

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ЖАЛОБАМИ НА НЕБЛАГОПРИЯТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕНТАЛЬНЫХ СПЛАВОВ

П.Л. Титов, П.Н. Мойсейчик

Белорусский государственный медицинский университет

В настоящее время для изготовления большинства конструкций съемных и несъемных зубных протезов, а также ортодонтических аппаратов, широко используются дентальные сплавы на основе благородных металлов. Недостаточные знания о поведении в биологической среде полости рта благородных дентальных сплавов привело к многолетнему использованию некоторых более или менее токсичных материалов, отрицательно воздействующих на организм [1, 2, 3, 8]. В развитии подобных локальных и системных иммуновоспалительных процессов принимают участие гуморальные и клеточные механизмы. Принято считать, что основным механизмом реализации иммунологического эффекта локальных реакций полости рта на компоненты дентальных сплавов являются реакции гиперчувствительности IV типа (Т-клеточные), протекающие, обычно, по типу контактных дерматитов [4, 5, 6, 7]. Недостаточная изученность механизмов патогенеза таких состояний обуславливает отсутствие как научно-обоснованных критериев и методов клиничко-лабораторного обследования пациентов, так и трудности в постановке окончательного диагноза.

Цель исследования: изучение основных параметров клеточного звена иммунного статуса пациентов с предполагаемым негативным воздействием компонентов благородных сплавов в зависимости от характера клинической картины, а также результатов кожного аппликационного аллерготестирования с солями металлов, входящих в состав дентальных сплавов.

Материалы и методы. Характеристика групп обследованных пациентов. Был обследован 31 пациент с подозрением на неблагоприятное действие дентальных сплавов, обратившихся за помощью на кафедру ортопедической стоматологии БГМУ. Из них 29 (93,54%) составили женщины и 2 (6,46%) мужчины в возрасте от 35 до 71 года (средний возраст пациентов $51,71 \pm 1,51$ лет). Контрольную группу пациентов составили здоровые люди в количестве 21 человека, не имеющие данной патологии. Из них 19 (90,4%) составили женщины и 2 (9,6%) мужчины, в возрасте от 38 до 65 лет (средний возраст — $52,62 \pm 1,69$ лет). Всем пациентам были проведены ретроспективный анализ стоматологических и общесоматических историй болезни и оценка стоматологического статуса.

Кожное аппликационное аллерготестирование. Кожное аппликационное аллерготестирование выполняли в соответствии с рекомендациями международной научной группы контактных дерматитов (International Contact Dermatitis Research Group, ICDRG). Для выполнения кожного аллерготестирования применяли специальные аппликаторы – Finn Chamber on Scanpor (Eptest Ltd.Oy, Tulusa, Финляндия) на десять лунок. Для аллерготестирования использовали соли металлов ($n=8$) входящих в состав благородных дентальных сплавов

Материал для исследования. Материалом для исследований являлась периферическая кровь больных (опытная группа) и здоровых (контрольная группа) людей. Кровь (3 мл) забирали из локтевой вены натошак в утреннее время в стерильную пробирку, содержащую консервант (гепарин 20 ед/мл).

Выделение мононуклеаров периферической крови. Выделение мононуклеаров периферической крови из лейкоцитарной массы производили центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина (плотность — $1,077$ г/см³).

Окрашивание клеток. Образцы мононуклеаров периферической крови (100 мкл, $1,0 \times 10^6$ /мл) инкубировались с FITC- или с PE (фико-эритрин) конъюгированными анти-человеческими моноклональными антителами (20 мкл) в течение 30 мин при 4°C, затем дважды промывались в холодном фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH=7,4) и фиксировались 0,5 мл 1% параформальдегида. Окрашен-

ные и зафиксированные образцы до проведения цитометрии хранились при температуре 4°C.

Моноклональные антитела. Экспрессию CD-антигенов определяли с помощью FITC (fluorescein isothiocyanate) конъюгированных анти-человеческих моноклональных антител производства Becton Dickinson Pharming. (США).

Проточная цитометрия. Анализ подготовленных образцов осуществляли не позднее, чем 24 часа после окрашивания. Иммунофенотипирование мононуклеаров производили методом непрямой проточной цитофлюорометрии с помощью цитометра FACSCalibur компании Becton Dickinson (США). Для обработки получаемых данных использовался программно-аппаратный комплекс CellQuest той же компании.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных результатов проводили, используя компьютерные программы Microsoft Excel и StatSoft STATISTICA 6.0 с расчетом средней и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$), критерия Стьюдента (t). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследований и их обсуждение. Характеристика субъективных и объективных симптомов патологии полости рта и результаты кожного аллерготестирования.

24 из 31 пациента (77,48%) могли четко обозначить причинно-следственную связь между возникновением неблагоприятной симптоматики в полости рта и фактом зубопротезирования. Субъективные симптомы, такие как синдром горящего рта, привкус металла, сухость полости рта, извращение вкуса и др. предъявляли 17 (54,85%) пациентов. При этом у 16 пациентов (51,60%) присутствовали только субъективные симптомы. У 14 пациентов (45,16%) наблюдались следующие объективные симптомы: локализованный в области протезов гингивит — 6 (19,35%), стоматит в области протезов — 4 (12,90%), лихеноидные реакции — 2 (6,45%), глоссит (географический и складчатый язык) — 4 (12,90%), афтозный стоматит — 1 (3,22%), хейлит — 1 (3,22%). Наиболее часто по данным кожного аппликационного аллерготестирования положительную реакцию вызывали соли Ni (45,68%), Cr (41,93%) и Co (19,35%). Соли таких металлов, как Mg (0%), Zn (3,25%) и Ti (3,25%) вызывали положительную реакцию реже всего.

Характеристика параметров иммунного статуса обследованных пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов. Иммунный статус пациентов опытной и контрольной оценивали по относительному содержанию в периферической крови основных популяций и субпопуляций лимфоцитов – общих Т-лимфоцитов (CD3+), общих В-лимфоцитов (CD20+), субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов (CD4+) и супрессоров (CD8+), а также их соотношения - CD4+/CD8+ (иммунорегуляторный индекс). Кроме того, исследовано количественное содержание иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих на поверхности мембраны активационные маркеры – CD25+ (альфа цепь рецептора IL-2), CD11b+ (интегрин, CR3-рецептор), CD45+ (тирозиновая фосфатаза), CD95+ (Fas-антиген), HLA-DR+ (молекулы распознавания II класса). Содержание В-лимфоцитов (CD20+ клеток) характеризовалось незначительным его снижением в опытных группах пациентов относительно здоровых лиц группы контроля, и некоторым варьированием средних значений этого показателя в опытных группах обследованных пациентов с наличием или отсутствием исследуемых признаков ($p > 0,05$). Более заметное снижение В-клеток отмечено в группе пациентов с наличием сенсибилизации к никелю ($7,4 \pm 1,19$), а также у лиц сенсибилизированных к кобальту ($7,93 \pm 2,33$). Общее содержание Т-лимфоцитов (CD3+ клеток) также характеризуется некоторым варьированием данных. Наиболее заметны различия в содержании Т-лимфоцитов у лиц с наличием объективных признаков поражения слизистой полости рта ($60,75 \pm 3,36$) и положительных результатов кожного тестирования ($61,18 \pm 2,25$) относительно данных контроля ($64,63 \pm 2,57$). Наиболее существенные сдвиги отмечены в содержании цитотоксической/супрессорной субпопуляции Т-лимфоцитов (CD8+ клеток). Основной тенденцией является снижение их содержания в периферической крови пациентов опытных групп. Достоверные различия средних значений получены для группы лиц с объективной симптоматикой ($18,42 \pm 2,39$; $p < 0,05$), положительными результатами кожного аллерготестирования ($19,29 \pm 1,86$; $p < 0,05$), а также сенсибилизацией к никелю ($p < 0,05$), хрому ($p < 0,05$), кобальту ($p < 0,05$) и одновременной сенсибилизацией к нескольким металлам ($p < 0,05$). В периферической крови обследованных пациентов опытных групп отмечалось несколько повышенное содержание клеток экспрессирующих молекулу CD25+ в сравнении с данными здоровых лиц контрольной группы, особенно у больных с наличием объективной клинической симптоматики ($6,68 \pm 1,35$), а также у лиц с положительными результатами кожного аллерготестирования ($6,11 \pm 0,91$), у лиц с сенсибилизацией к хрому ($6,55 \pm 1,43$) и одно-

временной сенсibilизацией к нескольким металлам ($7,23 \pm 1,7$). Мембранная тирозиновая фосфатаза (CD45+) участвует в проведении внутриклеточных сигналов при активации В- и Т-лимфоцитов. Данные иммунофенотипирования клеток периферической крови обследованных пациентов указывают на заметную тенденцию к повышению экспрессии этого маркера у пациентов с наличием объективных симптомов изучаемой патологии ($64,28 \pm 5,84$) и у пациентов с сенсibilизацией к Ni ($60,71 \pm 4,99$) и Co ($58,44 \pm 9,6$). Fas-антиген (CD95+) является маркером апоптоза клеток. При повышении его экспрессии на мембране эффекторных клеток и недостаточной ко-стимуляции создаются условия для облегченного взаимодействия таких клеток с соответствующим лигандом мембраны кооперирующихся в иммунном ответе клеток и индукции их запрограммированной смерти. Полученные в ходе обследования пациентов данные указывают на более высокие значения этого показателя у лиц имеющих объективные патологические изменения в полости рта ($57,35 \pm 2,74$), у лиц, сенсibilизированных к Ni ($52,33 \pm 4,03$) и Co ($59,72 \pm 3,3$). Решающим моментом в активации иммунокомпетентных клеток и развитии иммунной ответной специфической реакции является связывание эпитопов антигена (аллергена) молекулами распознавания I и II классов, образование комплекса и его экспонирование на мембране антигенпрезентирующих клеток. Полученные данные свидетельствуют, что максимальной выраженности их экспрессия имеет место у пациентов с наличием объективных признаков заболевания в полости рта ($16,66 \pm 3,27$), у пациентов с положительными кожными тестами ($16,10 \pm 2,21$), сенсibilизацией к Co ($13,63 \pm 3,63$) и одновременной сенсibilизацией к нескольким металлам ($14,74 \pm 2,69$).

Выводы. Анализируя результаты исследования, следует отметить наличие в достаточной степени характерных или патогномоничных клинико-лабораторных данных позволяющих охарактеризовать эту группу пациентов. Параметры иммунного статуса обследованных характеризовались отсутствием значимых отклонений от нормы в содержании общего числа В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD20+, принимающую важное участие в механизмах их активации и регуляции. Со стороны Т-системы лимфоцитов наиболее значимые изменения выявлены в относительном содержании и соотношении иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток – CD4+ и CD8+. Результаты настоящего исследования также неоспоримо свидетельствуют о вовлеченности маркеров активации иммунокомпетентных клеток — CD25+, CD45+, CD11b+ в механизмы иммунопатогенеза реакций гиперчувствительности к компонентам неблагородных дентальных сплавов. Наиболее выражены изменения со стороны экспрессии HLA-DR+ молекул и CD95+-рецептора апоптоза. Роль и клиническое значение данных параметров еще следует более детально изучить.

CHARACTERISTICS OF IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN PATIENTS WITH COMPLAINTS ADVERSE EFFECTS OF DENTAL ALLOYS ABOUT

P.L. Titov, P.N. Moiseichik

Most fixed and removable dentures are made from casting alloys. Many orthodontic appliances are also fabricated from metallic biomaterials. It has been documented *in vitro* and *in vivo*, that metallic restorations release metal ions mainly due to corrosion. Those metallic ions may be distributed systemically and locally and could play a significant role in the induction of oral or/and systemic immunoinflammatory conditions. The aim of the present study was to study the phenotypic and functional activities of peripheral blood mononuclears from patients with complaints suspected to adverse effects of dental alloys. We examined 31 patients (29 women and 2 men) in the age 35–71 years with symptoms assumed to adverse effects of dental alloys. All patients were studied with base metal salts (Cu²⁺, Co²⁺, Cr⁶⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Ti³⁺, Zn²⁺) for patch tests. 21 healthy people served as control subjects. Phenotyping of peripheral blood mononuclears was assessed by indirect immunofluorescence staining after incubation with monoclonal antibodies specific for CD3+, CD4+, CD8+, CD11b+, CD20+, CD25+, CD45+, CD95+ and HLA-DR+ by flow cytometry. Number of CD20+-cells was a slightly reduced ($9,29 \pm 1,5$). The total count of T-lymphocytes was reduced insignificantly ($60,75 \pm 3,36$), as well as CD4+-cells ($37,03 \pm 2,61$). Decrease of CD8+-cells has been more expressed at sensitized to nickel ($19,43 \pm 2,03$) and cobalt ($12,47 \pm 2,16$) patients and at the patients with objective symptoms ($18,42 \pm 2,39$). Significant rise of CD4+ (T-helpers) and CD8+ (T-suppressors) ratio was found in patients with positive patch tests to nickel ($2,35 \pm 0,4$) and cobalt ($4,09 \pm 1,04$) ($p < 0,05$). Reliable variations of expression of activation (CD25+, CD45+, CD11b, HLA-DR) and apoptosis (CD95+) markers

were revealed in sensitized to metals patients ($p < 0,05$).

Obtained results reveals more significant changes in T-lymphocytes (CD3+, CD4+, CD8+) subpopulations and expression of activation molecules, confirming primary role of T-lymphocytes in development of such oral immunopathological conditions.

Литература.

1. Диагностика, клиника и лечение непереносимости к металлам в полости рта: Метод. рекомендации / Сост. А.К. Творус с др. – Ставрополь, 1993. – 13 с
2. Марков Б.П., Жириков Ю.А. // Стоматология. – 1995. – Т.74, N1. – С. 52-54
3. Bergman M. // Int Dent J 1986; Mar;36(1):41-44
4. Bolewska J, Holmstrup P, Moller-Madsen B, et al. // J Oral Pathol Med 1990;19:39-42
5. Bolewska J, Reibel J. // J Oral Pathol Med 1989;18:525-8
6. Fregert S. Manual of contact dermatitis. 2nd ed. Copenhagen; Munksgaard, 1981;71-83
7. Holmstrup P. // J Oral Pathol Med 1991;20:1-7
8. Klein CL, Nieder P, Wagner M, Köhler H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. // J Mater Sci: Mater Med 1994; 5:798-807