

DOI: 10.14427/jipai.2017.3.6

## Выделение ионов металлов из стоматологических сплавов и их влияние на метаболическую и киллинговую активность лейкоцитов

И.Ю. Карпук, В.И. Фадеев

УО «Витебский государственный медицинский университет», Витебск, Беларусь

### Release of metal ions from dental alloys and their effect on the metabolic and killing activity of leukocytes

I.Yu. Karpuk, V.I. Fadeev

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

#### Аннотация

**Цель.** Изучение влияния растворов катионов металлов из стоматологических сплавов и растворов их солей на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов крови.

**Материалы и методы.** Обследовано 22 пациента с жалобами на непереносимость стоматологических материалов (НСМ). Контрольную группу составили 19 пациентов без жалоб на НСМ

**Результаты.** После инкубации фрагментов стоматологических сплавов в воде наблюдается выделение катионов металлов, зависимое от времени инкубации. Этот раствор катионов металлов (РКМ) изменял метаболическую и киллинговую активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ, что может быть маркером непереносимости протезных материалов.

РКМ и РСМ усиливали секрецию ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО $\alpha$ , ИНФ $\gamma$  лейкоцитами цельной крови пациентов с НСМ, что указывало на индукцию в опытной группе гиперчувствительности к компонентам стоматологических сплавов, а в контрольной группе стимулировали только ИЛ-2, ИЛ-10, что указывает на иммуномодулирующий эффект.

Секреция цитокинов лейкоцитами крови пациентов под влиянием компонентов дентальных сплавов может служить маркером их биосовместимости и критерием реакций гиперчувствительности.

Уровень БТШ-70 в сыворотке крови у пациентов с НСМ составил 2,41 [0,79; 2,9] нг/мл, и был ниже по сравнению с контрольной группой – 4,1 [2,23; 5,11] ( $p < 0,05$ ). ФГА стимулировала выделение БТШ-70 в обеих группах. У пациентов опытной группы РКМ угнетал секрецию БТШ-70 (0,8 [0,3; 1,1] нг/мл), а у пациентов контрольной группы – стимулировал (5,7 [4,1; 8,5] нг/мл).

Исходная NO-продуцирующая активность лейкоцитов пациентов обеих групп при инкубировании с ФГА *in vitro* не различалась. Однако, при культивировании их с РКМ происходило угнетение выброса NO лейкоцитами крови.

#### Summary

**Aim of study.** We investigated the effect of metal cations solutions from dental alloys and solutions of metal salts on the functional and metabolic activity of blood leukocytes.

**Materials and methods.** 22 patients with complaints of intolerance to dental materials (IDM) were examined. The control group consisted of 19 patients without IDM complaints.

**Results.** After the incubation of fragments of dental alloys in water, metal cations are identified, depending on the time of incubation. This metal cations solutions (MCS) changed the metabolic and killing activity of blood neutrophils in patients with IDM, which may be a marker of intolerance to prosthetic materials.

MCS and metal salts solutions (MSS) increased the secretion of IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  by whole blood leucocytes in patients with IDM, which indicates that hypersensitivity to the components of dental alloys was induced in the experimental group, and only IL-2, IL-10 were upregulated in the control group, which in turn indicates an immunomodulatory effect. Secretion of cytokines by blood leukocytes of patients influenced by components of dental alloys can serve as a marker of their biocompatibility and a criterion for hypersensitivity reactions.

The serum level of HSP-70 in patients with IDM was 2.41 [0.79; 2.9] ng / ml, and it was lower in comparison with the control group - 4.1 [2.23; 5.11] ( $p < 0.05$ ). The PHA stimulated the release of HSP-70 in both groups. In patients of the experimental group MCS inhibited the secretion of HSP-70 (0.8 [0.3, 1.1] ng / ml), while in the control group it stimulated its secretion (5.7 [4.1, 8.5] ng / ml).

The baseline NO-producing activity of leukocytes in patients of both groups during incubation with PHA *in vitro* did not differ. However, when they were cultivated with MCS, the release of NO by blood leucocytes was suppressed.

#### Ключевые слова

Стоматологические материалы, катионы металлов, выделение цитокинов, БТШ-70.

#### Keywords

Dental materials, metal cations, cytokine release, HSP-70.

#### Введение

При взаимодействии компонентов стоматологических материалов (КСМ) с тканями организма нередко развиваются реакции бионесовместимости, в которых участвует система иммунитета (СИ) [1, 2]. Поэтому существует необходимость в проведении исследований по изучению влияния КСМ на различные звенья СИ.

Изучение *in vitro* реакций клеток крови пациентов на воздействие КСМ показало их влияние на активацию лимфоцитов и базофилов, а также на изменение концентрации в крови ряда цитокинов – [3-8]. В этих реакциях участвуют клетки врожденного иммунитета, в частности нейтрофилы [8-10]. Нейтрофилы обладают различными функциями: адгезивностью, способностью к хемотаксису, свойством захватывать бактерии и другие частицы, убивать захваченные микроорганизмы с помощью кислородзависимых или кислороднезависимых механизмов и элиминировать захваченные объекты фагоцитоза [8-10]. Вместе с тем чрезмерная активация клеток врожденного иммунитета запускает каскадную гиперпродукцию медиаторов воспаления, что ведет к эскалации патологических нарушений в организме пациента [9,11]. В связи с этим оценка функциональной активности нейтрофилов, может являться фактором прогноза развития воспалительных осложнений слизистой оболочки полости рта (СОПР) при непереносимости стоматологических материалов (НСМ). Кроме того, результаты исследования могут способствовать расширению представлений о роли нейтрофилов в патогенезе аллергии на КСМ.

**Целью настоящей работы** было изучение влияния растворов катионов металлов из стоматологических сплавов и растворов их солей на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов крови.

#### Материалы и методы

Обследовано 22 пациента в возрасте от 41 до 72 лет, из них 3 мужчин и 19 женщин, с жалобами на НСМ. Все пациенты указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним.

Контрольную группу составили 19 пациентов (2 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 43 до 69 лет без жалоб на НСМ и без гиперчувствительности к КСМ, сопоставимые по типу ортопедических конструкций и количеству зубопротезных единиц, добровольно согласившиеся пройти обследования на наличие гиперчувствительности к зубопротезным материалам, перед плановой заменой ортопедических конструкций. Сформированные группы были сопоставимы по возрасту и полу. Интерпретация результатов кожного тестирования проводилась согласно общепринятой методике [10]. Все пациенты, включенные в исследование, дали и собственноручно заполнили информированное согласие на участие в работе.

Для исследования были использованы коммерчески доступные и зарегистрированные в Республике Беларусь стоматологические сплавы (СС) (таблица 1).

Для обеспечения однородности образца диаметр ( $R = 5 \pm 0,1$  мм) и высоту ( $h = 3 \pm 0,1$  мм) каждого образца проверяли с использованием штангенциркуля и линейки. Массу образцов определяли при взвешивании на электронных весах Adventury TМPROA V264 (0,01-260 г.). Для 1 и 2 образцов масса составила –  $4,4 \pm 0,050$  г, для 3 и 4 образцов –  $5,6 \pm 0,050$  г. Для исследования была использована вода первого класса (ультрачистая с удельным сопротивлением 18,18 МОм\*см при 25 °С) (далее-вода).

Каждый из образцов погружали в промаркированные полипропиленовые пробирки, содержащей 10 мл воды и инкубировали 60 дней. Все пробы инкубировали при 37 °С и ежедневно по 1 часу гомогенизировали с использованием шейкера (Vortex NM-110). Из каждой пробирки забирали по 2 мл раствора, перемешивали с 2 мл азотной кислоты и определяли уровни ионов Со, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Zn после 2, 7, 14, 21 и 30 дней инкубации методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционно-связанной плазмой (атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, Varian 720 в режиме аксиального обзора плазмы, США). После каждого забора доливали 2 мл воды в каждую из пробирок и учитывали это при расчетах. Для контроля выделения ионов металлов в полипро-

**Таблица 1. Характеристика и последовательность получения образцов СС**

Номер образца	Название образца	Способ изготовления
1	Сплав Co-Cr	Отрезали 3 сантиметра от восковой проволоки (DENTAURUM, Германия) диаметром 5 мм и производили замену на сплав для металлокерамики и бюгелей, кобальтохромовый (Gialloy PA, «BK GiuliniGmbH», Германия, ИМ-7.7257/1108) (рисунок 1 – б) на центробежной индукционнойлитейной установке Ducatron Quattro (Ugin, Франция). Очистку от паковочной массы осуществляли при помощипескоструйной обработки 200 мкм Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . Далее проводили ультразвуковую очистку, проводили шлифовку, полировку образца и пароструйную обработку.
2	Сплав Co-Cr с TiN напылением	Образец № 1 напыляли TiN
3	Штампованно-паянный безTiN напыления	Исходную длину гильзы из стальной нержавеющей ленты, изготовленные методом штамповки и применяемые в зубопротезировании для изготовления зубных коронок диаметром 8 мм. (производстваОО «Полимер-Стоматология» Белгород, Россия) (далее – гильза) при помощи ножниц обрезали до 1 см, края сглаживали при помощи твердосплавной фрезы, обрабатывали пароструйным аппаратом. Обработанные гильзы припаивали основанием (жевательной поверхностью) к обоим концам образца № 1. Концы гильзы сближали друг к другу до плотного соприкосновения. После чего проводили шлифовку, полировку образца и пароструйную обработку
4	Штампованно-паянный с TiN напылением	Образец № 3 напыляли TiN

пиленовых пробирках были также подготовлены контрольные пробирки, содержащие только воду.

Оценку выхода катионов металлов производили в физико-химической лаборатории государственного учреждения «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Атомно-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой, Varian 720 предназначен для одновременного прецизионного экспресс-определения до 73 элементов периодической таблицы в жидких пробах. Он обеспечивает одновременное измерение практически всех эмиссионных линий элементов, позволяя определять все компоненты пробы после однократной аспирации. Типичный диапазон определяемых концентраций от десятых долей ppb (10-8%) до десятков процентов. Линейный диапазон одиночного определения (в режиме MultiCal) до 6 порядков. Использовался метод внешнего стандарта. Градуировочные растворы готовили из мульти элементного стандартного раствора - ICP multi-element standard solution IV Merk 111355 в

диапазоне от 0,0005 до 5,0 мг/л. Анализ каждого образца проводили в трех повторах и значение получали путем вычисления среднего значения из трех экспериментов.

Для того, чтобы полученные образцы растворов катионов металлов (РКМ) были пригодны для постановки НСТ-теста к ним добавляли равный объем 1,8% забуференного физраствора (ЗФР), получая в итоге 0,9% ЗФР.

Исследовали влияние на лейкоциты 0,001% растворов солей металлов (РСМ) в отдельности, кроме этого готовили раствор солей металлов (РСМ) в виде их смеси в равных пропорциях NiCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> в концентрации 0,01 мг/мл в ЗФР. Применение смеси солей металлов обусловлено составом СС.

**Определение метаболической активности нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего**

Определение метаболической функции нейтрофилов проводили в реакции восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ-тест). Утром,

натощак, брали 5-10 мл крови из вены в пробирку с гепарином (20 ЕД на 1 мл крови). Кровь отстаивали в пробирке в течение 1 часа, до момента четкого отделения эритроцитов от лейкоцитов. Отсасывали взвесь лейкоцитов с аутологичной плазмой, центрифугировали при 1000 об/мин, плазму отсасывали, осадок лейкоцитов разводили физиологическим раствором хлорида натрия с добавлением 20% аутологичной плазмы до 5x10<sup>6</sup> клеток в 1 мл. Добавление аутоплазмы увеличивало жизнеспособность лейкоцитов [11].

Поглотительную активность лейкоцитов крови оценивали в реакции фагоцитоза убитой нагреванием микробной взвеси *Staphylococcus aureus* стандартного штамма 209. Метаболическую активность оценивали в спонтанном НСТ-тесте, а также индуцированном *Staphylococcus aureus*, с применением 0,1% раствора НСТ [11]. В исследуемые пробы добавляли по 100 мкл исследуемых растворов (настойки образцов и растворы солей металлов). Контрольные пробы ставились с ЗФР. Опытные и контрольные пробы инкубировали в термостате 30 минут при температуре 37°C. Центрифугировали 3 минуты при 1000 оборотов, с последующим удалением надосадочной жидкости и ресуспензированием в 100 мкл физиологического раствора. Мазки после высыхания на воздухе фиксировали 96% этанолом и окрашивали 0,1% раствором нейтрального красного. Микроскопия проводилась под иммерсионным увеличением (1,25x100), учитывалось количество формазанположительных гранулоцитов в НСТ-тесте и количество гранулоцитов, поглотивших 1 и более стафилококк при оценке фагоцитоза с подсчетом не менее 100 гранулоцитов.

**Определение киллинга кандид лейкоцитами**

Кровь готовили, как и для НСТ-теста. Клетки *Candida albicans* культивировали в течение 24 ч на скошенном агаре с глюкозой. Перед работой клетки смывали физиологическим раствором хлорида натрия, дважды отмывали и готовили суспензию с концентрацией *Candida albicans* 5x10<sup>7</sup> клеток в 1 мл. Количество нежизнеспособных *Candida albicans* в тесте с метиленовым синим не превышало 5% [11, 12].

В ряд пробирок вносили 100 мкл суспензии лейкоцитов пациента и добавляли 50 мкл рабочей взвеси кандид и 50 мкл раствора образца СС или солей металлов. В контроль компоненты стоматологических материалов не добавлялись. Пробы инкубировали в термостате 1 ч при 37 °С. Затем взвесь клеток центрифугировали 5 мин

при 1000 об/мин, отсасывали надосадочную жидкость. К осадку клеток, оставшихся в пробирке, добавляли 200 мкл дистиллированной воды для лизиса клеток крови и ресуспензировали. Для окрашивания убитых фагоцитами кандид добавляли на 10 мин 500 мкл смеси равных объемов 0,2%-ного водного эозина и 0,1%-ного метиленового синего на дистиллированной воде. Далее взвесь клеток центрифугировали, надосадочную жидкость отсасывали, а из осадка делали мазок, высушивали и подсчитывали при световой микроскопии процентное содержание убитых фагоцитами окрашенных в темно-синий цвет дрожжевых клеток. Живые кандиды имели легкую розоватую окраску. Степень модификации киллинга (стимуляция-угнетение) учитывали при изменении показателя на 20% и более по сравнению с контрольными значениями. В контрольных исследованиях с лейкоцитами доноров погибало 25,0 ± 3,8% кандид, что соответствует данным других авторов [12].

**Исследование влияния РКМ и РСМ на выброс цитокинов клетками СИ**

Обследовано 13 пациентов в возрасте от 41 до 72 лет, из них 2 мужчин и 11 женщин, с жалобами на НСМ. Все пациенты указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним.

Контрольную группу составил 10 пациентов (1 мужчина и 9 женщин) в возрасте от 43 до 69 лет без жалоб на НСМ и без гиперчувствительности к ним

Кровь забиралась у пациентов натощак из локтевой вены в пробирки с гепарином (20 ед/мл).

Образцы крови пациентов вносили по 500 мкл в 4 пробирки (12x75 мм) с питательной средой Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), и добавляли на каждый тест: РСМ и РКМ. Ставили 2 контроля: негативный (500 мкл ЗФР) и позитивный (500 мкл митогена фитогемагглютинаина – ФГА) (0,02 мг/мл). Инкубировали 24 часа при 37°C.

После этого пробы центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин, собирали надосадочную жидкость и методом ИФА определяли в ней концентрацию цитокинов: IL-1-бета, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, гамма-интерферон производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Исследование выброса белка теплового шока-70 (БТШ-70) и оксида азота под влиянием РКМ и РСМ проводили с использованием ттест-систем: Human HSP-70 (Heat Shock Protein 70 (номер по

каталогу № E-EL-H1863) и Nitric Oxide (NO), (номер по каталогу № BC0036), Elabscience (Китай).

#### Статистический анализ

Расчеты проводились в программе Statistica 10.0. Данные, подчиняющиеся закону нормального распределения (Shapiro-Wilk  $p > 0,05$ ), обрабатывались с помощью критерия T-test, непараметрические данные – с помощью критерия Mann-Whitney UTest (M-U), парного теста Wilcoxon Matched Pairs Test с указанием уровня достоверности расчета (p).

Цель. Изучение влияния растворов катионов металлов из стоматологических сплавов и растворов их солей на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов крови, выброс цитокинов, белка теплового шока-70 и оксида азота клетками цельной крови.

**Таблица 2. Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации образца №1**

Ион	Контроль	Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации через				
		2 дня	7 дней	14 дней	21 день	30 дней
Co	-0.00118	0.113	0.1440	0.1876	0.2560	0.2682
Cr	-0.00127	НПО	НПО	0.0014	0.0018	0.0027
Cu	-0.0027	0.044	0.06340	0.0980	0.0800	0.0774
Fe	0.0018	0.066	0.0576	0.0840	0.0704	0.1962
Mg	0.005	0.079	0.1536	0.1960	0.2720	0.3762
Mn	-0.0017	0.11	0.1320	0.1750	0.2112	0.2412
Mo	0.0004	0.0018	0.0037	0.0042	0.0064	0.0108
Ni	-0.0018	0.004	0.0192	0.0084	0.0075	0.0090
Zn	0.0067	0.044	0.0348	0.0728	0.1040	0.0149

**Таблица 3. Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации образца №2**

Ион	Контроль	Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации через				
		2 дня	7 дней	14 дней	21 день	30 дней
Co	-0.00118	0.083	0.1200	0.1554	0.2048	0.2214
Cr	-0.00127	НПО	НПО	0.0024	0.0016	0.0018
Cu	-0.0027	0.02	0.0960	0.0840	0.1600	0.2664
Fe	0.0018	0.016	0.0240	0.0378	0.0416	0.0756
Mg	0.005	0.07	0.1320	0.1890	0.2560	0.2880
Mn	-0.0017	0.09	0.1320	0.1890	0.2144	0.2484
Mo	0.0004	0.0009	0.0024	0.0017	НПО	НПО
Ni	-0.0018	0.007	0.0252	0.0140	0.0160	0.0180
Zn	0.0067	0.046	0.1056	0.1022	0.1184	0.1206

#### Результаты исследования

Определение выделения катионов из стоматологических сплавов

Сравнительный химический анализ изучения 4-х образцов показал наличие достоверного увеличения концентрации ионов Co, марганца, цинка, никеля в растворе на протяжении всего периода наблюдений, что указывает на ослабление коррозионной стойкости из-за присоединения припоя и гильзы. Отсутствие прироста концентрации ионов Co в образцах № 2 и 4 – указывает на усиление коррозионной устойчивости сплава за счет наличия напыления (таблицы 2-5). Через 14, 21 и 30 дней наблюдалось увеличение концентрации всех ионов в надосадочной жидкости образца в процессе инкубации, кроме цинка. Сходная ситуация наблюдалась с образцами №2,

**Таблица 4. Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации образца №3**

Ион	Контроль	Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации через				
		2 дня	7 дней	14 дней	21 день	30 дней
Co	-0.00118	0.15	0.2160	0.3038	0.5408	1.1160
Cr	-0.00127	0.028	0.0041	0.0070	0.0448	0.1746
Cu	-0.0027	0.1	0.2544	0.1540	0.2720	0.5220
Fe	0.0018	0.16	0.2676	0.0560	0.3328	0.9360
Mg	0.005	0.08	0.1488	0.2016	0.2704	0.3060
Mn	-0.0017	0.243	0.3624	0.5180	0.8800	1.4940
Mo	0.0004	0.046	0.0091	0.0840	0.0800	0.0522
Ni	-0.0018	0.44	0.6264	0.7000	0.1320	2.2500
Zn	0.0067	0.32	0.3600	0.2380	1.4880	1.5480

**Таблица 5. Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации образца №4**

Ион	Контроль	Концентрации ионов (мг/л) в воде после инкубации через				
		2 дня	7 дней	14 дней	21 день	30 дней
Co	-0.00118	0.077	0.1200	0.1680	0.2288	0.2412
Cr	-0.00127	НПО	НПО	0.0014	0.0016	0.0036
Cu	-0.0027	0.05	0.1920	0.1540	0.0125	0.1080
Fe	0.0018	0.013	0.0120	0.0392	0.0640	0.0756
Mg	0.005	0.066	0.1320	0.2240	0.2560	0.2880
Mn	-0.0017	0.13	0.2652	0.4312	0.4832	0.4860
Mo	0.0004	0.00049	0.0012	0.0014	0.0016	НПО
Ni	-0.0018	0.13	0.3120	0.4452	0.5920	0.5040
Zn	0.0067	0.37	0.7800	0.9884	1.3760	1.2960

№3, №4. Однако динамика увеличения концентраций разных элементов из различных образцов различалась (рис. 1-5).

#### Определение метаболической активности нейтрофилов под влиянием компонентов стоматологических материалов (КСМ)

Номера РКМ, полученные после инкубации образцов СС, соответствовали номерам образцов СС.

У пациентов с НСМ отмечено увеличение метаболической активности нейтрофилов в индуцированном стафилококком НСТ-тесте (44 [31; 53]) по сравнению со спонтанным (16 [12; 19]) в ЗФР.

Все образцы РКМ в различной степени влияли на метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ, а жидкость образцов № 3 и № 4 через 21 настаивания влияла на метаболическую активность нейтрофилов сопоставимо

с культурой убитого стафилококка ( $p \leq 0,05$ ) (таблица 6, рисунок 6).

Обращает на себя внимание факт резкого снижения влияния РКМ образцов на метаболическую активность нейтрофилов при добавлении 100 мкл ЧСА в концентрации 2 г/л к 100 мкл настоев исследуемых образцов (таблица 7, рисунок 6). Этот факт можно объяснить связыванием ионов металлов ЧСА: комплексообразованием тетрапиррольных соединений [13].

Установлено, что наиболее сильно влияла на нейтрофилы жидкость образца № 3, а наименее – РКМ № 1. Это, по-видимому, связано с более выраженным качественным и количественным высвобождением катионов из образца № 3.

Анализ полученных данных позволил выявить прямую сильную корреляцию между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с РКМ № 3 ( $R=0,75$ ;  $p \leq 0,05$ ) и № 4 ( $R=0,77$ ;  $p \leq 0,05$ ).

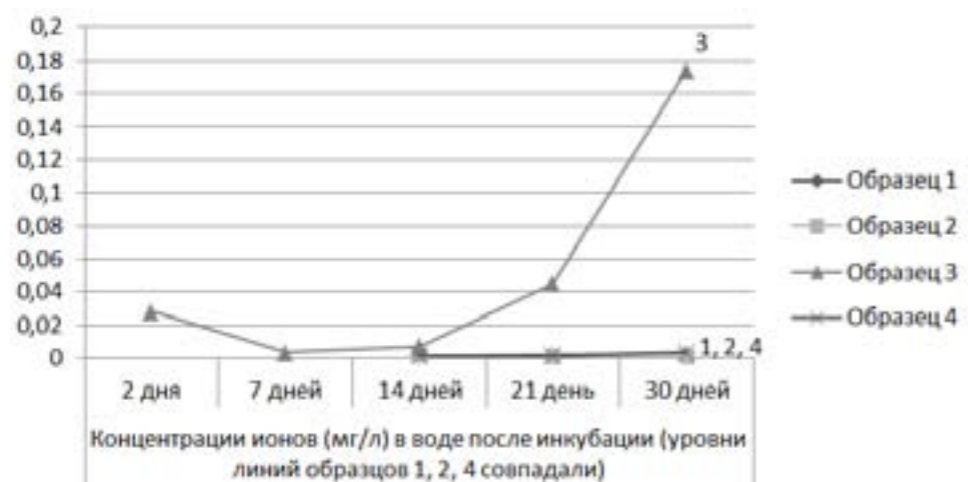


Рис. 1. Динамика выхода ионов хрома из исследуемых образцов

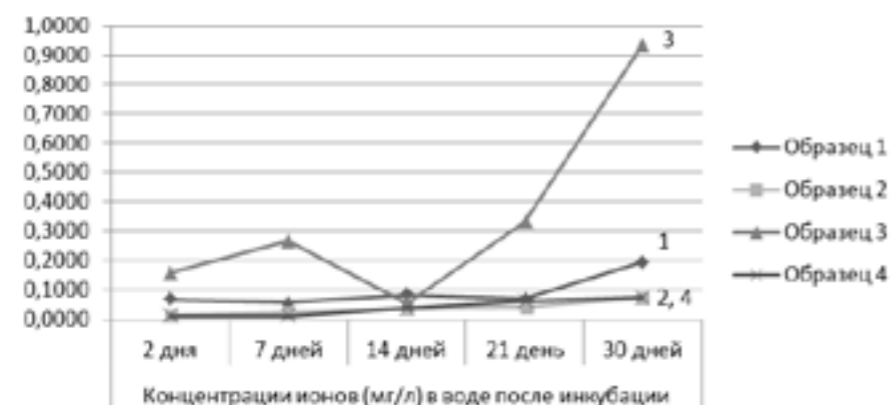


Рис. 2. Динамика выхода ионов железа из исследуемых образцов

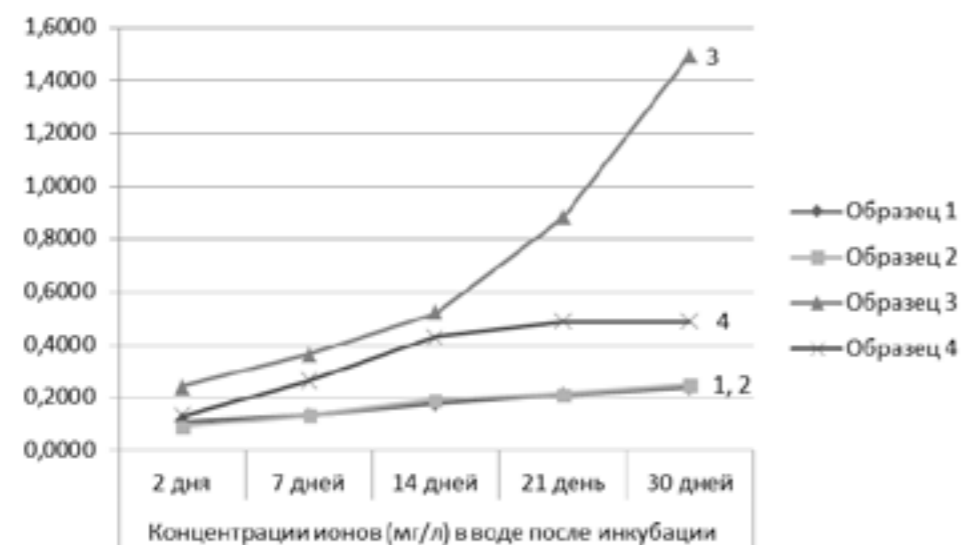


Рис. 3. Динамика выхода ионов марганца из исследуемых образцов

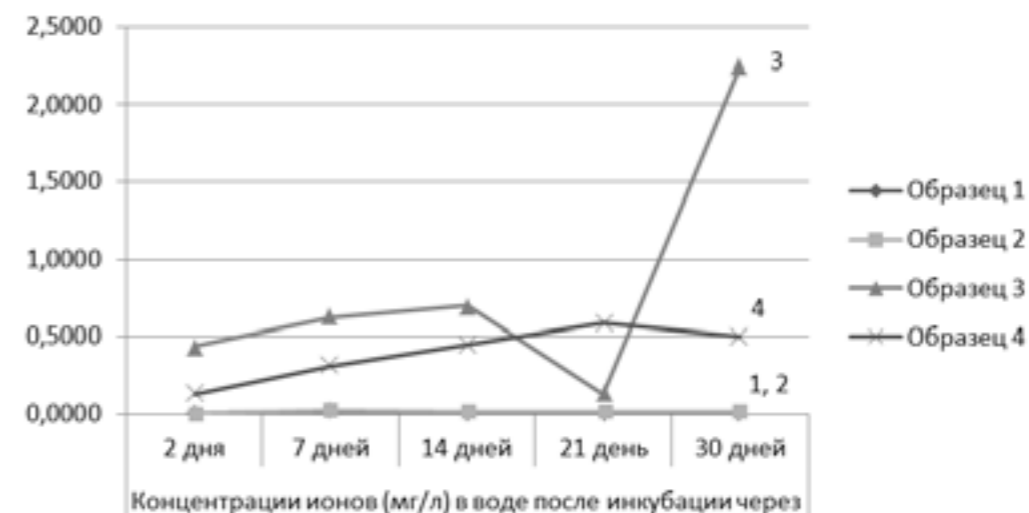


Рис. 4. Динамика выхода ионов никеля из исследуемых образцов

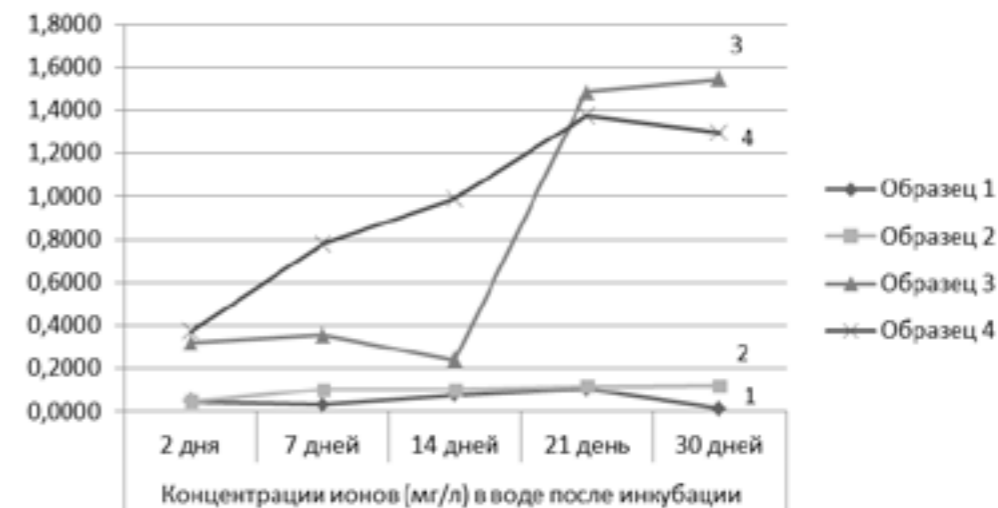


Рис. 5. Динамика выхода ионов цинка из исследуемых образцов

Таблица 6. Метаболическая активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ (n=22) в НСТ-тесте (% положительных клеток) под влиянием РКМ

Время инкубации образцов	РКМ № 1	РКМ № 2	РКМ № 3	РКМ № 4
2 дня	21,64 [12; 32]	18,57 [11; 29]	20,32 [13; 34]	29 [24; 36] +
7 дней	22 [19; 29]	26,71 [12; 37] *	25,3 [16; 34]	34,5 [19; 44] +
14 дней	19,3 [7; 32]	27,4 [15; 38] *+	31,7 [22; 42] *+	27,9 [21; 34] +
21 день	22,8 [12; 32]	30,8 [22; 39] *+	36 [29; 48] *+	32 [14; 40] *+
30 дней	27 [23; 30]	31,5 [22; 46] *	38 [31; 55] *+	35 [20; 44] *+
30 дней+ЧСА	11 [7; 19]	9 [6; 14]	14 [9; 18]	10,3 [5; 16]

Примечание. \* – отличие с  $p < 0,05$  по сравнению с влиянием на метаболическую активность нейтрофилов РКМ через 2 дня инкубации; + – отличие с  $p < 0,05$  при сравнении влияния каждой из РКМ от РКМ №1.

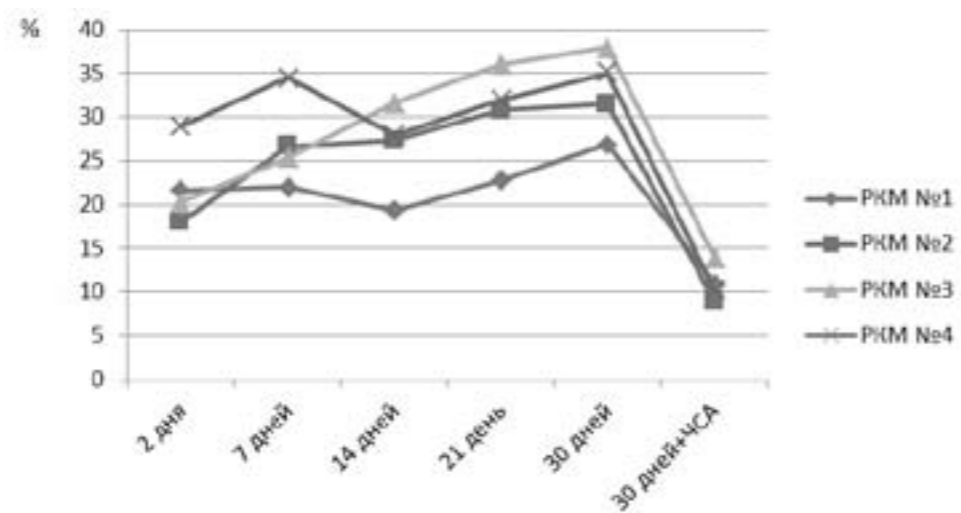


Рис. 6. Изменение метаболической активности нейтрофилов под влиянием РКМ (% положительных клеток)

Таблица 7. Метаболическая активность (в %) нейтрофилов пациентов группы с НСМ (n=22) и контрольной группы (n=19) в НСТ-тесте под влиянием РКМ

Время инкубации образцов 30 дней	РКМ № 1	РКМ № 2	РКМ № 3	РКМ № 4
Группа с НСМ	27 [23; 30]	31,5 [22; 46]*	38 [31; 55]*	35 [20; 44]*
Контрольная группа	22 [19; 29]	22,5 [12; 34]	27,4 [20; 32]	25,5 [14; 30]

Примечание. \* – отличие с  $p < 0,05$ 

Влияние испытуемых образцов на метаболическую активность нейтрофилов пациентов контрольной группы изучали с образцами после 30 дней инкубации.

У пациентов контрольной группы увеличение метаболической активности нейтрофилов в индуцированном стафилококком НСТ-тесте составило 39,7 [31; 49], в спонтанном с ЗФР – 12 [9; 17].

Как видно из таблицы 7, изучаемые РКМ также усиливали метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов контрольной группы у 12 пациентов из 19.

Однако в меньшей степени, чем у пациентов опытной группы ( $p \leq 0,05$ ). Влияние изучаемых образцов на нейтрофилы пациентов контрольной группы (более высокий % по сравнению с ЗФР), можно объяснить тем, что пациенты тоже имели ортопедические конструкции.

Выявлена сильная прямая корреляция между сроками пользования причинным типом ортопедических конструкций и результатами НСТ-теста с РКМ № 3 ( $R=0,84$ ;  $p \leq 0,05$ ) и №4 ( $R=0,89$ ;  $p \leq 0,05$ ). Эти данные указывают на тот факт, что при продолжительном пользовании протезов у

пациентов повышается чувствительность лейкоцитов к их катионам, что может служить ранним биомаркером их непереносимости в будущем.

В связи с тем, что материалы для изготовления ортопедических конструкций содержат несколько разных катионов металлов, мы решили испытать влияние РСМ на метаболическую активность нейтрофилов крови пациентов.

Растворы каждой из солей металлов (0,001%) в отдельности и 0,001% растворы солей металлов также в разной степени усиливали активность нейтрофилов в НСТ-тесте по сравнению с ЗФР, но в меньшей степени, чем культура убитого стафилококка. Из солей металлов наиболее сильно на метаболическую активность нейтрофилов влияла соль никеля, что, по нашему мнению, связано с наибольшей распространенностью и аллергенностью никеля [18].

Следует отметить, что аналогичный эффект с РСМ (0,001%) наблюдался при испытании образцов № 3 и № 4 (таблица 8).

Значение НСТ-теста, индуцированного раствором ЧСА составило 7,9 [5; 14], т. е. было сопоставимо со спонтанным. Добавление ЧСА

Таблица 8. Метаболическая активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ (n=22) в НСТ-тесте под влиянием 0,001% растворов солей и РКМ без и с раствором ЧСА

Индукторы НСТ-теста	Растворы солей и ЖФП без ЧСА	Растворы солей и ЖФП с ЧСА
$\text{CrCl}_3$ (0,001%)	19,2 [16; 23]	12,1 [3; 15]
$\text{CoCl}_2$ (0,001%)	23,5 [14; 26] *	4,7 [2; 11]
$\text{MnSO}_4$ (0,001%)	16,1 [7; 24] *	5,3 [3; 8]
$\text{ZnCl}_2$ (0,001%)	21,4 [16; 28] *	4,3 [1; 4]
$\text{NiCl}_2$ (0,001%)	29,6 [23; 35] *	7,6 [5; 16]
$\text{CuCl}_2$ (0,001%)	12 [9; 14]	10,2 [5; 14]
$\text{MgSO}_4$ (0,001%)	18,7 [15; 30]	5,3 [4; 8]
$\text{TiO}_2$ (0,001%)	27,4 [20; 31] *	7,1 [4; 15]
Смесь РСМ (0,001%)	34 [27; 45] *	10 [5; 13]
РКМ № 1 (30 дней)	27 [23; 30] *	11 [7; 19]
РКМ № 2 (30 дней)	31,5 [22; 46] *	9 [6; 14]
РКМ № 3 (30 дней)	38 [31; 55] *	14 [9; 18]
РКМ № 4 (30 дней)	35 [20; 44] *	10,3 [5; 16]

Примечание. \*  $p \leq 0,05$  по сравнению с ЧСА.

ко всем растворам солей металлов и настоям образцов также статистически достоверно снижало их влияние на метаболическую активность нейтрофилов (таблица 8).

При анализе результатов НСТ-теста с 0,001% смесь РСМ и 0,001% раствора  $\text{NiCl}_2$  и  $\text{TiO}_2$  достаточно сильно стимулировали метаболическую активность нейтрофилов, и их эффекты были сопоставимы с действием РКМ № 2–4.

Влияние на метаболическую активность нейтрофилов 0,001% растворов остальных солей металлов и образца № 1, не имело отличий ( $p > 0,05$ ). При сравнении эффектов отдельных растворов солей металлов оказалось, что эффекты растворов в концентрации 0,001% существенно не отличались, кроме  $\text{NiCl}_2$  и  $\text{TiO}_2$ .

#### Результаты определения киллинговой активности лейкоцитов

РКМ и РСМ оказывали эффекты стимуляции или угнетения киллинга кандид лейкоцитами пациентов опытной и контрольной групп, но по-разному в зависимости от выбранного индуктора.

РКМ № 1 чаще ( $p \leq 0,05$ ) стимулировала киллинг кандид у 14 (63,3%) пациентов с НСМ, а образца № 2 – у 8 (36,3%). Угнетение киллинга РКМ №1 наблюдалось у 4 (18,8%) пациентов, а образца № 2 – у 8 (36,3%) пациентов, т. е. последний чаще оказывал ингибирующий эффект и реже – стимулирующий ( $p \leq 0,05$ ). По-видимому, этот эффект связан с наличием  $\text{TiN}$  напыления на РКМ № 2.

У остальных пациентов стимулирующая и угнетающая активность отсутствовала. Из вышесказанного следует, что наиболее частым эффектом на лейкоциты РКМ № 1 была стимуляция, а РКМ № 2 образца – ингибция киллинга кандид ( $p \leq 0,05$ ), что было обусловлено их влиянием на метаболизм лейкоцитов (таблица 9).

Настой образца № 3 у 3 (13,6%) стимулировал, у 12 (54,6%) – угнетал, а у 7 (31,8%) – не влиял на киллинг кандид, т. е. преобладающим эффектом было подавление киллинга ( $p \leq 0,05$ ).

Настой образца № 4 у 5 (22,7%) пациентов стимулировал, у 10 (45,5%) – угнетал, а у 7 (31,8%) – не влиял на киллинг кандид, т. е. эффекты РКМ № 3 и № 4 по частоте совпадали, следовательно, наиболее частым их эффектом на лейкоциты была ингибция киллинга кандид ( $p \leq 0,05$ ).

Обращает на себя внимание высокая частота встречаемости ингибции киллинга кандид РКМ № 3 и № 4, что можно объяснить только особыми метаболическими или иммунологическими эффектами за счет наличия припоя.

Эффекты угнетения киллинга РКМ № 3 и № 4 совпали у 8 пациентов, а эффекты стимуляции – у 7 пациентов, что указывает на их иммунологическую или метаболическую общность эффектов.

Стимуляция киллинга кандид 0,01% РСМ наблюдалась у 5 (22,7%) пациентов, а его 0,001% раствором – у 3 (13,6%), причем у 3 пациентов эффекты стимуляции киллинга 0,01% и 0,001% РСМ совпадали. То есть снижение концентрации РСМ в 10 раз не оказало влияния на стимуляцию

киллинга. Ингибция киллинга кандид 0,01% РСМ наблюдалась в 10 (45,5%) случаях, а 0,001% раствором – в 11 (50%).

Следовательно, как и при испытании РКМ № 3 и № 4 и РСМ в обеих концентрациях угнетал киллинг кандидат (таблица 10).

Эти результаты указывают на модификацию чувствительности к стимулирующему или ингибирующему эффекту РКМ и РСМ у пациентов с НСМ, которая наблюдалась у большинства из них. Модификация одной из основных функций фагоцитоза – киллинга под влиянием КСМ, может индуцировать как аллергию, так и иммунодефицит [16].

Таким образом, КСМ могут модифицировать фагоцитоз нейтрофилов у пациентов. Чувствительность к стимуляции или ингибции КСМ киллинга кандид лейкоцитами зависит от качественного и количественного состава СС и содержимого их инкубационной жидкости.

По-нашему мнению и мнению других авторов [15], КСМ, стимулируя нейтрофилы, вовлекают их в процесс биологического распада установленной в полость рта ортопедической конструкции, отсутствие влияния на их функцию КСМ может быть связано с формированием оральной толерантности к дентальным сплавам, а угнетение – вести к формированию иммунодефицита и хронического воспаления тканей СОПР [17, 18].

#### Модуляция выделения цитокинов лейкоцитами под воздействием компонентов стоматологических материалов

РКМ для исследования выбирали согласно типу причинной конструкции у пациентов (таблица 2).

#### Секреция цитокинов под влиянием РКМ и РСМ

Через 24 часа инкубации крови пациентов опытной группы уровень секреции ИЛ-1 $\beta$  в исследуемых пробах с РКМ и ФГА был понижен, относительно пробы с ЗФР, а в пробах с РСМ – нет (таблица 10).

Анализ результатов инкубации проб крови пациентов контрольной группы с исследуемыми растворами, установил наличие ингибирования секреции ИЛ-1 $\beta$  по сравнению с ЗФР, только в пробах с ФГА, что указывает на специфичность ингибирования секреции ИЛ-1 $\beta$  в пробах с РКМ у пациентов опытной группы.

Как показано в таблице 11, спонтанный – в ЗФР – уровень секреции ИЛ-2 был выше в опытной группе. У пациентов опытной группы РКМ стимулировала секрецию клетками крови ИЛ-2 наравне с ФГА, РСМ вызывал более сильную секрецию ИЛ-2 только по сравнению с ЗФР, которая была сопоставима с уровнем секреции у пациентов контрольной группы. У пациентов

контрольной группы РКМ и РСМ индуцировали выброс ИЛ-2 сильнее, чем ЗФР. Однако РКМ в несколько раз сильнее вызывала выброс ИЛ-2 у пациентов опытной группы ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе наблюдалось сопоставимое усиление выделения ИЛ-2 под влиянием ЖФП и РСМ.

Результаты секреции ИЛ-4 после 24-часовой стимуляции цельной крови исследуемыми индукторами представлены в таблице 4. Видно, что РКМ, РСМ стимулировали секрецию ИЛ-4 наравне с ФГА у пациентов опытной группы по сравнению с пробой с ЗФР. У пациентов контрольной группы секрецию ИЛ-4 вызывал только ФГА (таблица 12) и ЖФП.

Секреция ИЛ-6 в ЗФР в опытной группе была выше, чем в контрольной (табл. 13) После 24 часов инкубации цельной крови пациентов опытной группы наблюдалось угнетение секреции ИЛ-6 в пробах с РКМ, а у пациентов контрольной

группы с РСМ, причем более высокое содержание ИЛ-6 было установлено в пробах с ЗФР и ФГА, т. е. происходило ингибирование выделения ИЛ-6 по сравнению с ЗФР и ФГА (таблица 13).

Обращает на себя внимание, что РКМ и РСМ вызывали более сильную индукцию ИЛ-10 у пациентов контрольной группы, однако меньшую, чем ФГА, а у пациентов опытной группы – нет (таблица 14). ИЛ-10 является цитокином, который стимулирует дифференцировку Т-клеток и приводит к тому, что ДК индуцируют анергические Т-клетки, наделенные иммуносупрессивными свойствами [79]. Доставка через слизистую носа АГ генерирует клетки Tr1, способные предотвращать гиперреактивность дыхательных путей с помощью механизма, зависящего от ИЛ-10 [69]. ИЛ-10 также способствует индуцированию CD4+ CD25+ лимфоцитов, так как их число резко возрастает после системной

**Таблица 9. Влияние РКМ и РСМ на киллинг кандидат лейкоцитами пациентов с НСМ (n=22)**

Время инкубации образцов	РКМ № 1	РКМ № 2	РКМ №3	РКМ № 4	РСМ 0,01%	РСМ 0,001%
Стимуляция	14 (63,3%)*	8 (36,3%)	3 (13,6%)	4 (22%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)
Угнетение	4 (18,8%)	8 (36,3%)*	12 (54,6%)*	9 (50%)*	10 (45,5%)*	11 (50%)*
Без эффекта	4 (18,8%)	6 (27,3%)	7 (31,8%)	5 (27,7%)	7 (31,8%)	8 (36,3%)

Примечание. \*  $p \leq 0,05$  между образцами.

**Таблица 10. Уровни ИЛ-1 $\beta$  (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации in vitro с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	521 [376; 608] *	443 [329; 647]
РСМ	604 [439; 874]	419 [305; 554]
ФГА	543 [359; 617] *	362 [303; 437] *
ЗФР	685 [471; 794]	470 [356; 611]

Примечание – \* –  $p_{\text{Wilcoxon}} \leq 0,05$  относительно ЗФР

**Таблица 11. Уровни ИЛ-2 (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации in vitro с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	19,7 [10,3; 39] ^^	8,5 [6,3; 19,04] ^^
РСМ	7,95 [2,11; 27,74] *	8,9 [5,4; 16,7] *
ФГА	21,85 [6,79; 41,35] *	16,3 [5; 28]
ЗФР	4,27 [1,3; 6,41] +	1,65 [0,07; 2,38] +

Примечание – \* –  $p_{\text{Wilcoxon}} \leq 0,05$  относительно ЗФР; ^ –  $p < 0,05$  опытной группы к контрольной; + –  $p < 0,05$  опытной группы по сравнению с контрольной.

**Таблица 12. Уровни ИЛ-4 (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации in vitro с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	1,35 [0,16; 1,97] *	0,5 [0,0; 1,35]
РСМ	1,17 [2,11; 1,52] *	0,44 [0,0; 2,75]
ФГА	1,74 [1,11; 2,76] *	1,52 [0,69; 1,59]
ЗФР	0,13 [0,00; 1,23]	0,00 [0,00; 1,35]

Примечание – \* –  $p_{\text{Wilcoxon}} \leq 0,05$  относительно ЗФР; ^ –  $p < 0,05$  опытной группы к контрольной

**Таблица 13. Уровни ИЛ-6 (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации in vitro с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	783 [602; 901]*	423[235; 516]
РСМ	925[801; 1189]	327[169; 435] *
ФГА	1572[986; 1929]	503[351; 604]
ЗФР	1072[932; 1258] +	425[251; 587] +

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ЗФР; + –  $p < 0,05$  опытной группы по сравнению с контрольной.

сверхэкспрессии ИЛ-10 [80]. Стимуляция секреции иммуносупрессивного ИЛ-10 под влиянием РКМ и РСМ у пациентов контрольной группы по-нашему мнению поддерживает гипореактивность СИ на КСМ, а отсутствие прироста иммуносупрессивного ИЛ-10 у пациентов с НСМ и гиперчувствительностью к КСМ, доказанной *in vivo* и *in vitro*, указывает на нарушение у них ОТ. Это может быть, опосредовано кишечным иммуносупрессивным ИЛ-10 [24].

В пробах цельной крови пациентов опытной и контрольной групп наиболее сильно выброс ИФН- $\gamma$  стимулировал ФГА (таблица 15).

У пациентов опытной РКМ стимулировала секрецию ИФН- $\gamma$  в большей степени, чем РСМ, и достоверно сильнее с обеими индукторами, чем с ЗФР. У пациентов контрольной группы РКМ и РСМ не вызывали секрецию ИФН- $\gamma$ .

У пациентов опытной и контрольной групп происходило усиление секреции ФНО $\alpha$ , особен-

но с ФГА по сравнению с ЗФР (таблица 16). У пациентов опытной группы РКМ и РСМ стимулировали секрецию ФНО $\alpha$  больше, чем ЗФР. Однако этой стимуляции не было в контрольной группе.

Несмотря на очевидные ограничения использования модели *in vitro* для изучения влияния РКМ и РСМ на клетки СИ, наше исследование показало их влияние на индукцию (РКМ – ИЛ-2,4,10, ИФН- $\gamma$ , ФНО $\alpha$ ; РСМ – ИЛ-2,10) или угнетение (РКМ – ИЛ-1 $\beta$ ,6) секреции цитокинов. При использовании в качестве индуктора РКМ увеличивалась частота и величина секреции цитокинов.

Проведенное исследование продемонстрировало определенную схожесть индукции выброса цитокинов РКМ и РСМ, что позволяет научно обосновать использование РСМ для диагностики гиперчувствительности к дентальным сплавам, так как получение и стандартизация РКМ длительный и трудоемкий процесс. Это подтверж-

дается данными различных авторов, изучавших *in vitro* влияние различных концентраций солей металлов на индукцию цитокинов, используя различные клетки [8–11]. Полученные нами результаты показали, что под воздействием РКМ и РСМ происходит значительное увеличение секреции лейкоцитами крови пациентов ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-4, ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$  цитокинов ( $p < 0,05$ ), сопоставимое с эффектом митогена ФГА, что указывает на их активную роль в индукции воспаления. За этим обычно следует чрезмерное вторжение иммунных клеток, способствующее развитию реакций гиперчувствительности. В контрольной группе у лиц без НСМ при длительном пользовании протезами наблюдалась стимуляция синтеза только ИЛ-2 и ИЛ-10, но не провоспалительных цитокинов.

**Влияние компонентов стоматологических материалов на выделение лейкоцитами белка теплового шока-70 и оксида азота**

Уровень БТШ-70 в сыворотке крови у пациентов с НСМ и гиперчувствительностью к КСМ составил 2,41 [0,79; 2,9] нг/мл, и был ниже по сравнению с контрольной группой – 4,1 [2,23; 5,11] ( $p < 0,05$ ). При сравнении концентрации БТШ-70 в сыворотке крови пациентов после индукции ФГА оказалось, что ФГА стимулировал выделение БТШ-70 в обеих группах. Особенного внимания заслуживает тот факт, что у пациентов опытной группы РКМ угнетал секрецию БТШ-70 (0,8 [0,3; 1,1] нг/мл), а у пациентов контрольной группы – стимулировал (5,7 [4,1; 8,5] нг/мл) (таблица 17).

Синтез БТШ-70 в ответ на воздействие различными АГ, является универсальным защитным механизмом клеток, предотвращающим их повреждение [7]. Повышение экспрессии БТШ-70 обеспечивает стабилизацию и восстановление структуры поврежденных белковых молекул и поддерживает оптимальный баланс между синтезом и деградацией белков. Это приводит к повышению резистентности клеток у пациентов без НСМ и формированию оральной толерантности. Угнетение продукции БТШ-70 у пациентов с НСМ, по-нашему мнению, является причиной нарушения оральной толерантности, что ведет к формированию иммунопатологических реакций [17, 18].

NO-продуцирующая активность лейкоцитов пациентов обеих групп *in vitro* не различалась. Нами обнаружена способность лейкоцитов здоровых лиц и пациентов с НСМ к продукции NO при инкубировании с ФГА, однако, при культивировании с РКМ происходило угнетение выброса NO лейкоцитами крови (таблица 18).

#### Выводы

1. После инкубации фрагментов стоматологических сплавов в воде наблюдается выделение ионов металлов, зависимое от времени инкубации. Этот РКМ изменяет метаболическую и киллинговую активность нейтрофилов крови пациентов с НСМ, что может быть маркером непереносимости протезных материалов.

РКМ и РСМ стимулировали метаболическую активность нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего у пациентов

**Таблица 14. Уровни ИЛ-10 (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации *in vitro* с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	24 [2,3; 38] **	72 [42; 93] **
РСМ	27 [7; 33] *	57 [38; 74] *
ФГА	117 [59; 322] *	92 [73; 149] *
ЗФР	22 [4,3; 39] +	15 [0,00; 26] +

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ЗФР; \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; + –  $p < 0,05$  опытной группы по сравнению с контрольной.

**Таблица 15. Уровни ИФН- $\gamma$  (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации *in vitro* с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	81 [53; 142] *	21 [4; 35]
РСМ	63 [38; 96] *	25 [1; 45]
ФГА	249 [156; 472] *	160 [92; 193] *
ЗФР	48 [26; 65] +	22 [5; 39] +

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ЗФР; + –  $p < 0,05$  опытной группы по сравнению с контрольной.

**Таблица 16. Уровни ФНО $\alpha$  (пг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации *in vitro* с различными индукторами**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=13)	Контрольная (n=10)
РКМ	24 [4,99; 31] *	4,9 [2; 6,2]
РСМ	14 [5,1; 19] *	5,3 [1,7; 7,7]
ФГА	352 [144; 453] *	312 [270; 399] *
ЗФР	5,43 [2,79; 25]	4,1 [2,23; 5,11]

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ЗФР.

**Таблица 17. Уровни БТШ-70 (нг/мл, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации *in vitro* с РКМ**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=20)	Контрольная (n=20)
РКМ	0,8 [0,3; 1,1] **	5,7 [4,1; 8,5] *
ФГА	3,5 [2,34; 4,8] **	5,9 [3,8; 7,93] *
ЗФР	2,41 [0,79; 2,9] ×	4,1 [2,23; 5,11]

Примечание – \* –  $p < 0,05$  по сравнению с ЗФР; × –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой.

**Таблица 18. Уровни оксида азота (мкмоль/л, Ме [25%; 75%]) в крови пациентов после инкубации *in vitro* с РКМ**

Индукторы	Группы	
	Опытная (n=20)	Контрольная (n=20)
РКМ	18 [12,3; 23] *	16,9 [11; 19,2]
ФГА	42,6 [34; 51] *	44,5 [29; 48] *
ЗФР	29,14 [20; 35]	27,3 [23; 34]

с НСМ и пациентов контрольной группы по сравнению со спонтанным НСТ-тестом ( $p \leq 0,05$ ).

У пациентов с НСМ РКМ и РСМ увеличивали активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте ( $p \leq 0,05$ ) наравне со взвесью убитого стафилококка, а у пациентов контрольной группы активность нейтрофилов в НСТ-тесте с исследуемыми растворами увеличивалась, но в меньшей степени, чем под влиянием взвеси стафилококка ( $p \leq 0,05$ ).

Обнаружено, что присутствие ЧСА уменьшает влияние РКМ и РСМ на метаболическую активность нейтрофилов ( $p \leq 0,05$ ).

Установлена сильная корреляция между временем пользования ортопедическими конструкциями и усилением метаболической активности нейтрофилов в НСТ-тесте с растворами солей и катионов металлов у пациентов опытной и контрольной групп, в которой она может служить прогностическим маркером бионесовместимости.

РКМ и РСМ у пациентов с НСМ могли стимулировать или ингибировать киллинг кандид лейкоцитами пациентов, что указывает на модуляцию иммунного ответа.

2. РКМ и РСМ усиливали секрецию ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО $\alpha$ , ИНФ $\gamma$  лейкоцитами цельной крови пациентов с НСМ, что указывает на индукцию в опытной группе гиперчувствительности к компонентам стоматологических сплавов, а в контрольной группе стимулировался только

ИЛ-2, ИЛ-10, что указывает на иммуномодулирующий эффект.

Установлена определенная схожесть индукции выброса цитокинов под влиянием РКМ и РСМ, что позволяет научно обосновать использование РСМ для диагностики гиперчувствительности к дентальным сплавам, так как получение и стандартизация РКМ длительный и трудоемкий процесс.

Секреция цитокинов лейкоцитами крови пациентов под влиянием компонентов дентальных сплавов может служить маркером их биосовместимости и критерием реакций гиперчувствительности.

3. Уровень БТШ-70 в сыворотке крови у пациентов с НСМ составил 2,41 [0,79; 2,9] нг/мл, и был ниже по сравнению с контрольной группой – 4,1 [2,23; 5,11] ( $p < 0,05$ ). При сравнении концентрации БТШ-70 сыворотки крови пациентов после индукции ФГА оказалось, что ФГА стимулировал выделение БТШ-70 в обеих группах. У пациентов опытной группы РКМ угнетал секрецию БТШ-70 (0,8 [0,3; 1,1] нг/мл), а у пациентов контрольной группы – стимулировал (5,7 [4,1; 8,5] нг/мл).

НО-продуцирующая активность лейкоцитов пациентов обеих групп *in vitro* не различалась. Лейкоциты здоровых лиц и пациентов с НСМ продуцировали NO при инкубировании с ФГА, однако, при культивировании с РКМ происходило угнетение выброса NO лейкоцитами крови.

## Литература

1. Thomas P, Braathen LR, Dörig M, et al. Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation. *Allergy* 2009; 64: 1157–1165.
2. Frigerio E, Pigatto PD, Guzzi G, et al. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants: a prospective study. *Contact Dermatitis* 2011; 64:273–279.
3. Granchi D, Ciapetti G, Savarino L, et al. Expression of the CD69 activation antigen on lymphocytes of patients with hip prosthesis. *Biomaterials* 2000; 21: 2059–2065.
4. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, et al. 2014. NKG2D( $\beta$ ) IFN- $\gamma$ ( $\beta$ ) CD8( $\beta$ ) T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS ONE* 9:1–12.
5. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Активация CD4+ T- и ЕК-лимфоцитов компонентами стоматологических материалов при их бионепереносимости. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2017; №2: 75–84.
6. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Определение активации базофилов и IgE-антител к компонентам стоматологических материалов при их непереносимости. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2017; №1: 65–73.
7. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, et al. 2014. NKG2D( $\beta$ ) IFN- $\gamma$ ( $\beta$ ) CD8( $\beta$ ) T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS ONE* 9:1–12.
8. Asif K, Kothiwale SV. Phagocytic activity of peripheral blood and crevicular phagocytes in health and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2010; 14(1): 8–11.
9. Ryder MI. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology* 2000 2010; 53: 124–137.
10. Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials* 2002; 23: 3757–3764.
11. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса, Москва, 1996, 315 с.
12. Титова Н.Д. Влияние пищевых красителей на фунгицидную активность лейкоцитов у пациентов с иммунопатологией. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук* 2011; №2: 82–87.
13. Banerjee A, Lahiri S. Albumin metal interaction: a multielemental radiotracer study. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2009; Vol. 279, №3: 733–741.
14. Bonefeld CM, Nielsen MM, Vennegaard MT, et al. 2015. Nickel acts as an adjuvant during cobalt sensitization. *Exp Dermatol* 24: 229–231.
15. Liao S., Tamura K., Zhu Y. et al. Human neutrophils reaction to the biodegraded nano-hydroxyapatite/collagen and nano-

hydroxyapatite/ collagen/poly(L-lactic acid) composites. *August 2005; accepted 11 August 2005 Published online 12 December 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).*

16. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. Мд.лит. М., 2009, 448 с.

17. Карпук И.Ю. Иммунологические фенотипы непереносимости стоматологических материалов. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2016; №4: 40–49.

18. Карпук И.Ю. Клиническое значение замедленной и немедленной аллергии на металлические включения в полости рта. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2014; №2: 34–42.

## Сведения об авторах:

Карпук Иван Юрьевич – докторант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет», к.м.н., доцент.

Фадеев Василий Иванович – зав. лабораторией стандартизации и контроля качества лекарственных средств УО «ВГМУ», к.ф.н.

Контакты: 210029, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. Правды, д. 66, кв. 112., тел. раб.: +375 212 22-53-80, тел. моб.: +375 29 711-97-36, e-mail: ikarpuk@mail.ru, Карпук Иван Юрьевич.

Поступила 21.07.2017 г.