

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ЖАЛОБАМИ НА НЕБЛАГОПРИЯТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕНТАЛЬНЫХ СПЛАВОВ

Мойсейчик Петр Николаевич

*Кандидат медицинских наук, доцент
Белорусский государственный медицинский университет
Беларусь, Минск
ortopedstom@bsmu.by*

Титов Петр Леонидович

*Кандидат медицинских наук, доцент
Белорусский государственный медицинский университет
Беларусь, Минск
ortopedstom@bsmu.by*

Целью настоящего исследования явилось изучение основных параметров клеточного звена иммунного статуса пациентов с предполагаемым негативным воздействием компонентов неблагоприятных дентальных сплавов.

Полученные результаты указывают на наличие выраженных изменений в периферической крови больных в содержании Т-лимфоцитов ($CD4^+$ и $CD8^+$), а также в экспрессии активационных молекул, что подтверждает ведущую роль Т-клеточного звена лимфоцитов в развитии иммуновоспалительных процессов в полости рта, связанных с неблагоприятным действием компонентов неблагоприятных сплавов.

***Ключевые слова:** дентальные сплавы, металлы, гуморальные факторы, неблагоприятные эффекты, воспалительные аллергические реакции.*

IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN PATIENTS WITH COMPLAINTS SUSPECTED TO ADVERSE EFFECTS OF DENTAL ALLOYS

Moiseichik P.N.

*PhD, Associate Professor
Belarus State Medical University
Belarus, Minsk
ortopedstom@bsmu.by*

Titov P.L.

*PhD, Associate Professor
Belarus State Medical University
Belarus, Minsk
ortopedstom@bsmu.by*

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. 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.

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.

Key words: *dental alloys, metals, adverse effects, allergy, humoral immunity.*

Введение. Недостаточные знания о поведении в биологической среде полости рта неблагородных дентальных сплавов привело к многолетнему использованию некоторых более или менее токсичных материалов, отрицательно воздействующих на организм. Благородные сплавы с высоким содержанием драгоценных металлов, как правило, не вызывают в организме побочных реакций. Однако, такие компоненты неблагородных дентальных сплавов, как Ni, Co и Cr, обладая выраженным аллергенным потенциалом, могут индуцировать местные (локализованные гингивиты и стоматиты, лихеноидные поражения, прогрессирующая резорбция костной ткани, синдром горящего рта и др.) и общие аллергические реакции (контактные дерматиты, астма и др.).

Цель работы – изучение антигенспецифического ответа Т- и В-лимфоцитов периферической крови пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов при стимуляции *in vitro* ионами Ni²⁺ в зависимости от характера клинической картины и сенсибилизации организма к металлам, входящих в состав неблагородных дентальных сплавов.

Объекты и методы. Был обследован 31 пациент (29 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 35 до 71 года с подозрением на неблагоприятное действие дентальных сплавов, обратившихся за помощью на кафедру ортопедической стоматологии БГМУ. Контрольную группу пациентов составил 21 человек, не имеющий данной патологии.

Для выявления сенсибилизации к металлам, входящим в состав неблагородных дентальных сплавов применяли кожное аппликационное аллерготестирование, которое выполняли в соответствии с рекомендациями ICDRG. Для его проведения использовались аппликаторы Finn Chamber (Epitest). Тестовыми субстанциями служили 3% соли металлов Cu²⁺, Co²⁺, Cr⁶⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Ti³⁺, Zn²⁺ на вазелиновой основе.

Материалом для исследований являлась цельная гепаринизированная (20 ед/мл) периферическая кровь пациентов опытной и контрольной групп в количестве 1,5 мл, взятая утром натощак из локтевой вены.

Образцы крови пациентов разделяли в 3 пробирки (12x75 мм), не менее 200 мкл крови на тест, по количеству стимуляторов + негативный и позитивный контроли активации. В пробирки добавляли NiSO₄×6H₂O – в количестве 5 мкг/мл

(1,2 мкг Ni^{2+} /мл). В качестве позитивного контроля активации использовались моноклональные антитела CD2/CD2R в количестве 20мкл/мл. В качестве негативного контроля (спонтанная активация) использовались образцы нестимулированной цельной крови. После добавления в пробирки сульфата никеля и анти-CD2 моноклональных антител, исследуемые образцы ресуспендировали и культивировали в течение 20 часов при 37°C в атмосфере 5% CO_2 во влажном термостате.

Экспрессию маркеров ранней активации определяли с помощью наборов FASTIMMUNE, представляющих собой комбинацию моноклональных антител против поверхностных маркеров лимфоцитов человека, конъюгированных с тремя различными флюоресцирующими метками производства Beckton Dickinson (США): CD4 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP, CD8 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP и CD19 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP. Определение экспрессии маркеров ранней активации Т- и В-лимфоцитов производили методом непрямой проточной цитофлюорометрии с помощью цитометра FACSCalibur компании Becton Dickinson (США). Для анализа активации Т-хелперов и Т-супрессоров ($CD4^+$, $CD8^+$) отбирались клетки, позитивные по CD3-антигену (PerCP, FL3); для анализа активации В-лимфоцитов – клетки положительные по CD45-антигену (PerCP, FL3). Для определения экспрессии каждого маркера подсчитывали не менее 5000 клеток.

Статистический анализ полученных результатов проводили, используя 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 исследования. В наших исследованиях, согласно результатам кожного аллерготестирования с солями металлов, сенсibilизация к Ni^{2+} выявлялась у 45,16% пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов.

При проведении исследований изучена ранняя активация Т- и В-лимфоцитов в ответ на стимуляцию ионами Ni^{2+} (специфические антигены) и установлен ряд закономерностей в экспрессии маркеров ранней активации Т- и В-лимфоцитов.

Результаты оценки ранней активации В-лимфоцитов при стимуляции ионами Ni^{2+} свидетельствуют о более низкой их функциональной активности в группе больных сенсibilизированных к никелю под влиянием ионов Ni^{2+} . Экспрессия же маркеров $CD19^+CD69^+$ В-клетками больных сенсibilизированных к никелю ($5,21 \pm 1,42$) при стимуляции анти-CD2 моноклональными антителами была достоверно выше, чем в группе контроля ($3,13 \pm 0,23$; $p < 0,05$).

$CD4^+$ Т-лимфоциты являются наиболее важной субпопуляцией регуляторных и эффекторных Т-клеток. Как свидетельствуют полученные данные, в ответ на стимуляцию ионами Ni^{2+} у больных сенсibilизированных к никелю отмечалась повышенная экспрессия $CD4^+$ Т-клетками маркеров ранней активации $CD4^+CD69^+$ по сравнению с группой контроля ($6,58 \pm 4,72$ и $3,61 \pm 0,55$

соответственно; $p < 0,05$). Следует отметить, что при стимуляции анти-CD2 моноклональными антителами и оценке спонтанной активации у обследованных лиц экспрессия этих маркеров была достоверно выше, чем у лиц контрольной группы, что указывает на более высокую функциональную активность CD4⁺ Т-клеток этих пациентов ($12,44 \pm 1,55$ и $6,47 \pm 0,62$, $2,11 \pm 0,51$ и $0,77 \pm 0,04$ соответственно; $p < 0,05$).

Несколько иная картина отмечается при стимуляции ионами Ni²⁺ CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов. Как следует из представленных данных, в подгруппе больных сенсibilизированных к никелю при стимуляции ионами Ni²⁺ отмечается более низкая экспрессия маркеров ранней активации CD8⁺CD69⁺ ($1,84 \pm 0,41$) по сравнению с контролем ($2,50 \pm 0,63$, $p > 0,05$), тогда как экспрессия этих маркеров при спонтанной активации была повышена. Экспрессия этих маркеров в ответ на стимуляцию анти-CD2 моноклональными антителами у больных с сенсibilизацией к никелю была повышенной по сравнению с группой контроля.

Как следует из представленных ранее данных иммунокомпетентные клетки обследованных больных, как не стимулированные, так и стимулированные ионами Ni²⁺ отвечали повышенной экспрессией маркеров ранней активации. Интенсивность и направленность изменений в их экспрессии была различной, что с одной стороны может указывать как на наличие клеток памяти у лиц сенсibilизированных к ионам металлов, так и о модулирующем эффекте ионов металлов в отношении наивных и эффекторных иммунокомпетентных клеток.

Заключение. Оценка экспрессии маркеров ранней активации лимфоцитами периферической крови в ответ на стимуляцию *in vitro* ионами металлов, входящих в состав дентальных сплавов, может применяться в диагностике реакций гиперчувствительности к металлам при углубленном изучении функционального состояния иммунокомпетентных клеток больных с данной патологией.