

## Выявление аллергии и гиперчувствительности к солям металлов путем определения уровня ионов калия в ротовой жидкости

И.Ю. Карпук, Д.К. Новиков

УО «Витебский государственный медицинский университет»

## Detection of allergy and hypersensitivity to metal salts by measurement of potassium ions level in the oral fluid

I.U. Karpuk, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

Целью настоящего исследования явилось выявление аллергии и гиперчувствительности к ионам металлов, путем определения выброса ионов калия из лейкоцитов слизистой оболочки полости рта в ротовую жидкость у пациентов с непереносимостью зубопротезных материалов. Проведено обследование 584 пациентов в возрасте от 34 до 86 лет, из них 61 мужчина и 523 женщины. Пациентам осуществлялась постановка аппликационного тестирования с растворами солей  $\text{NiCl}_2$  (3%),  $\text{CrCl}_3$  (3%),  $\text{CoCl}_2$  (1%) и реакция аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов с 0,001% растворами солей металлов:  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$ . После чего пациенты были разделены на 2 группы: положительными результатами по обоим тестам ( $n=94$ ) и 488 пациентов с отрицательными результатами (из них было отобрано методом рандомизации 90 пациентов для включения в исследование).

Установлено, что лейкоциты слизистой оболочки полости рта больных с непереносимостью зубопротезных материалов аллергической этиологии под влиянием солей металлов, являющихся аллергенами, выделяют в ротовую жидкость ионы калия, что указывает на их повышенную чувствительность. Всем пациентам проводили орально-трансбуккальные провокационные пробы с солями тех же металлов и собирали ротовую жидкость. Количество выделенных ионов калия из лейкоцитов слизистой оболочки полости рта определяли в ротовой жидкости, разведенной в десять раз, *in vitro* методом пламенной фотометрии.

У пациентов с НЗМ аллергической этиологии показатели среднего уровня  $\text{K}^+$  в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составил 85,95 [77,8; 98,3] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,7 [42,1; 67,8] мг/л ( $P_{\text{Wilcoxon}}=0,0001$ ). Уровень  $\text{K}^+$  в РЖ у пациентов с жалобами на непереносимость зубопротезных материалов неустановленной этиологии ( $n=90$ ) до снятия ортопедических конструкций составил 66,4 [56,3; 72,6] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,5 [42,9; 58,3] мг/л ( $P_{\text{Wilcoxon}}=0,0001$ ).

### Summary

The purpose of the real research was detection of an allergy and a hypersensitivity to ions of metals by definition of emission of potassium ions from oral cavity mucosa leucocytes in oral liquid at patients with an intolerance of dentoprosthetic materials.

Examination of 584 patients aged from 34 up to 86 years, from them 61 men and 523 women is conducted. To patients statement of application skin testing with solutions of  $\text{NiCl}_2$  salts (3%),  $\text{CrCl}_3$  (3%),  $\text{CoCl}_2$  (1%) and reactions of allergeninduction damage of leucocytes from 0,001% solutions of salts of metals was carried out:  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$ . Then patients have been divided into 2 groups: positive results on both tests ( $n=94$ ) and 488 patients with negative results (from them it has been selected by method of randomization of 90 patients for inclusion in a research).

During the carried-out work with us it is established, leucocytes of oral mucosa of patients with an intolerance of dentoprosthetic materials of an allergic genesis under the influence of salts of the metals which are allergens allocate potassium ions in nadosadochny liquid that indicates their hypersensibility. The quantity of the allocated potassium ions from sensibilized leucocytes of oral liquid under the influence of solutions of salts of metals can be determined by *in vitro*, taping a hypersensibility to them.

It is shown that emission of potassium ions by leucocytes of oral liquid under the influence of salts of metals is specific and isn't specific after provocative assay by allergen. Patients with an intolerance of dentoprosthetic materials of presumably allergic etiology have indicators of the average level and dispersion of values of the  $\text{K}^+$  level in oral liquid before putting off of causal orthopedic designs made 85,95 [77,8; 98,3] mg/l, and 1 month later after putting off – 51,7 [42,1; 67,8] mg/l ( $P_{\text{Wilcoxon}}=0,0001$ ). The  $\text{K}^+$  level in oral liquid at patients with complaints to oral liquid of an unspecified etiology ( $n=90$ ) before putting off of orthopedic designs made 66,4 [56,3; 72,6] mg/l, and 1 month later after putting off – 51,5

После пероральной провокационной пробы уровень  $K^+$  был выше в группе с положительными тестами на аллергию до пробы ( $Ni^{2+}$  – 50 [41,8; 62,6] мг/л;  $Cr^{3+}$  – 51,2 [41,6; 67,8] мг/л,  $Co^{2+}$  – 58,6 [45,1; 69,4] мг/л) и после пробы ( $Ni^{2+}$  – 75,8 [65,4; 87] мг/л,  $Cr^{3+}$  – 72,1 [63,4; 80,2] мг/л,  $Co^{2+}$  – 82,9 [72,4; 92,6] мг/л), чем в группе с отрицательными тестами до пробы ( $Ni^{2+}$  – 46,1 [40,2; 52,5] мг/л;  $Cr^{3+}$  – 52,4 [45,6; 60,3] мг/л,  $Co^{2+}$  – 51,8 [46,1; 61,8] мг/л) и после пробы ( $Ni^{2+}$  – 47,2 [40,6; 56,1] мг/л,  $Cr^{3+}$  – 54,6 [43,4; 63,1] мг/л,  $Co^{2+}$  – 54,2 [49,3; 61,3] мг/л).

Достоверное снижение уровня калия в ротовой жидкости пациентов с жалобами на непереносимость зубопротезных материалов неаллергической этиологии после снятия ортопедических конструкций и отсутствие прироста уровня калия в ротовой жидкости после трансбуккальных провокационных проб может указывать на неспецифическую гиперчувствительность.

По снижению концентрации ионов калия в ротовой жидкости пациентов с жалобами на НЗМ после снятия причинных ортопедических конструкций можно судить о наличии аллергии и неспецифической повышенной чувствительности к компонентам зубных протезов.

### **Ключевые слова:**

Дентальные сплавы, аллергия, калий, диагностика, биомаркер

### **Введение**

Непереносимость зубопротезных материалов (НЗМ) является важным клиническим состоянием с обостряющимися симптомами, прямо и косвенно влияющими на качество жизни [1-4]. В современной литературе не имеется данных по вопросам номенклатуры изучаемого патологического состояния, данная патология отсутствует в МКБ-10, а клинические признаки широко варьируют от местных проявлений воспалительного характера до отсутствия таковых у ряда пациентов.

Кроме того, не установлены универсальные критерии аллергии на зубопротезные материалы.

Многие авторы описывают аллергию на зубопротезные материалы основываясь на классификацию аллергических реакций предложенную в 1968 году П.Г. Джелл и Р.А. Кумбс. Однако за последние десятилетия по мере более глубокого изучения системы иммунитета лет как сложного динамического многоклеточного процесса, становится очевидно, что патогенез аллергии на зубопротезные материалы до конца не раскрыт и его невозможно объяснить только одним из типов аллергии согласно вышеупомянутой классификации. Поэтому изучение новых звеньев патогенеза и факторов, обуславливающих НЗМ аллергологической этиологии является весьма

[42,9; 58,3] мг/л (PWilcoxon=0,0001).

Reliable depression of level of a potassium in stomatic liquid of patients with complaints to an intolerance of dentoprosthetic materials of not allergic etiology after putting off of orthopedic designs and lack of a gain of level of a potassium in stomatic liquid after provocation can indicate a nonspecific hypersensitivity.

On depression of concentration of potassium ions in stomatic liquid of patients with complaints to an intolerance of dentoprosthetic materials after putting off of causal orthopedic designs it is possible to judge existence of an allergy and a nonspecific hypersensibility to components of dentures.

After oral provocative test the  $K^+$  level was higher in group with positive tests for an allergy before test ( $Ni^{2+}$  – 50 [41,8; 62,6] мг/л;  $Cr^{3+}$  – 51,2 [41,6; 67,8] мг/л,  $Co^{2+}$  – 58,6 [45,1; 69,4] мг/л) and after test ( $Ni^{2+}$  – 75,8 [65,4; 87] мг/л,  $Cr^{3+}$  – 72,1 [63,4; 80,2] мг/л,  $Co^{2+}$  – 82,9 [72,4; 92,6] мг/л), чем в группе с than in group with negative tests before test ( $Ni^{2+}$  – 46,1 [40,2; 52,5] мг/л;  $Cr^{3+}$  – 52,4 [45,6; 60,3] мг/л,  $Co^{2+}$  – 51,8 [46,1; 61,8] мг/л) and after test ( $Ni^{2+}$  – 47,2 [40,6; 56,1] мг/л,  $Cr^{3+}$  – 54,6 [43,4; 63,1] мг/л,  $Co^{2+}$  – 54,2 [49,3; 61,3] мг/л).

### **Keywords**

Dental alloys, allergy, potassium, diagnostics, biomarker

актуальным для разработки новых методов диагностики.

Диагноз «аллергия» правомочен при подтверждении алергоанамнеза результатом аппликационных проб [5, 6]. В большинство панелей для определения аллергии к металлам входят соли  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ti^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  и т.д. в концентрациях порядка 1г/100мл или 1моль/л. Однако они могут различаться использованными в их изготовлении растворителями (вода, спирт, масла, вазелин), анионами (хлориды, сульфаты, нитраты и т.д.). Это обуславливает определенную вариабельность получаемых результатов. Так как панели включают в основном вещества, имеющие наиболее высокий аллергенный потенциал, в принципе получаемые результаты имеют определенный параллелизм, что позволяет использовать эти панели в клинических целях [5], но остается неясной достоверность результатов такой диагностики. Авторами показано, что использование индекса местной реакции (RI) по Brasch и Henseler [7] при оценке результатов кожного алерготестирования с солями металлов позволило существенно повысить эффективность диагностики и обосновать выбор тестовых субстанций для диагностики состояний, связанных с неблагоприятным воздействием компонентов дентальных сплавов, и дифференцированного

подхода к выбору материалов зубных протезов [8].

Клинические проявления аллергии связаны с выделением медиаторов из клеток. Все лейкоциты (гранулоциты, моноциты, лимфоциты) имеют Fc-рецепторы, которые связывают антитела [9]. При отсутствии антител любых изотипов (IgM, IgA, IgG, IgE) в сыворотке крови не исключено, что в этот момент они имеются на лейкоцитах, или тромбоцитах, или в секретах. При диагностике аллергии для выявления антител к ионам металлов, связанных с лейкоцитами больного, в настоящее время используются прямой тест дегрануляции базофилов [10] и реакция аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов [9, 11]. В качестве оценочного теста с предполагаемыми аллергенами П.Н. Мойсейчик использовал реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) (или "полоскательный тест"), предложенный А. Д. Адо и Г. П. Бондаревой [10, 12]. Процесс миграции нейтрофилов через слизистую полости рта на фоне воздействия предполагаемых аллергенов (гаптенов) у сенсibilизированных к ним лиц изменяется под влиянием аллергенов.

Предложен комплекс расчетных показателей функции иммунной системы – соотношение CD4+/CD8+ субпопуляций Т-лимфоцитов, соотношение CD95+/CD28+ клеток, соотношение CD95+/HLA-DR+ клеток, средние значения которых наиболее существенно изменены при наличии сенсibilизации к металлам, входящим в состав дентальных сплавов, а также определение относительного содержания субпопуляций Т-клеток, несущих антигенспецифические рецепторы типа TCR- $\alpha/\beta$  и TCR- $\gamma/\sigma$ . В целях повышения эффективности лабораторной диагностики состояний, связанных с неблагоприятным воздействием дентальных сплавов автором рекомендована оценка экспрессии маркеров ранней активации Т-лимфоцитов – CD4+CD69+ и CD8+CD69+ в ответ на стимуляцию ионами металлов, входящих в состав дентальных сплавов [13, 14].

Известен способ специфической диагностики лекарственной аллергии по оценке выброса ионов калия из лейкоцитов крови под влиянием аллергена [15, 16]. Сущность его заключается в том, что определяется выброс ионов калия из лейкоцитов крови после их инкубации с аллергенами и центрифугирования этой смеси путем измерения в надосадочной жидкости на пламенном фотометре прироста уровня калия, что позволяет диагностировать наличие или отсутствие

сенсibilизации лейкоцитов и аллергии [16]. Получены данные о достаточно высокой диагностической специфичности (88%) и диагностической чувствительности (87%) данного метода. Однако необходимость забора крови из вены у пациента является существенным недостатком, поэтому мы предлагаем простой и доступный способ диагностики аллергии по оценке выброса ионов калия из лейкоцитов слизистой оболочки полости рта (СОПР) в ротовую жидкость (РЖ).

## Материалы и методы исследования

### Клиническая характеристика и принципы деления на группы пациентов с НЗМ

Проведено обследование 584 пациентов в возрасте от 34 до 86 лет, из них 61 мужчина и 523 женщины, направленные в клинику кафедр общей стоматологии с курсом ортопедической стоматологии клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ» с жалобами на НЗМ. Все пациенты устанавливали наличие причинно-следственной связи между возникновением симптомов непереносимости зубопротезного материала и фактом контакта с ним. После постановки аппликационных проб (АП) и реакции аллергениндуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) пациенты были разделены на 2 группы.

Симптомы непереносимости зубопротезных материалов в полости рта могут являться как признаками соматических заболеваний, так и заболеваний органов полости рта. Отсутствие четко выраженных патогномоничных симптомов, характерных только для аллергии на зубопротезные материалы обусловило выбор критериев включения и исключения пациентов в опытную группу, выработанных для подтверждения аллергии, как причины в возникновении симптомов непереносимости (таблица 1).

В первую группу вошло 94 пациента, соответствующих критериям включения. Из них 9 мужчин и 85 женщин.

Пациенты данной группы были разделены на подгруппы, по результатам выявленной ранее сенсibilизации по АП и РАПЛ:

- 1 подгруппа – 36 пациента с выявленной сенсibilизацией к Ni<sup>2+</sup>;
- 2 подгруппа – 32 пациентов с выявленной сенсibilизацией к Cr<sup>3+</sup>;
- 3 подгруппа – 26 пациентов с выявленной сенсibilизацией к Co<sup>2+</sup>.

Пациентам данной группы проводили определение выброса ионов калия из лейкоцитов РЖ

**Таблица 1. Критерии включения/исключения пациентов в исследование**

Критерии включения	Критерии исключения
Отсутствие кандидоза в полости рта	Наличие кандидоза в полости рта
Пациенты, не принимающие регулярно стероидные и/или нестероидные препараты	Регулярный прием стероидных и/или нестероидных препаратов
Наличием одного типа причинной конструкции во рту пациента	Наличие двух и более разнородных сплавов во рту пациента
Пациенты, не принимающие антигистаминные препараты	Пациенты, принимающие антигистаминные препараты
Положительные результаты АП и РАПЛ к одному из ионов металлов	Отрицательные результаты АП и РАПЛ

после трансбуккальных провокационных проб с солями ионов металлов: в первой подгруппе – с  $NiCl_2$  (0,001%), во второй – с  $CrCl_3$  (0,001%), в третьей – с  $CoCl_2$  (0,001%).

Во вторую группу (контрольную) выбирали из 488 пациентов (52 мужчины и 436 женщин) с жалобами на НЗМ не соответствующих критериям включения в опытную группу. Из них было отобрано методом рандомизации 90 пациентов для включения в исследование (8 мужчин и 82 женщины).

Все пациенты, включенные в исследование, дали и собственноручно заполнили добровольное информированное согласие на участие в работе.

Сформированные группы сопоставимы по возрастной и половой категориям.

Для снижения роли гальванических токов в этиологии развивавшихся симптомокомплексов в исследуемой группе, исключались пациенты с наличием в полости рта двух и более разнородных сплавов (например, штампованно-паянного и литого мостовидного протеза). Но у некоторых пациентов с наличием одного типа причинной конструкции, включенных в исследование, определялись гальванотоки, наличие которых мы связываем не с общепринятым представлением о коррозии и наличием индуцированных гальванических токов металлическими зубопротезными материалами в полости рта, а с наличием хронического аллергического или неспецифического воспаления за счет сенсibilизации системы иммунитета к металлам.

Аллергообследование пациентов начинали с заполнения анкеты, разработанной нами, что позволило выявить детали аллергологического

анамнеза, имеющего важное значение в диагностике непереносимости, отметить наличие сопутствующей патологии органов и систем, что служило поводом для назначения дополнительных консультаций специалистов соответствующего профиля, провести анализ клинических аспектов жалоб у пациентов с возникшими симптомами непереносимости.

С целью исключения ложноположительных реакций при оценке кожных проб, которые возникают при расчесывании кожи в области последних, пластырь с аллергеном наклеивался в область спины по правой и левой лопаточным линиям.

В качестве отрицательного контроля использовался чистый медицинский вазелин.

#### Аппликационное накожное тестирование с растворами солей металлов

Всем участникам исследования в двух группах осуществлялась постановка аппликационного накожного тестирования с растворами солей металлов в различных концентрациях на вазелиновой основе, с использованием в качестве аппликатора лейкопластыря «Унипласт Фиксирующий» 5X500 см. Результаты постановки АП оценивались через 3, 24 и 48 часов. Использованы следующие соли  $NiCl_2$  (3%),  $CrCl_3$  (3%),  $CoCl_2$  (1%). Обновление диагностических растворов проводили не реже чем через 2-3 недели.

Интерпретация результатов кожного тестирования проводилась согласно общепринятой методике [7].

Исследование одобрено этическим комитетом Витебской областной клинической больницы.

### Определение сенсibilизации лейкоцитов с использованием РАПЛ

В качестве аллергенов использовали растворы солей металлов. Оптимальная концентрация аллергенов для РАПЛ была определена с лейкоцитами 20 пациентов с аллергией на металлы и 20 здоровых лиц без аллергии. Установлено, что 0,01% растворы  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ , 0,005% раствор  $\text{CoCl}_2$  и 0,001% раствор  $\text{CuCl}_2$  не вызывают неспецифического повреждения лейкоцитов в реакции алергениндуцированного повреждения лейкоцитов.

Поэтому как аллергены использовали растворы солей металлов в физиологическом растворе хлорида натрия в вышеуказанных концентрациях.

Для исследования брали из вены 10 мл крови в пробирку, в которую добавляли 20 ед/мл гепарина. Использовали суспензию неразделенных лейкоцитов, полученных из плазмы крови после её отстаивания 30-40 мин. Лейкоциты отмывали от плазмы крови раствором хлорида натрия и готовили их суспензию в концентрации  $2 \times 10^6$  в 1 мл.

0,25-0,05 мл суспензии лейкоцитов смешивали с равным объемом различных концентраций испытуемых аллергенов-растворов солей металлов, к одной пробе (контроль) аллерген не добавляли. Смеси лейкоцитов с аллергенами инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Все пробы дублировали. После инкубации смесь центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин, надсадочную жидкость сливают, добавляют 2 капли 0,1% раствора трипанового синего, ресуспендировали и подсчитывали в камере Горяева процент окрашенных лейкоцитов.

Цитотоксический индекс (ЦИ) рассчитывали по формуле 1:

$$(a-b):a \times 100\% \quad (1)$$

где:

a – процент окрашенных клеток в опыте после инкубации с аллергеном;

b – то же, но в опыте без аллергена [1].

### Интерпретация результатов

Цитотоксические индексы больше 0,15 или присутствие более 15% поврежденных клеток в опыте по сравнению с контролем, указывают на наличие сенсibilизации лейкоцитов к испытуемому аллергену, т.е. на его алергическую этиологическую роль в данном заболевании.

## 2. Определение выброса ионов калия из лейкоцитов РЖ

Все пациенты, участвовавшие в исследовании, за сутки до тестирования не употребляли алкоголь, продукты с кофеином, никотин, за двое суток – противоаллергические лекарственные средства (антигистаминные, глюкокортикостероиды), исключали потенциально алергенные продукты и напитки. За 1 час до исследования не принимали пищу, не менее 4 часов не курили.

### 2.1. Методика проведения орально-транsbуккальных провокационных проб с учетом выброса калия лейкоцитами РЖ

Реакции ставили спустя 1 месяц после постановки кожных проб.

Способ осуществляется в несколько этапов:

#### 1. Подготовка аллергенов.

В качестве аллергенов использовали 0,001% растворы солей  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$ . Соли разводили стерильным физиологическим 0,9% раствором натрия хлорида.

#### 2. Провокация аллергенами выброса калия лейкоцитами (провокационный тест)

Забор исходной РЖ пациента производили с 9 до 11 часов дня, путем сплевывания в стерильные пробирки, без стимуляции утром, натошак, без предварительной чистки зубов. Пациент ополаскивал рот водой, а затем полоскал рот 50 мл физиологического раствора хлорида натрия 0,9% в течение 3 мин. Раствор выплевывал. Через 10 минут РЖ в объеме 1 мл собирали в две микропробирки, закрывали крышкой (контрольная проба №1).

Затем пациент полоскал рот раствором аллергена (по 50 мл 3 мин) и выплевывал.

Через 30 мин РЖ в объеме 1 мл собирали в микропробирки и закрывали крышкой (проба №2).

#### 3. Ход реакции

3.1. Образцы РЖ (1-1,5мл) центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 минут.

3.2. Забирали РЖ в стерильную пробирку №1 в объеме 500 мкл, разводили дистиллированной водой 1:10 и смешивали с помощью шейкера в течение 5 минут. Далее шприцем (5мл) забирали полученный раствор и фильтровали в стерильную пробирку через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. В фильтрате определяли уровень калия на пламенном фотометре. То же проводили с пробой № 2.

#### 4. Учет результатов

Настройку пламенно-фотометрического анализатора проводили перед каждым измере-

нием. Измерение проводили с использованием калиевого светофильтра при максимальной чувствительности прибора. Реакция считалась положительной, если выброс ионов калия в ротовой жидкости после полоскания аллергеном превышал 30% по сравнению с исходной пробой.

## 2.2. Определение выброса ионов калия из лейкоцитов РЖ пациентов с жалобами на НЗМ

Проба №1 забиралась в момент обращения и спустя 1 месяц после снятия причинных конструкций (проба №2). Методика забора РЖ указана в пункте 2.

## 3. Оценка внутрисерийной воспроизводимости методики проведения реакции выброса ионов калия из сенсibilизированных лейкоцитов РЖ

Содержание калия в пробах определяли на пламенном фотометре с использованием калиевого светофильтра в режиме максимальной чувствительности.

Проводили внутрिलाбораторный контроль качества детекции ионов калия в этом режиме работы прибора в соответствии с ISO 15189.

При внутрिलाбораторном контроле использовали контрольный материал (КМ):

КМ - раствор хлорида калия с исследованной концентрацией – 50 мкМ К<sup>+</sup>, который использовали для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторного анализа.

Систематическую погрешность 20 измерений, характеризующую правильность измерений, определяющую степень совпадения среднего результата повторных измерений контрольного материала (X) и установленного значения измеряемой величины рассчитывали в процентах по формуле:

$$B_{20} = (Y3 - X):Y3 \times 100\%. \quad (2)$$

где:

X — среднее значение измерений контрольного материала;

Y3 — установленное значение.

Для КМ было определено, что:

$$B_{20} = (50 - 51):50 \times 100\% = -2\%.$$

По требованиям аналитической точности исследования погрешность измерения концентрации ионов калия не должна выходить за рамки  $\pm 5,0\%$ .

Предельно допустимые значения смещения (B) и коэффициента общей аналитической вариации (CV) рассчитывали по результатам 20 измерений определяемого показателя в контрольном материале (таблица 2).

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 10.0.

**Цель исследования:** выявление аллергии и гиперчувствительности к ионам металлов путем определения выброса ионов калия из лейкоцитов слизистой оболочки полости рта в ротовую жидкость у пациентов с непереносимостью зубопротезных материалов.

## Результаты исследований

Определение выброса ионов калия из лейкоцитов СОПР в РЖ пациентов с жалобами на НЗМ до и после снятия предположительно причинных ортопедических конструкций.

У пациентов с НЗМ предположительно аллергической этиологии показатели среднего уровня К<sup>+</sup> в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составил 85,95 [77,8; 98,3] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,7 [42,1; 67,8] мг/л (таблица 3). Следовательно устранение индуктора аллергии снижало уровень К<sup>+</sup> в РЖ.

Уровень К<sup>+</sup> в РЖ у пациентов с жалобами на НЗМ неустановленной этиологии (n=90) до снятия ортопедических конструкций составил 66,4 [56,3; 72,6] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,5 [42,9; 58,3] мг/л (таблица 4). Исходный уровень К<sup>+</sup> (66,4 мг/л) в этой группе был повышен, по сравнению с уровнем К<sup>+</sup> после снятия протезов, однако существенно ниже ( $p \leq 0,05$ ), чем в первой группе (85,95 мг/л). По-видимому, у

**Таблица 2. Точность повторных измерений концентрации ионов калия**

Определяемый показатель	B20	CV20
Норматив точности измерения калия по ISO 15189	$\pm 5\%$	$\pm 5\%$
Результат точности измерения калия полученный для КМ	-2%	4,21%

**Таблица 3. Показатели среднего уровня  $K^+$  в ротовой жидкости у пациентов первой группы с НЗМ аллергической этиологии до и после снятия причинных ортопедических конструкций (n=94)**

Уровень $K^+$ в РЖ (мг/л)	Median	25 %о	75 %о	PWilcoxon
До снятия ортопедической конструкции	85,95	77,8	98,3	0,0001
После снятия ортопедической конструкции	51,7	42,1	67,8	

**Таблица 4. Показатели среднего уровня  $K^+$  в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ неустановленной этиологии до и после снятия предположительно причинных ортопедических конструкций (n=90)**

Уровень $K^+$ в РЖ (мг/л)	Median	25 %о	75 %о	PWilcoxon
До снятия ортопедической конструкции	66,4	56,3	72,6	0,0001
После снятия ортопедической конструкции	51,5	42,9	58,3	

них имела неспецифическая гиперчувствительность к стоматологическим материалам.

Исходя из полученных данных, можно судить о том, что тест выброса ионов калия в РЖ позволяет объективно оценивать сенсibilизацию и влияние зубопротезных материалов на местную реактивность СОПР.

У больных первой группы с развитием НЗМ, с более выраженной симптоматикой и выявленной сенсibilизацией к ионам металлов по АП и РАПЛ (на  $Ni^{2+}$  - у 36 пациентов, на  $Cr^{3+}$  - у 32 пациентов на  $Co^{2+}$  - у 26 пациентов) уровень ионов калия в РЖ был выше, чем у больных с более лёгким течением заболевания и при отсутствии аллергии.

По изменению выброса ионов калия из лейкоцитов РЖ до и после снятия причинных конструкций можно сделать выводы об участии лейкоцитов в патогенезе НЗМ. У больных с НЗМ предположительно аллергического происхождения отмечается снижение выброса ионов калия из лейкоцитов через месяц после снятия протезов по сравнению с исходным уровнем.

**Выброс ионов калия из лейкоцитов СОПР в РЖ пациентов с жалобами на НЗМ аллергической этиологии до и после трансбуккальных провокационных проб**

Для разработки способа диагностики аллергии на ионы металлов по приросту выброса ионов калия из лейкоцитов СОПР в РЖ пациенты с НЗМ аллергической этиологии были разделены на подгруппы, по результатам выявленной ранее сенсibilизации по АП и РАПЛ.

Из 36 пациентов, с выявленной сенсibilизацией по АП и РАПЛ к  $Ni^{2+}$ , прирост выброса ионов калия в РЖ более чем на 30% через 40 минут

после полоскания аллергеном был отмечен у 29 (80,5%) пациентов, соответственно у 7 (18,5%) пациентов прироста не наблюдалось.

Во второй подгруппе (n=32) с выявленной сенсibilизацией к  $Cr^{3+}$  тест выброса ионов калия был положительным у 24 (75%) пациентов, а отрицательным – у 8 (25%).

В третьей подгруппе (n=26) с выявленной сенсibilизацией к  $Co^{2+}$  положительными реакции были у 21 (80,8%) пациента, отрицательными – у 5 (19,2%) (таблица 5).

У 36 пациентов с НЗМ аллергической этиологии, с выявленной сенсibilизацией к  $Ni^{2+}$ , показатели среднего уровня и разброса значений уровня  $K^+$  в РЖ до провокации аллергеном составил 50 [41,8; 62,6] мг/л, а после – 75,8 [65,4; 87] мг/л (таблица 6).

Во второй подгруппе (n=32) с выявленной сенсibilизацией к  $Cr^{3+}$ , показатели среднего уровня и разброса значений уровня  $K^+$  в РЖ до провокации аллергеном составил 51,2 [41,6; 67,8] мг/л, а после – 72,1 [63,4; 80,2] мг/л (таблица 7).

В третьей подгруппе (n=26) с выявленной сенсibilизацией к  $Co^{2+}$ , показатели среднего уровня и разброса значений уровня  $K^+$  в РЖ до провокации аллергеном составил 58,6 [45,1; 69,4] мг/л, а после – 82,9 [72,4; 92,6] мг/л (таблица 8).

**Выброс ионов калия из лейкоцитов РЖ пациентов с жалобами на НЗМ неустановленной этиологии до и после провокационной пробы**

Среди пациентов с жалобами на НЗМ неустановленной этиологии (n=90) рандомизированно были выделены 3 подгруппы по 30 пациентов, сопоставимые по полу, возрасту, срокам пользования и типу причинных конструкций с пациен-

**Таблица 5. Результаты теста выброса ионов калия лейкоцитами РЖ у пациентов с НЗМ аллергической этиологии до и после трансбуккальных провокационных проб**

Группа пациентов с сенсibilизацией к ионам	Количество положительных результатов	Количество отрицательных результатов
Ni <sup>2+</sup> (n=36)	29 (80,5%)	7 (18,5%)
Cr <sup>3+</sup> (n=32)	24 (75%)	8 (25%)
Co <sup>2+</sup> (n=26)	21 (80,8%)	5 (19,2%)

**Таблица 6. Уровень K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ предположительно аллергической этиологии, с выявленной сенсibilизацией к Ni<sup>2+</sup> до и после трансбуккальных провокационных проб (n=36)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %	75 %	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	50	41,8	62,6	
После провокации	75,8	65,4	87	0,0001

**Таблица 7. Уровень K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ предположительно аллергической этиологии, с выявленной сенсibilизацией к Cr<sup>3+</sup> до и после трансбуккальных провокационных проб (n=36)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %	75 %	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	51,2	41,6	67,8	
После провокации	72,1	63,4	80,2	0,0001

**Таблица 8. Показатели среднего уровня K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ предположительно аллергической этиологии, с выявленной сенсibilизацией к Co<sup>2+</sup> до и после трансбуккальных провокационных проб (n=36)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %	75 %	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	58,6	45,1	69,4	
После провокации	82,9	72,4	92,60	0,0001

тами опытных подгрупп. Результаты выявления сенсibilизации по АП и РАПЛ к солям металлов у пациентов данных подгрупп были отрицательными. В каждой подгруппе были проведены провокационные тесты с 0,001% растворами солей NiCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>.

Из 30 пациентов, после провокации раствором соли NiCl<sub>2</sub>, прирост выброса ионов калия в РЖ более чем на 30% через 40 минут был отмечен у 4 (13,3 %) пациентов, соответственно у 26 (86,7%) пациентов прироста не наблюдалось.

В подгруппе, с применением в качестве аллергена соли 0,001% CrCl<sub>3</sub> (n=30) с выявленной сенсibilизацией к Cr<sup>3+</sup> тест выброса ионов калия был положительным у 3 (10%) пациентов, а отрицательным – у 27 (90%).

В третьей подгруппе (n=30) с выявленной сенсibilизацией к Co<sup>2+</sup> положительными результаты провокации солью CoCl<sub>2</sub> реакции были у 1

(3,3%) пациента, отрицательными – у 29 (96,7%) (таблица 9).

У 30 пациентов после провокации раствором соли NiCl<sub>2</sub>, показатели среднего уровня и разброса значений уровня K<sup>+</sup> в РЖ до провокации аллергеном составил 46,1 [40,2; 52,5] мг/л, а после – 47,2[40,6; 56,1] мг/л (таблица 10).

Во второй подгруппе (n=30) после провокации раствором соли CrCl<sub>3</sub>, показатели среднего уровня и разброса значений уровня K<sup>+</sup> в РЖ до провокации составил 52,4 [45,6; 60,3] мг/л, а после – 54,6[43,4; 63,1] мг/л (таблица 11).

В третьей подгруппе (n=30) после провокации раствором соли CoCl<sub>2</sub>, показатели среднего уровня и разброса значений уровня K<sup>+</sup> в РЖ до провокации аллергеном составил 51,8 [46,1; 61,8] мг/л, а после – 54,6[43,4; 63,1] мг/л (таблица 12).

Отсутствие достоверного отличия результатов проведения провокационных тестов с раство-



**Таблица 9. Результаты теста выброса ионов калия лейкоцитами РЖ у пациентов с НЗМ неустановленной этиологии до и после трансбуккальных провокационных проб**

Группа пациентов с сенсibilизацией к ионам	Количество положительных результатов	Количество отрицательных результатов
Ni <sup>2+</sup> (n=30)	4 (13,3 %)	26 (86,7%)
Cr <sup>3+</sup> (n=30)	3 (10%)	27 (90%)
Co <sup>2+</sup> (n=30)	1 (3,3%)	29 (96,7%)

**Таблица 10. Показатели среднего уровня K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ неустановленной этиологии, до и после трансбуккальных провокационных проб с раствором соли NiCl<sub>2</sub>, (n=30)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %o	75 %o	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	46,1	40,2	52,5	0,052
После провокации	47,2	40,6	56,1	

**Таблица 11. Показатели среднего уровня K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ неустановленной этиологии до и после трансбуккальных провокационных проб с раствором соли CrCl<sub>3</sub>, (n=30)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %o	75 %o	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	52,4	45,6	60,3	0,058
После провокации	54,6	43,4	63,1	

**Таблица 12. Показатели среднего уровня K<sup>+</sup> в ротовой жидкости у пациентов с НЗМ неустановленной этиологии, до и после до и после трансбуккальных провокационных проб с раствором соли CoCl<sub>2</sub>, (n=30)**

Уровень K <sup>+</sup> в РЖ (мг/л)	Median	25 %o	75 %o	P <sub>Wilcoxon</sub>
До провокации	51,8	46,1	61,8	0, 1
После провокации	54,2	49,3	61,3	

рами солей NiCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub> в контрольных подгруппах указывают на специфичность предлагаемого метода.

Увеличение концентрации ионов калия в РЖ после провокации аллергенами солей металлов, а также снижение их количества в РЖ после снятия причинных ортопедических конструкций у больных с признаками аллергии мы объясняем тем, что гранулоциты СОПР, связывающими Ig-E и Ig-G антитела своими Fc-рецепторами, при взаимодействии с аллергенами выделяют различные биологически активные вещества, а вместе с ними и внутриклеточные ионы калия. Таким образом, определение ионов калия, вышедших из клеток, после провокационной пробы аллергеном может быть универсальным методом *in vivo* диагностики аллергии и гиперчувствительности.

Достоверное снижение уровня калия в РЖ пациентов с жалобами на НЗМ неаллергической

этиологии после снятия ортопедических конструкций и отсутствие прироста уровня калия в РЖ после провокации аллергеном, может указывать на неспецифическую гиперчувствительность.

Таким образом, определение уровня калия в ротовой жидкости, может применяться в качестве биомаркера аллергии и непереносимости стоматологических материалов.

### Выводы

1. У больных с НЗМ после проведения орально-трансбуккальных провокационных проб с солями металлов, наблюдается выделение в ротовую жидкость ионов калия, что указывает на повышенную чувствительность к этим солям.
2. У пациентов с НЗМ предположительно аллергической этиологии, доказанной аппликаци-

онными пробами и положительными трансбуккальными пробами, показатели среднего уровня  $K^+$  в РЖ до снятия причинных ортопедических конструкций составил 85,95 [77,8; 98,3] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,7 [42,1; 67,8] мг/л ( $P_{\text{Wilcoxon}}=0,0001$ ). Уровень  $K^+$  в РЖ у пациентов с жалобами на НЗМ неустановленной этиологии ( $n=90$ ) до снятия ортопедических конструкций составил 66,4 [56,3;72,6] мг/л, а спустя 1 месяц после снятия – 51,5 [42,9; 58,3] мг/л ( $P_{\text{Wilcoxon}}=0,0001$ ). Этот прирост указывает на неспецифическую гиперчувствительность.

- У пациентов с НЗМ аллергической этиологии, с выявленной сенсibilизацией к  $Ni^{2+}$  ( $n=36$ ), показатель среднего уровня  $K^+$  в РЖ до провокации им составил 50 [41,8; 62,6] мг/л, а после – 75,8 [65,4; 87] мг/л. У пациентов ( $n=32$ ) с выявленной сенсibilизацией к  $Cr^{3+}$ , показатель среднего уровня  $K^+$  до провокации составил 51,2 [41,6; 67,8] мг/л, а после – 72,1 [63,4; 80,2] мг/л. В подгруппе пациентов ( $n=26$ ) с выяв-

ленной сенсibilизацией к  $Co^{2+}$ , показатели среднего уровня  $K^+$  в РЖ до провокации им составил 58,6 [45,1; 69,4] мг/л, а после – 82,9 [72,4; 92,6] мг/л. Полученные данные указывают на наличие аллергии и специфического выброса  $K^+$  после трансбуккальных провокационных проб.

- Достоверное снижение уровня калия в РЖ пациентов спустя 1 месяц после снятия ортопедических конструкций во всех группах и отсутствие прироста уровня калия в РЖ пациентов с жалобами на НЗМ неаллергической этиологии после провокации 0,001% растворами солей металлов указывает на неспецифическую гиперчувствительность у данных пациентов к зубопротезным материалам.
- По снижению концентрации ионов калия в РЖ пациентов с жалобами на НЗМ после снятия причинных ортопедических конструкций можно судить о наличии аллергии и неспецифической повышенной чувствительности к компонентам зубных протезов.

## Литература

- Zhou J., Paul A., Bennani V. et al. New Zealand dental practitioners' experience of patient allergies to dental alloys used for prosthodontics. *N. Z. Dent. J.* 2010; Vol.106: 55-60.
- Murray P.E., Godoy C.G., Godoy F.G. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2007; Vol.12: 258-266.
- Chopde N. et al. Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2012; Vol.13, №4: 456-459.
- Emami E., Taraf H., de Grandmont P. et al. The association of denture stomatitis and partial removable dental prostheses: a systematic review. *Int. J. Prosthodont.* 2012; Vol.25: 113-119.
- Лебедев К. А. и др. Непереносимость зубопротезных материалов. М.: Либроком, 2010, 208 с.
- Новиков Д. К., Сергеев Ю. В., Новиков П. Д. Лекарственная аллергия. *Нац. акад. микологии* 2001, 313 с.
- Brasch J, Henseler T. The reaction index – a parameter to assess the quality of patch test preparations. *Contact Dermatitis* 1992; 27: 203–204.
- Титов П. Л. Оценка сенсibilизации организма к ионам металлов *in vivo* у лиц с предполагаемым неблагоприятным локальным воздействием дентальных сплавов. *Бел. мед. журн.* 2004; №4: 89–92.
- Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. *Витебск*, 1996, 282 с.
- Мойсейчик П. Н. Аллергологическое тестирование как этап углубленного обследования стоматологических больных. *Соврем. стоматология* 1999; № 2: 16–17.
- Карпук Н. А., Карпук И. Ю. Диагностика аллергии на металлические изделия в реакции алергениндуцированного повреждения лейкоцитов. *Мед. новости* 2012; № 6: 75–76.
- Адо А. Д., Бондарева Г. П., Читаева В. Г. Феномен торможения миграции лейкоцитов *in vivo* и *in vitro* при лекарственной аллергии. *Стоматология* 1980; Т. 59, № 3: 5-8 .
- Титов П. Л. Характеристика иммунного статуса пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов. *Мед. наука молодых ученых : сб. науч. работ.* Минск, 2005: 106–108.
- Титов П. Л. Оценка влияния ионов  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$  на функциональное состояние лимфоцитов периферической крови пациентов с жалобами на неблагоприятное действие дентальных сплавов. *Мед. наука молодых ученых : сб. науч. работ.* Минск, 2005: 104–106.
- Новиков Д.К., Новикова В.И. Способ определения сенсibilизации лейкоцитов/Авторское свидетельство СССР №445690, 14 июня 1974 г. *Бюлл.* № 375.10.75 г.
- Янченко В.В., Новиков Д.К. Применение теста выброса ионов калия для диагностики и профилактики аллергических осложнений лекарственной терапии. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 1999; №1: 67-70.

## Сведения об авторах:

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

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

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

Поступила 14.09.2016 г.