

Активация CD4⁺ и Т-ЕК-лимфоцитов компонентами стоматологических материалов при их бионепереносимости

И.Ю. Карпук, Д.К. Новиков

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Activation of CD4⁺ T- and NK-lymphocytes by components of dental materials in cases of their bio-intolerance

I.Y. Karpuk, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University

Аннотация

Цель работы: влияние *in vitro* компонентов стоматологических материалов на экспрессию активационных молекул Т-лимфоцитов и естественных киллеров (ЕК) крови пациентов с непереносимостью стоматологических материалов (НСМ).

Методы обследования: 22 пациента с положительными кожными аппликационными пробами (АП) на растворы солей металлов (NiCl₂ (3%), CrCl₃ (3%), CoCl₂ (1%)) и жалобами на непереносимость стоматологических материалов (НСМ), и 21 пациент без НСМ. Определяли уровень CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов крови после инкубации с инкубационной жидкостью фрагментов протезов (ЖФП) и раствором солей металлов (PCM): Ni-ЧСА, Cr-ЧСА, Co-ЧСА.

Результаты. Выявлена активация CD4⁺ Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию ЖФП и PCM. В результате проведенного исследования установлен ряд закономерностей в экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов и ЕК-лимфоцитов. Полученные результаты подтверждают потенциальную роль CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов в развитии гиперчувствительности на КСМ. После 24-часовой инкубации крови пациентов с наличием объективных критериев НСМ и положительными результатами АП к солям металлов с ЖФП и РСМ увеличивается содержание CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов, CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов, а у пациентов контрольной группы – нет. Т-лимфоциты периферической крови пациентов этой группы также отвечали повышенной экспрессией CD25 молекул в ответ на стимуляцию ЧСА.

Вывод: метод диагностики гиперчувствительности к КСМ, по приросту уровня CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов и CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов, с использованием в качестве стимуляторов ЖФП и РСМ, может служить достоверным тестом для диагностики непереносимости стоматологических материалов.

Summary

Aim of the study: the effect of the components of dental materials *in vitro* on the expression of activation molecules of T-lymphocytes and natural killers (NK) of blood in patients with intolerance to dental materials (IDM).

Methods of examination: 22 patients with positive skin application tests (AT) with solutions of metal salts (NiCl₂ (3%), CrCl₃ (3%), CoCl₂ (1%)) and complaints of intolerance to dental materials (IDM), and 21 patient without IDM. CD4⁺CD25⁺CD45⁺ T-lymphocyte and CD16⁺CD56⁺CD69⁺CDE⁺ NK-lymphocytes were determined after incubation with prosthetic fragments fluid (PFF) and metal salts solution (MSS): Ni-HSA, Cr-HSA, Co-HSA.

Results: activation of CD4⁺ T-lymphocytes in response to stimulation by PFF and MSS was detected. As an outcome of the study, a number of regularities in the expression of markers for T-lymphocytes and NK-lymphocytes activation were established. The results confirm the potential role of CD4⁺CD25⁺CD45⁺ T-lymphocytes and CD16⁺CD56⁺CD69⁺ NK-lymphocytes in the development of hypersensitivity to CDM. After a 24-hour blood incubation of patients with objective signs of IDM and positive AT results to metal salts with PFF and MSS, the number of CD4⁺CD25⁺CD45⁺ T-lymphocytes, CD16⁺CD56⁺CD69⁺ NK-lymphocytes increased, whereas in patients of the control group it did not. The peripheral blood T-lymphocytes of patients from this group also responded to HSA stimulation by the increased expression of CD25 molecules.

Conclusion: the method of CDM hypersensitivity diagnosis by measuring increasing CD4⁺CD25⁺CD45⁺ T-lymphocytes and CD16⁺CD56⁺CD69⁺ NK-lymphocytes using PFF and MSS as stimulants can serve as a reliable test for the diagnosis of intolerance to dental materials.

Ключевые слова

Компоненты стоматологических материалов, CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоциты и CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоциты, гиперчувствительность, проточная цитометрия.

Введение

Слизистая оболочка полости рта (СОПР) постоянно подвергается воздействию антигенов ротовой полости, которые могут вызывать ответные реакции различного типа. При воздействии низкомолекулярных веществ (гаптенов) может возникать гиперчувствительность или развитие энергичных ответов Т-клеток может быть причиной аллергических реакций [1].

Иммунные реакции на простые или комплексные чужеродные антигены и соответствующий тип иммунного ответа обусловлены специфичностью и связывающей активностью Т- и В-клеточного рецепторов. В результате взаимодействия с антигенами в лимфоидных органах образуются субпопуляции эффекторных Т- и В-лимфоцитов, которые длительно сохраняются в организме человека и осуществляют реагирование на аллергены при их повторном поступлении. Т-лимфоциты распознают чужеродные белки, в комплексе с HLA-молекулами.

Лимфоциты несут на своей поверхности рецепторы, распознающие антигены и формируют специфический Т-клеточный и В-клеточный иммунитет. IgE-опосредованные реакции гиперчувствительности обусловлены поведением CD4⁺ Т-хелперных клеток 2 типа, которые продуцируют интерлейкины – ИЛ-4 ИЛ-5 и ИЛ-13. Т-хелперы 1 типа продуцируют ИЛ-2 и INF-γ и отвечают в основном за Т-клеточную сенсibilизацию и развитие клеточных реакций. Несмотря на то, что последствия иммунного ответа и воспаления у пациентов с участием Т-хелперов 2 типа хорошо изучены, реакции врожденного иммунитета, которые способствуют их развитию, включая природу антигенпредставляющих клеток, участвующих в иницировании и поддержании иммунного ответа, остаются менее ясными [3].

Обосновано наличие регуляторных функций у двух субпопуляции CD4⁺ Т-клеток: естественные (натуральные) регуляторные Т-клетки (nTreg) и индуцированные регуляторные Т-клетки (iTreg), экспрессирующих α-цепь рецептора интерлейкина-2 (CD25). Эти Т-клетки рассматриваются как решающие иммунорегуляторные клетки, спо-

Keywords

Components of dental materials, CD4⁺CD25⁺CD45⁺ T-lymphocytes and CD16⁺CD56⁺CD69⁺ NK lymphocytes, hypersensitivity, flow cytometry.

собные к супрессии Th1 и Th2-опосредованных иммунных ответов [4,5]. У человека функции nTreg-клеток выполняют не все CD4⁺CD25⁺-лимфоциты, а только их фракция с высоким уровнем экспрессии CD25 (CD4⁺CD25^{hi}-клетки) [6,7]. Численность и функциональная активность nTreg-клеток контролируется генетически [8]. В ходе иммунного ответа появляются и CD4⁺ Т-клеток, слабо экспрессирующие CD25 (CD4⁺CD25^{lo}), от них nTreg-клетки отличаются не только функцией (супрессорная, а не хелперная), но и мембранным фенотипом [4]. Данные о способности регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток подавлять аллергические процессы получены в контролируемых условиях экспериментов *in vivo* и *in vitro* [8]. Таким образом, отмечена способность nTreg-клеток подавлять активность Т-хелперных клеток 1 и 2 типов, однако, очевидно, сильнее проявляется их действие на те субпопуляции Т-хелперов, функция которых повышена, таким образом регулирующее действие CD4⁺CD25^{hi}-клеток влияет на баланс Th1/Th2-клеток [9, 10]. Показана стимуляция компонентами стоматологических материалов (КСМ) CD25-регуляторных Т-лимфоцитов [11].

Среди клеток врожденного иммунитета известны [1] субпопуляции (ЕК-лимфоциты) способные распознавать небелковые антигены, что актуально для оценки реакций на стоматологические материалы.

Кроме этого, среди лимфоцитов выделяют особую популяцию ЕК-клеток с высоким уровнем экспрессии молекул CD56 и CD69. ЕК являются клетками врожденного иммунитета и активируются различными патогенами, выделяя цитокины. Активированные естественные киллеры – ЕК-клетки (CD16⁺CD56⁺CD69⁺) способны лизировать клетки мишени, инфицированные вирусами и другими внутриклеточными агентами, мутировавшие опухолевые клетки, а также любые другие клетки аллогенного или ксеногенного происхождения. Литическая активность ЕК-клеток проявляется при первичном контакте без предварительной сенсibilизации, в отличие от обычных СВ8-Т-клеток. В периферической крови ЕК-клетки составляют от 10 до 15% цир-

кулирующих лимфоцитов. Активированные ЕК могут нести на своей поверхности CD25, HLA-DR, CD69 и специальные рецепторы [13].

Механизмы и закономерности активации CD4+ Т-лимфоцитов и особенно ЕК в ответ на воздействие ионов металлов в настоящее время изучены недостаточно. Поэтому изучение субпопуляций лимфоцитов экспрессирующих маркеры CD4, CD25, CD16, CD56, CD69 является весьма актуальным и может иметь клиническое значение в понимании механизмов развития неспецифической гиперчувствительности и аллергии на КСМ у пациентов с биологической непереносимостью стоматологических материалов (НМС).

Цель исследования – влияние *in vitro* компонентов стоматологических материалов на экспрессию активационных молекул лимфоцитов крови пациентов с НМС.

Материал и методы исследования

Обследовано 22 пациента в возрасте от 42 до 74 лет, из них 4 мужчин и 18 женщин, с жалобами на НМС. Все пациенты указывали на наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним.

Контрольную группу составил 20 пациентов (3 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 45 до 68 лет без жалоб на НМС и без гиперчувствительности к ним, 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.

Уровень гигиены оценивали по упрощенному индексу гигиены полости рта ОНI-S, а выражен-

ность воспалительного процесса - при помощи индекса GI (оценивали зубы симметричной локализации противоположной стороны челюсти).

Аппликационное кожное тестирование с растворами солей металлов

Всем участникам исследования ставили аппликационные кожные пробы с использованием специальных аппликаторов – Finn Chamberon Scanpor (Epitest Ltd.Oy, Tulusa, Finland) и тестовых субстанций солей – ионов металлов Cu²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Ti²⁺, Zn²⁺ на вазелиновой основе (Epitest Ltd.Oy, Tulusa, Finland).

В качестве отрицательного контроля использовался чистый медицинский вазелин. Результаты учитывали через 24 и 48 часов.

Подготовка КСМ для теста активации Т-лимфоцитов

Жидкость фрагментов протезов (ЖФП), получали путем настаивания образца Co-Cr сплава для изготовления ортопедических конструкций в 10 мл воды специальной очистки (растворителя) в течение 30 дней. Объем растворителя (10 мл) определяли согласно рекомендациям ISO 10993-5. Контролем служил растворитель без исследуемых образцов. Концентрацию ионов металлов в ЖФП определяли методом масс-спектрометрии с использованием анализатора. Масса образца Co-Cr составила 4,4 грамма (взвешивание на электронных весах Adventury TMPROAV264).

Образец сплава для изготовления ортопедических конструкций «Gialloy PA» помещали в стерильную закрывающуюся пластиковую пробирку с растворителем и культивировали в термостате при температуре 37°C в течение 30 дней. В течение всего периода инкубации ежедневно взвесь перемешивали на шейкере при комнатной температуре по 60 минут. Полученную жидкость, в количестве 1 мл помещали в стерильные полипропиленовые пробирки и добавляли 1 мл 1,8% раствора хлорида натрия. Таким образом, получали ЖФП для инкубации с лейкоцитами крови.

Перед добавлением к клеткам крови в ЖФП добавляли человеческий сывороточный аль-

Таблица 1. Концентрации ионов металлов (мг/л) в ЖФП и растворе сравнения (вода специальной очистки) через 30 дней после инкубации образца сплава для изготовления ортопедических конструкций

	Co	Cr	Fe	Mg	Cu	Mn	Ni	Zn
Контроль (вода)	-0,0012	-0,0013	0,0018	0,005	-0,0027	-0,0017	-0,0018	0,0067
Сплав Co-Cr	0,6396	0,052	0,042	0,16	0,06	0,138	0,01	0,067

бумин в концентрации 2 г/л, в объеме равном полученной жидкости.

Кроме этого, готовили раствор солей металлов (PCM) в виде их смеси в равных пропорциях NiCl_2 , CrCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 в концентрации 0,01 мг/мл в забуференном физиологическом растворе. Человеческий сывороточный альбумин в концентрации 2 г/л добавлялся к этому раствору непосредственно перед использованием.

В качестве негативных контролей использовались образцы не стимулированной цельной крови, инкубированной с ЗФР.

Образцы крови пациентов вносили в 4 пробирки (12x75 мм), использовали 100 мкл крови на каждый тест: 2 аллергена и 2 негативных контроля.

Фенотипирование клеток

Для фенотипирования клеток кровь забиралась натошак из локтевой вены в пробирки с гепарином (20 ед/мл).

Исследование лимфоцитов крови проводили на проточном цитометре CytomicsFC 500 (BeckmanCoulterInc., США) с использованием моноклональных антител против CD4, CD16, CD25, CD45, CD56 и CD69, меченных флуорофорами с непересекающимися спектрами (Thermo Fisher Scientific, США).

После добавления к 100 мкл гепаринизированной цельной крови в пробирки с питательной средой Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) добавляли по 2,5 мкл ЖФП и PCM, исследуемые образцы ресуспендировали и культивировали в течение 24 часов при 37°C в термостате. После чего добавляли 2,5 мкл раствора целевых моноклональных антител, перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин при комнатной температуре, затем добавляли раствор, лизирующий эритроциты, и инкубировали при температуре 37°C еще 10 мин, добавляли 500 мкл буферного раствора и фенотипировали.

Результаты ПЦ-анализа анализировались вслепую, лаборант-оператор не знал о диагнозах пациентов, а диагностика аллергии проводилась, прежде чем результаты ПЦ становились известны.

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 критериев Mann-Whitney U Test (M-U), парного теста Wilcoxon Matched Pairs Test с указанием уровня

достоверности расчета (p). Корреляция показателей оценивалась с помощью непараметрического теста Spearman Rank Order Correlations с указанием степени и уровня достоверности расчета (p). Для оценки значимости критериев применялся ROC-анализ с указанием чувствительности, специфичности, уровня значимости (AUC), достоверности (p). ROC-анализ проводили в программе MedCalc.

Результаты исследования

Апликационные пробы

В опытную группу (n=22) были включены пациенты с положительными АП на соли металлов.

У 6 (27,3%) пациентов АП были резкоположительными, у 4 (18,2%) – сильноположительными и у 5 (22,7%) пациентов положительными к раствору соли NiCl_2 (3%).

К раствору соли CrCl_3 (3%) по результатам проведения АП у 5 (22,7%) пациентов были отмечены резкоположительные реакции, у 3 (13,63%) пациентов – сильноположительные и у 3 (13,63%) пациентов положительные реакции.

Кожная гиперчувствительность к раствору соли CoCl_2 (1%) у пациентов с HCM выявлена по АП у 8 пациентов, из них у 4 (18,2%) пациентов реакция была резкоположительной, у 2 (9%) пациентов сильноположительной и у 2 (9%) пациентов положительной.

При этом результаты проведения АП были одновременно положительными на NiCl_2 (3%) и CrCl_3 (3%) – у 7 (31,8%) пациентов, на NiCl_2 (3%) и CoCl_2 (1%) – у 5 (22,7%) пациентов; на CrCl_3 (3%) и CoCl_2 (1%) – у 2 (9%) пациентов, а на NiCl_2 (3%), CrCl_3 (3%) и CoCl_2 (1%) – у 2 (9%) пациентов.

Увеличение уровня $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD45}^+$

T-лимфоцитов крови пациентов *in vitro* в ответ на стимуляцию КСМ

Медиана значений процента T-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD45}^+$ с ЖФП, была выше тех, что наблюдалась при использовании PCM в качестве индуктора (таблица 2). Процент $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD45}^+$ T-лимфоцитов с PCM был выше, чем с контрольными растворами – ЧСА, ЗФР. Уровень T-лимфоцитов с последними (ЧСА, ЗФР) в опытной группе был достоверно выше, чем в контрольной группе (p < 0,05), что указывает на исходную активацию T-лимфоцитов ЖФП и PCM при HCM.

В пробах крови пациентов контрольной группы со стимуляторами и без них относительное

Таблица 2. Влияние КСМ на процент CD4⁺CD25⁺CD45⁺ Т-лимфоцитов

Группы	ЖФП	PCM	ЧСА	ЗФР
Опытная группа (n=22)	4,0 [2,34; 5,77] ^{*, +, ©}	2,77 [1,61; 4,64] ^{*, +, ©}	2,0 [0,96; 4,04] ^{*, xx,}	1,85 ^{xx} [0,64; 3,16]
Контрольная группа (n=20)	1,69 [1,07; 2,04]	1,55 [0,82; 1,85]	1,52 [0,83; 1,72]	1,25 [0,94; 1,67]

Примечание. * – отличие между опытной группой по сравнению с контрольной группой (pMann-Whitney<0,05);

+ – отличие между индукторами аллергенами внутри опытной группы (ЖФП и РСМ) с pWilcoxon<0,05;

© – отличие результатов с ЖФП и РСМ от ЧСА внутри группы с pWilcoxon<0,05;

xx – отличие опытной группы от контрольной без стимуляторов (p<0,05).

содержание CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов, достоверно не отличалось.

Таким образом, на лимфоцитах пациентов опытной группы, повышалась экспрессия маркеров активации – CD25+ и CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов становилось больше в ответ на стимуляцию ЖФП, РСМ и ЧСА (p <0,05), по сравнению с лимфоцитами пациентов контрольной группы. ЧСА был способен повышать экспрессию CD25 у пациентов с НСМ. Однако, показано, что лимфоциты пациентов опытной группы в ответ на стимуляцию ЖФП индуцирует экспрессию CD25 в 2 раза эффективнее, чем на ЧСА, а в ответ на стимуляцию РСМ – в 1,4 раза. В контрольной группе экспрессия CD25 молекулы была практически одинакова и количество CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов не изменялось. Эти данные подтверждают наличие в достаточной степени выраженного ответа CD4+ Т-лимфоцитов на КСМ у пациентов с НСМ.

Диагностическое значение увеличения количества CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов с использованием в качестве индуктора активации экспрессии CD25 РСМ и ЖФП.

У пациентов с НСМ выявлено увеличение количества CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов с использованием в качестве индуктора их активации CD25 РСМ и ЖФП, проведена оценка диагностического значения этого показателя.

Процент аллерген-активированных CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов определяли как разницу процента их прироста в опытной пробе, минус их процент в контрольной пробе с ЧСА.

Диагностическую значимость оценивали при помощи метода ROC-анализа (анализа кривой Receiver-Operator characteristic). Устанавливали оптимальную точку (критерий) отсечения (cut-offvalue) для изучаемых признаков и определяли площадь под кривой (AUC или area under curve) для сравнения диагностической

значимости выбранных признаков при установлении диагноза.

По результатам тестов рассчитывали оптимальный порог процента прироста CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов при оптимальных значениях чувствительности (Se) и специфичности (Sp) для различных индукторов их активации. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности наблюдалось для ЖФП, где AUC был равен 0,94. Данный параметр указывал на высокую диагностическую значимость этого лабораторного теста (рис.1). Для РСМ показатель AUC был равен 0,71 (рис.2).

При выборе из нескольких лабораторных тестов, обладающих сопоставимой диагностической мощностью, проводится их сравнение по другим дополнительным критериям. К ним относится соотношение «стоимость-эффективность» теста, а также неинвазивность, простота анализа и представления результатов, быстрота выполнения. С учетом того, что получение ЖФП длительный процесс, требующий использования специального оборудования для оценки концентрации ионов металлов в раствор, РСМ являются более приемлемым индуктором для оценки CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов у пациентов с НСМ, сопоставимым по специфичности с ЖФП, однако несколько уступающим ему по чувствительности (рис. 1, 2) (табл. 3).

Повышение уровня CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов крови пациентов in vitro в ответ на стимуляцию КСМ

Данные, представленные в таблице 4, указывают на то, что относительное содержание CD16+CD56+CD69+ ЕК-клеток, отвечающих на стимуляцию ЖФП, РСМ в крови пациентов опытной группы, было достоверно повышено по сравнению с контрольной группой (p>0,05). В образцах периферической крови с контро-

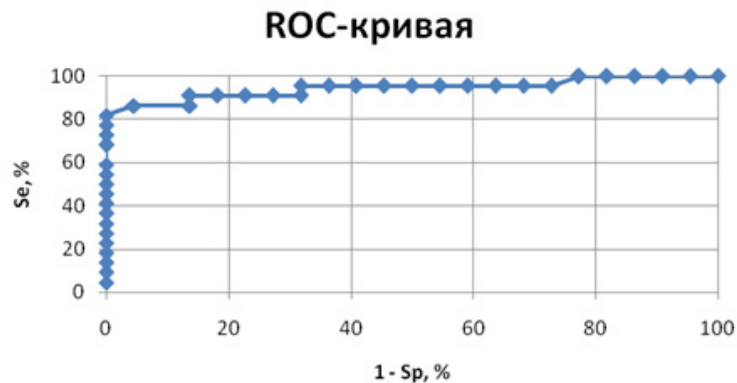


Рис. 1. ROC-анализ определения аллергии на КСМ с ЖФП по приросту CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов

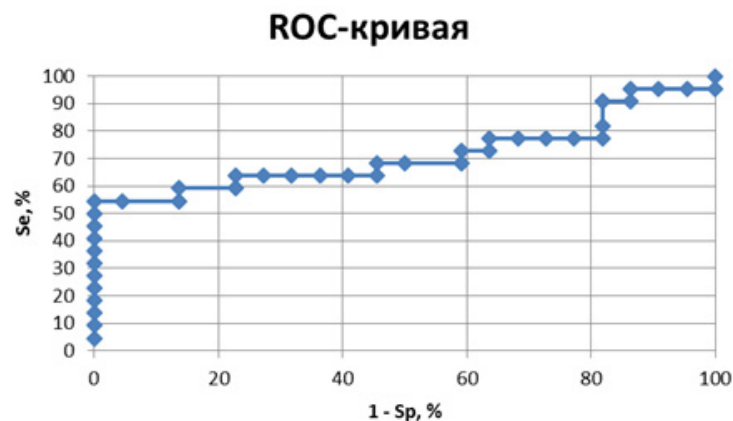


Рис. 2. ROC-анализ определения аллергии на КСМ с РСМ по приросту CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов

Таблица 3. Сравнение индукторов для диагностики аллергии на КСМ у пациентов по приросту CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов

Индукторы	Se	Sp	AUC	p	Оптимальный порог прироста
ЖФП	81,9%	100%	0,94	0,003	0,6%
РСМ	54,5%	100%	0,71	0,04	0,29%

лем активации (ЗФР) ЕК-лимфоциты здоровых людей слабее экспрессировали маркер ранней активации ЕК-лимфоцитов CD69.

Экспрессия молекулы CD69 ЕК-лимфоцитами периферической крови в пробах с ЧСА была достоверно выше по сравнению с ЗФР у пациентов опытной группы, однако более низкой чем с ЖФП и РСМ ($p > 0,05$) (таблица 4).

Относительное содержание CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов у пациентов контрольной груп-

пы свидетельствуют от отсутствию существенных различий в ответ на стимуляцию ЖФП, РСМ, ЧСА и негативным контролем активации (ЗФР) ($p > 0,05$) (таблица 4).

Таким образом, в образцах периферической крови пациентов с объективными признаками НСМ и положительными результатами АП с солями металлов выявлено достоверное повышение активированных CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов в ответ

на стимуляцию ЖФП, РСМ, ЧСА, а у лиц контрольной группы нет, что свидетельствует о наличии гиперчувствительности к металлам ЖФП и РСМ, входящими в состав дентальных сплавов.

Диагностическое значение увеличения количества CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов при их активации РСМ и ЖФП.

Для CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов, инкубированных 24 часа с ЖФП АUC был равен 0,85, а для РСМ – 0,72, что указывало на их высокую диагностическую значимость активации CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов металлами у пациентов с НСМ. По критериям диагностической чувствительности и специфичности использование ЖФП является более информативным (рис. 3, 4) (табл. 5).

Таблица 4. Процент активированных CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов в группах сравнения

Группы	ЖФП	РСМ	ЧСА	ЗФР
Опытная группа (n=22)	1,18 [0,56; 1,91] ^{*,+}	0,82 [0,32; 1,92] ^{*,+}	0,6 [0,24; 1,44] ^{*,⊙}	0,38 [0,1; 0,96] [⊙]
Контрольная группа (n=20)	0,35 [0,04; 1,04]	0,29 [0,04; 1,06]	0,31 [0,07; 1,08]	0,36 [0,03; 0,73]

Примечание. * – отличие между опытной группой по сравнению с контрольной группой (pMann-Whitney<0,05);

+ – отличие между индукторами аллергенами (ЖФП и РСМ) внутри опытной группы с pWilcoxon<0,05;

⊙ – отличие результатов с ЖФП и РСМ от ЧСА внутри группы с pWilcoxon<0,05.

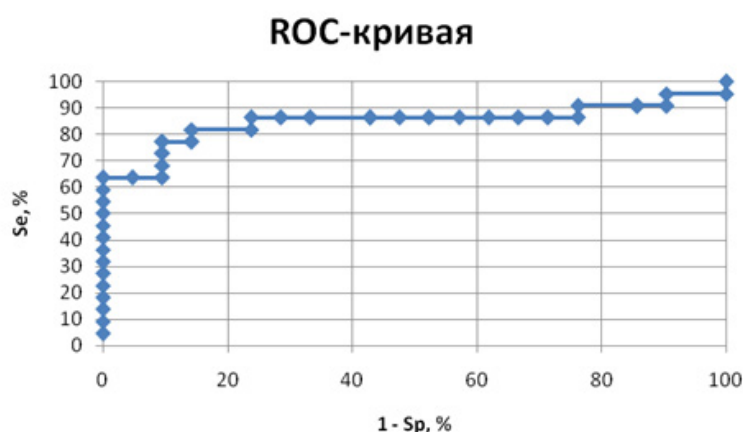


Рис. 3. ROC-анализ для определения аллергии на КСМ с ЖФП по приросту CD4+CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов

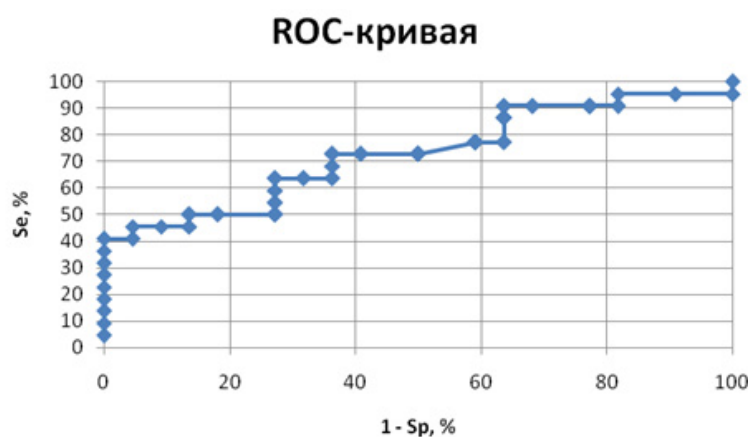


Рис. 4. ROC-анализ определения аллергии на КСМ с РСМ по приросту CD4+CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов

Таблица 5. Сравнение индукторов для диагностики гиперчувствительности на КСМ у пациентов по приросту уровня CD16⁺CD56⁺CD69⁺ ЕК-лимфоцитов

Индукторы	Se	Sp	AUC	p	Оптимальный порог прироста
ЖФП	77,2%	90,4%	0,85	0,0005	0,16%
РСМ	40%	100%	0,72	0,02	0,42%

Обсуждение

Для выявления гиперчувствительности к КСМ *in vitro* предлагают использовать различные индукторы, такие как 0,001 или 0,0001 % растворы солей металлов [14, 15], ионы которых входят в состав стоматологических сплавов. Другие авторы предлагают использовать «экстракты», полученные в результате настаивания образцов стоматологических материалов в виде мелкой стружки, полученной твёрдосплавной фрезой. Полученные образцы в количестве 125 мг помещали в стерильные полипропиленовые пробирки и заливали 1 мл стерильного RIPES буфера. Взвесь периодически перемешивали на магнитной мешалке в течение 48 часов при 37°C и центрифугировали при 1250 об/мин в течение 15 минут. Затем в ячейки 96-луночных планшет заливали 25 мкл плазмы крови и добавляли по 25 мкл «супернатантов» исследуемых образцов, положительного и отрицательного контролей или только буфера [16].

Показано, что оба варианта вызывают индукцию иммунного ответа. Однако, каждый из этих вариантов, по нашему мнению, не лишен недостатков. Соли металлов содержат кислотные остатки (Cl, SO₄ и тд.), которые могут влиять на результаты исследования, тем, что до конца не ясно, что именно ион вызывает ответ. В случае с получением стружки и её настаиванием можно выделить следующие недостатки:

1. В стружку для настаивания попадают частицы твёрдосплавной фрезы, которая изготавливается не из биоинертного сплава и не подвергается биологическому тестированию, в результате чего получаемая настойка оказывает цитотоксическое воздействие на клетки (установлено нами в РАПЛ с клетками здоровых доноров).
2. Не известна концентрация компонентов стоматологических материалов в получаемых настоях.

Поэтому мы поставили задачу сравнить воздействие РСМ, в предлагаемых авторами концентрациях, и ЖФП, полученной путем настаивания в течение 1 месяца цельных дентальных сплавов в физиологическом растворе, полученных путем центробежного литья. Предварительно устанавли-

вали, что РСМ и ЖФП в цитотоксическом тесте не оказывает цитотоксического воздействия на клетки 10 здоровых добровольцев.

Несмотря на тот факт, что большинство людей вступают в контакт с КСМ, способными вызывать сенсibilизацию, лишь у немногих людей развивается аллергия или неспецифическая гиперчувствительность на них. Это говорит о том, что в физиологических условиях система иммунитета СОПР обладает регуляторными механизмами, чтобы избежать иммунопатологических реакций на гаптены [17]. Было зафиксировано на мышах существование толерогенных механизмов, которые препятствуют иммунным реакциям на гаптены, наносимые на кожу. Гаптен-специфическая толерантность встречается у животных, которых кормили аллергеном перед кожной сенсibilизацией. Оральная толерантность может быть воспринята животными с CD4 клетками селезенки или лимфатических узлов или со смесью CD4 Т-клеток и IL-10 [18]. Кроме того, гаптены, нанесенные на кожу, облучаемую ультрафиолетом, повышают активность IL-10-секретирующих CD4-Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни CTLA-4 и подавляют гаптен-специфические иммунные ответы *in vivo* [17]. CD4 Т-регуляторные клетки (Treg), экспрессирующие цепь IL-2R (CD25), были идентифицированы как у мышей, так и у людей [1]. Считается, что CD25 Treg происходят из тимуса как отдельная линия Т-клеток, участвующая в поддержании толерантности к собственным АГ [19]. CD25 Treg составляют 5-10% CD4 Т-клеток периферической крови, экспрессируют высокие уровни CTLA-4 и являются изначально анергическими *in vitro* для митогенов [21]. После активирования TCR CD25 Treg ингибируют пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток и высвобождение IL-2 [20]. Это объясняет отсутствие прироста или снижения CD25 на CD4+ Т-лимфоцитах пациентов контрольной группы под влиянием ЖФП и РСМ. Наши результаты демонстрируют изменение CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов в эксперименте *in vitro*, что позволяет сделать заключение

об их участии в развитии гиперчувствительности на КСМ. Хотя точный механизм ее на КСМ неизвестен, секреция растворимых цитокинов активированными CD4+ Т-хелперами может индуцировать появление CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов, препятствуя их апоптозу в культуре [13]. Роль ЕК-клеток в гиперчувствительности остается неясной, однако их активация ЖФП и РСМ указывает на вклад этих клеток в ее развитие на КСМ.

Нами исследована активация CD4+ Т-лимфоцитов хелперов в ответ на стимуляцию ЖФП и РСМ. В результате проведенного исследования установлен ряд закономерностей в экспрессии маркеров их активации.

У пациентов опытной группы, с объективными признаками НСМ и положительными результатами АП, относительное и абсолютное количество CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов в ответ на стимуляцию ионами ЖФП и РСМ было достоверно выше, чем у здоровых лиц и достоверно выше по сравнению с данными негативного контроля активации. Механизм

активации ЕК-клеток врожденного иммунитета неясен. Они могли активироваться до индукции адаптивного иммунитета, так и после его развития. Т-лимфоциты периферической крови пациентов этой группы также отвечали повышенной экспрессией CD25 молекул в ответ на стимуляцию ЧСА.

Выводы

1. После 24-часовой инкубации крови пациентов, имеющих объективные критерии НСМ и положительные АП на соли металлов, с ЖФП и РСМ увеличивается количество CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов и CD16+CD56+CD69+ ЕК-лимфоцитов. Этого не наблюдалось в крови пациентов контрольной группы.
2. Результаты подтверждают потенциальную роль CD4+CD25+CD45+ Т-лимфоцитов и CD16+CD56+CD69+ лимфоцитов в развитии гиперчувствительности на КСМ, что может служить диагностическим критерием бионепереносимости КСМ.

Литература

1. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. М., 2009, 440 с.
2. Raap U, Stiesch M, Reh H, Kapp A, Werfel T. Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients. *Contact Dermatitis* 2009; 60(6): 339–43.
3. Caubet J.C., Masilamani M., Neisha A. et al. Sampson Potential non-T cells source of interleukin-4 in food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 May; 25(3): 243–249. doi:10.1111/pai.12207
4. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3. *Иммунология.* 2006. 3: 176–88.
5. Sakaguchi, S. Natural arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 531–62.
6. Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler D.A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin. Immunol.* 2005; 115:10–18.
7. Baecher-Allan C. et al. CD4+CD25hi regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167: 1245–53.
8. Gregg R. et al. The number of human peripheral blood CD4+ CD25 high regulatory T cells increases with age. *ClinExpImmunol.* 2005; 140: 540–546.
9. Chen W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 1875–1886.
10. Ling E.M. et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 2004; 363: 608–615
11. Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+Regulatory T Cells Maintain Immune Tolerance to Nickel in Healthy, Nonallergic Individuals. *J Immunol* 2003; 171: 5760–5768.
12. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Выявление аллергии и гиперчувствительности к солям металлов путем определения уровня ионов калия в ротовой жидкости. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2016; №3: 21–30.
13. Kimura M.Y., Hayashizaki K., Tokoyoda K. et al. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol Rev.* 2017 Jul; 278(1):87-100. doi: 10.1111/imr.12559.
14. Федорович С.В., Соколов. С.М., Мойсейчик П.Н. и др. Аллергия в стоматологической практике. Барановичи, 2001, 182 с.
15. Карпук Н.А., Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Диагностика аллергии на кобальт и медь in vivo у пациентов с непереносимостью металлов. *Вестн. ВГМУ* 2012; Т. 11, №2: 123–132.
16. Бабахин А.А., Воложин А.И., Дубова Л.В. и др. Гистаминвысвобождающая активность стоматологических материалов как показатель их биосовместимости. *Стоматология* 2008; Том 87, №1: 8–17.
17. Schwarz A., Beissert S., Grosse-Heitmeyer K. et al. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J. Immunol.* 2000; 165: 1824.
18. Artik S., Haarhuis K., Wu X. et al. Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T

cells with persistent suppressor activity. J. Immunol. 2001; 167: 6794.

19. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J. et al. CD4CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J. Immunol. 2001; 167: 1245.

20. Piccirillo C.A., Letterio J.J., Thornton A.M. et al. CD4CD25 regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor β 1 production and responsiveness. J. Exp. Med. 2002; 196: 237.

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.

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.

Новиков Дмитрий Кузьмич – заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет», д.м.н., профессор.

Поступила 4.05.2017 г.