие пенистой, вязкой слюны, галитоз. Визуально могла определяться эритема и отек слизистой с гладкой блестящей поверхностью или белесоватый легко снимающийся налет на слизистой языка, щек, неба и другие симптомы.

Для подтверждения диагноза у пациентов были взяты мазки с СОР для проведения микробиологического исследования (посевы на среду Сабуро) и определения количества КОЕ грибов, их чувствительности к антимикотическим препаратам и наличия сопутствующей микрофлоры. Материал тщательно собирали стерильным зонд-тампоном с вязкозным наконечником (Ningdo Greetmed MI Co, China) со слизистой оболочки щек, основания языка, десен. Пробу в пробирке в течение 2 часов транспортировали в микробиологическую лабораторию УЗ «Витебская областная клиническая больница» или бактериологическую лабораторию Витебского областного центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья. Диагноз подтверждался при наличии клинических симптомов и положительного ре-

зультата микробиологического исследования (выделение культуры *Candida spp.* из патологического материала с количеством колоний при посеве $\geq 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона).

Для определения уровня β -дефензина-1 у пациентов собирались образцы ротовой жидкости (РЖ) путем сплевывания в центрифужные пробирки типа Эппендорф в утренние часы натощак до чистки зубов. После забора РЖ центрифугировали в лаборатории в режиме 2000 об./мин в течение 10 мин, собирали надосадочную жидкость и хранили при температуре -70°C до постановки реакции.

В собранных биосубстратах методом ИФА определяли уровень β -дефензина-1 с использованием реактивов «Human Beta-defensin-1 ELISA Kit» фирмы «Bioassay Technology Laboratory» (Китай). Анализы проводили в 96-луночных микропланшетах для иммунополисорбирования в соответствии с инструкциями производителя. Добавляли 50 мкл стандартного раствора в стандартную лунку и по 40 мкл образцов в соответствующие лунки, затем добавляли 10 мкл антител в лунки для образцов и 50 мкл стрептавидинпероксидазы хрена в лунки для образцов и стандартные лунки, исключая лунку с контролем. Хорошо перемешивали, герметично закрывали пленкой и инкубировали 60 минут при 37°C . Затем 5 раз автоматически промывали планшет промывочным буфером и промакивали пластину. Добавляли 50 мкл раствора субстрата А и затем столько же раствора субстрата В в каждую лунку. Инкубировали планшет в течение 10 минут при 37°C в темноте. После добавляли в каждую лунку 50 мкл стоп-раствора, фиксировали смену цвета и определяли оптическую плотность в течение 10 минут после добавления стоп-раствора. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при 450 нм с эталоном при 620 нм, и количествен-

Таблица 1. Критерии включения/исключения пациентов в опытную группу

Критерии включения	Критерии исключения
Возраст старше 18 лет	Возраст до 18 лет
Наличие микробиологического подтверждения выделения культуры <i>Candida spp.</i> из патологического материала с количеством колоний при посеве $\geq 1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона	Выделение культуры <i>Candida spp.</i> из патологического материала с количеством колоний при посеве менее $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл смыва с тампона
Наличие подтвержденного диагноза COVID-19 методом ПЦР в анамнезе	Сахарный диабет, ВИЧ-инфекция, лечение онкологической патологии, прием иммунодепрессантов на постоянной основе Беременность и период грудного вскармливания Отказ пациента от исследования

ные концентрации сравнивали со стандартным антителом в каждом планшете.

Статистический анализ полученных результатов исследования был выполнен программ Microsoft Excel 2010 и Statistica (Version 10, StatSoft Inc., США, лицензия №СТАФ999К347156W). Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам обследования у пациентов были жалобы на сухость во рту (ксеростомию) – в 22 (61,1%) случаях в группе с КС и в 26 (83,4%) случаях в группе с КС после COVID-19, на жжение – в 26 (72,2%) и 16 (51,6%) случаях, на болезненность – в 23 (63,9%) и 11 (35,5%) случаях, дискомфорт – в 18 (50%) и 20 (64,5%) случаях, на галитоз – в 21 (58,3%) и 7 (22,5%) случаях соответственно в двух группах. Кроме этого, у 19 (61,3%) пациентов с КС после COVID-19 отмечались жалобы на потерю вкуса, а в 12 (38,7%) случаях были жалобы на аносмию (табл. 2).

При анализе анамнестических данных выявлено, что у 23 (74,2%) пациентов с КС после COVID-19 не было эпизодов кандидоза в анамнезе и он появился впервые после инфицирования SARS-CoV-2. В группе с КС этот показатель достоверно отличался ($p \leq 0,05$) и был отмечен у 15 (41,7%) пациентов.

В ходе обследования в группе пациентов с КС после COVID-19 преобладала хроническая гиперпластическая (налетопоподобная) форма кандидоза в 20 (64,5%) случаях, чаще в виде желтоватого, беловатого трудноснимающегося налета, гиперкератоза нитевидных сосочков

дорсальной поверхности языка. В группе пациентов с КС хроническая гиперпластическая форма кандидоза встречалась в 16 (44,4%) случаях, причем как налетоподобная, так и узелковая формы. Распространенность глоссита по сравнению с другими локализациями в группе с КС после COVID-19 составила 77,4% ($n=24$). У лиц с КС с локализацией на языке определялся у 15 человек, что составило 41,7%. В ряде исследований было установлено, что среди различных участков СОР экспрессия АПФ2 была выше в эпителии языка, чем в других областях (слизистой оболочки щеки, десны) [18]. АПФ2, является основным рецептором для проникновения SARS-CoV-2 через эпителий. Этим можно объяснить значительную распространенность кандидозного глоссита после инфицирования SARS-CoV-2 на фоне длительной персистенции вируса на СОР и как следствие недостаточности местной СИ.

В результате оценки мукозального иммунитета пациентов с КС методом ИФА с количественным определением уровня β -дефензина-1 отмечено снижение его концентрации в РЖ у лиц с КС относительно контрольной группы без КС ($p < 0,001$), а также достоверное понижение этого показателя в группе лиц с КС после COVID-19 относительно лиц контрольной группы ($p < 0,001$) и пациентов с КС ($p < 0,001$) (табл. 3). Это указывает на потенциальную возможность SARS-CoV-2 угнетать функцию эпителия СОР.

Анализ полученных данных показал, что между уровнем β -дефензина-1 в РЖ у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции и длительностью заболевания COVID-19 существует сильная отрицательная корреляционная связь ($R_{\text{Spearman}} = -0,78$, $p < 0,001$). В связи с тем, что

Таблица 2. Клинико-анамнестические факторы кандидозного стоматита в исследуемых группах

Жалобы, признаки	Пациенты с КС (n=36)		Пациенты с КС после COVID-19 (n= 31)	
	Абс.	%	Абс.	%
Наличие жалоб / бессимптомное течение	31/5	86/14	27/4	87/13
Ксеростомия (сухость во рту)	22	61,1	26	83,4*
Налет/ гиперемия	20	55,6	8	25,8*
Жжение	26	72,2	16	51,6
Болезненность	23	63,9	11	35,5
Дискомфорт	18	50	20	64,5
Галитоз	21	58,3	7	22,5*
Аносмия	-	-	12	38,7
Потеря вкуса	-	-	19	61,3

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с группой пациентов с КС

Таблица 3. Уровень β -дефензина-1 в ротовой жидкости пациентов с кандидозом СОР после COVID-19 и контрольной группы, $M \pm s$

Группа	1. Контрольная группа (n= 23)	2. Пациенты с КС (n= 36)	3. Пациенты с КС после COVID-19 (n= 31)
Уровень β -дефензина-1 в РЖ (нг/мл)	4,5 \pm 1,1 ^{2,3}	3,4 \pm 0,9 ^{1,3}	2,1 \pm 0,8 ^{1,2}

Примечание: цифры в верхнем индексе ^{1,2,3} показывают, с какой исследуемой группой показатель имеет статистически достоверное различие ($p < 0,001$).

β -дефензин-1 синтезируется в клетках эпителия, через которые посредством АПФ2 SARS-CoV-2 проникает в организм человека, снижение концентрации β -дефензина-1 в РЖ при увеличении продолжительности заболевания COVID-19 говорит о негативном влиянии SARS-CoV-2 на эпителиальные клетки СОР.

При сравнении уровня β -дефензин-1 у пациентов в группе с КС после COVID-19 и в группе с КС без COVID-19 в анамнезе по частоте встречаемости впервые возникших эпизодов КС получена сильная положительная корреляционная связь ($R_{\text{Spearman}} = 0,76$, $p < 0,001$) в группе с КС после COVID-19. В группе с КС без COVID-19 в анамнезе корреляция между уровнем β -дефензина-1 и развитием КС как впервые возникшего не выявлена ($R_{\text{Spearman}} = 0,17$, $p > 0,05$). Это может говорить о том, что снижение мукозального иммунитета у пациентов после COVID-19 может стать причиной возникновения КС впервые на этом фоне.

Выводы

1. В группе пациентов с КС после COVID-19 (n=31) наиболее часто встречалась хроническая гиперпластическая форма кандидоза (64,5%), а у пациентов с КС (n=36) хроническая гиперпласти-

ческая форма встречалась реже ($p < 0,05$) в 44,4% случаев. По локализации КС в группе пациентов после COVID-19 самым распространенным был кандидозный глоссит (77,4%, $p < 0,05$).

2. Установлено влияние коронавирусной инфекции на мукозальный иммунитет, на что указывает факт впервые развившегося КС в группе пациентов после COVID-19 (n=31) в 74,2% случаев ($p < 0,05$) в сравнении с группой пациентов с КС без COVID-19 анамнезе (n=36), где этот показатель составил 41,7%. Причем у пациентов в группе с КС после COVID-19 уровень β -дефензина-1 сильно положительно коррелировал с частотой встречаемости впервые возникших КС ($R_{\text{Spearman}} = 0,76$, $p < 0,001$).

3. Наиболее низкий уровень β -дефензина-1 в РЖ был у пациентов с КС после COVID-19 ($p < 0,001$) по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с КС и контрольной группы.

4. У пациентов с КС после COVID-19 уровень β -дефензина-1 в РЖ отрицательно коррелировал с длительностью заболевания COVID-19 ($R_{\text{Spearman}} = -0,78$, $p < 0,001$). Дефицит β -дефензина-1 в РЖ после COVID-19 может стать одним из показателей иммуносупрессии, и как следствие – одной из причин развития кандидозного стоматита.

Литература

1. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Минск. URL: <http://minzdrav.gov.by>. Дата доступа: 15.02.2021. Текст: электронный.
2. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M. et al. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020; 27: 704-709.
3. Ziegler C.G.K., Miao V.N., Owings A.H. et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. Preprint. *bioRxiv*. 2021; 2021.02.20. 431155. Published 2021 Feb 20. DOI: 10.1101/2021.02.20.431155.
4. Deinhardt-Emmer S., Böttcher S., Häring C. et al. SARS-CoV-2 causes severe epithelial inflammation and barrier dysfunction. *J Virol*. 2021; 95(10): e00110-21. DOI: 10.1128/JVI.00110-21.
5. Pruijboom L. SARS-CoV 2: possible alternative virus receptors and pathophysiological determinants. *Med Hypotheses*. 2021; 146:110368. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110368.
6. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит., 2009, 464 с.
7. Lotte M., Dijck P.V. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*. 2013; 59: 251-264.
8. Kim J., Yang Y.L., Jang S.H. et al. Human β -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity. *Virol J*. 2018; 15: 124.
9. John F.K., Snarr B.D., Sheppard D.C. et al. The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity.

Front. Immunol. 2018; 8: 1968–1973. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01968.

10. Liqun Z., Santosh K.G., Shrikanth C.B. et al. Molecular dynamics simulations and functional studies reveal that hBD-2 binds SARS-CoV-2 spike RBD and blocks viral entry into ACE2 expressing cells. *BioRxiv*. 2021; 425621. DOI: 10.1101/2021.01.07.425621.

11. Tomalka J., Azodi E., Narra H.P. et al. β -Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. *J Immunol*. 2015; 194(4): 1788-95. DOI: 10.4049/jimmunol.1203239.

12. Карпук И.Ю. Изменение уровней дефензинов в ротовой жидкости у пациентов при аллергической и неспецифической гиперчувствительности к стоматологическим материалам. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11, 1: 42-50.

13. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Взаимосвязь уровней дефензинов и метаболической активности нейтрофилов у пациентов с гиперчувствительностью к стоматологическим

материалам. *Российский аллергологический журнал* 2017; №1: 60–63.

14. Сахарук Н.А., Козловская А.А. Кандидоз: этиология, клиника, диагностика, лечение. Витебск: ВГМУ, 2010, 192 с.

15. Пожарицкая А.А., Сахарук Н.А., Кашкина Т.А. Кандидоз полости рта у пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию. *Стоматология. Эстетика. Инновации*. 2021; 5, 1: 30-37. DOI: 10.34883/PI.2021.5.1.003.

16. Сергеев А.Ю. Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: «Триада-Х», 2001, 472 с.

17. Toyohiro T., Tetsuro O., Atsuko O. et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32: 586-594. DOI: 10.1034/j.1600-0714.2003.00015.x.

18. Xu H., Zhong L., Deng J. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral. Sci* 2020; 12: 8. DOI: 10.1038/s41368-020-0074-x.

Сведения об авторах:

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

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

Поступила 18.02.2021 г.